Stato della ricerca sulla batteriosi dell'actinidia

Gianni Tacconi – CRA-GPG

Chi è, cosa fa, cosa faremo: dal campo al microscopio al trascrittoma

Pseudomonas syringae pv. actinidiae

Ceppo poco virulento

Pseudomonas syringae pv. actinidiae

Ceppo poco virulento

Pseudomonas syringae pv. actinidiae

Ceppo poco virulento

Pseudomonas syringae pv. actinidiae

Ceppo molto virulento

Bay of Plenty Times

Kiwifruit Psa in 67 orchards

NZPA | 24th November 2010

Share Tweet 0

Six more orchards have been confirmed as having the bacterial infection Psa that is spreading through the kiwifruit industry, bringing the total to 67.

The latest infections were in the core region of infected properties, an area about 23km wide south of Te Puke, a Zespri spokesman said.

A total of 485 orchards have been inspected by trained assessors and 70 of them (14 per cent) put on a restricted-place notice.

About 80 per cent of the 344 results so far have come back negative.

About 30 per cent of the infected orchards grow green kiwifruit, and the rest grow Zespri's gold kiwifruit.

These innocuous-looking brown spots on a kiwifruit leaf are symptoms of the bacterial disease Psa. Photo / Photo: Supplied.

Share Tweet 0 IM This Share Print

Rural News

Next Article: Future takes up agenda at top dairy conference

Special Offers

Nuova Zelanda-aggiornamento sulla diffusione della batteriosi virulenta del kiwi (Psa-V): secondo l'ultimo bollettino della Kiwifruit Vine Health (21 dicembre 2011) **www.kvh.org.nz/statistics**

	Positivo alla Psa-V
Frutteti	933
% di frutteti neozelandesi colpiti	28%
Ettari di frutteti colpiti (inclusa l'intera area di frutteti colpiti solo in parte dalla Psa-V)	5.038
% di ettari di frutteti neozelandesi colpiti	37%

Il 50% degli ettari destinati a kiwi giallo e il 33% degli ettari destinati alla varietà verde sono stati colpiti dalla Psa-V.

Nuova Zelanda: la batteriosi minaccia di ridurre l'export di kiwi del 25%

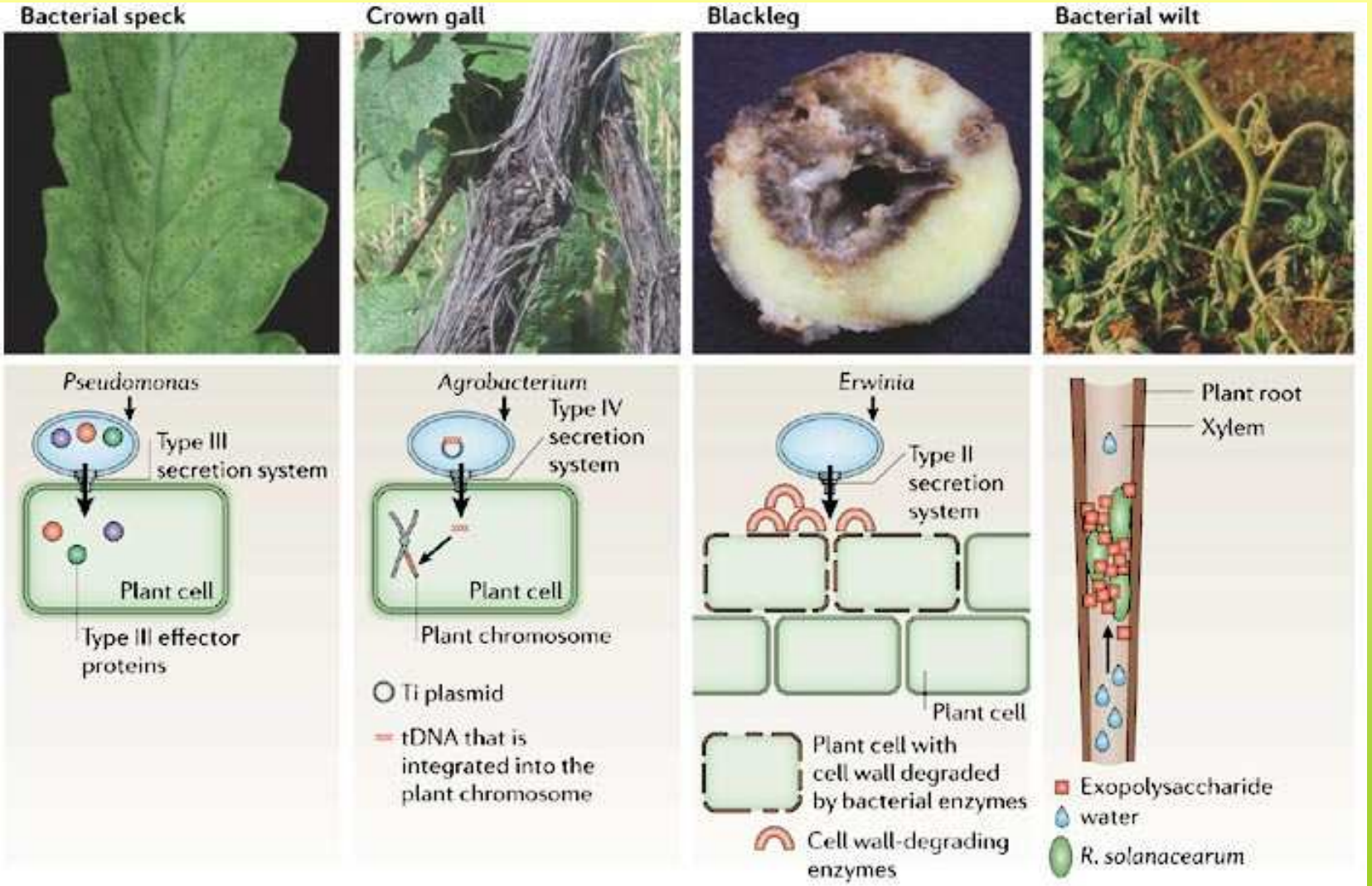
La ricerca si sviluppa su tre livelli:

1. **prove in ambiente controllato: processo di infezione**
2. **prove in campi sperimentali: difesa fitoiatrica**
3. **approcci molecolari: progetti in atto e progetto CRA**

Chi è ***Pseudomonas syringae pv. actinidiae***

- Batterio Gram negativo;
- Strettamente aerobio;
- Di forma bastoncellare;
- Mobile grazie alla presenza di uno o più flagelli polari;
- Non sporigeno.

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae*



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

1° livello: prove in ambiente controllato.
Saranno condotte prove in ambiente climatizzato su piantine in vaso con infezione artificiale.

il decorso dell'infezione verrà seguito sia con test specifici che con test molecolari atti a quantificare la carica batterica nella pianta

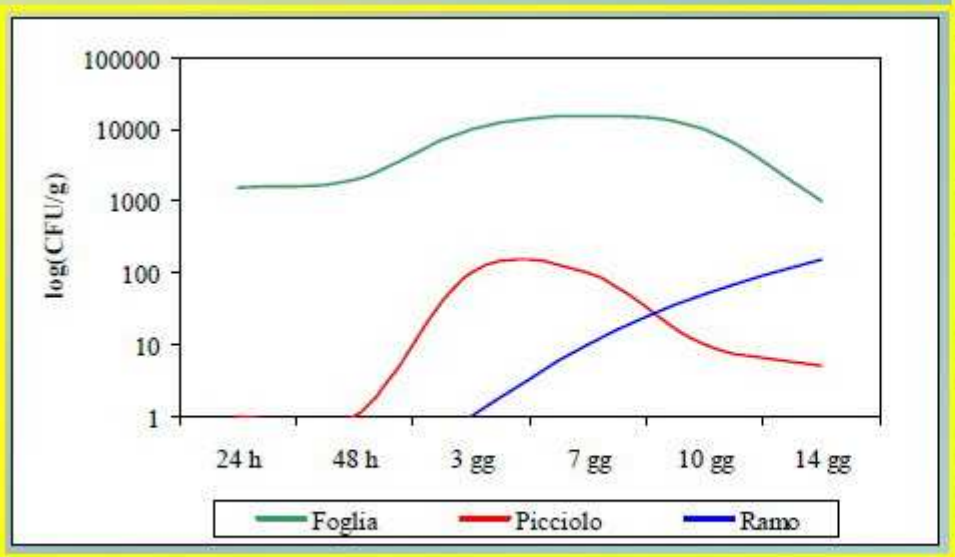
CRA-Fru (Scortichini et al.)

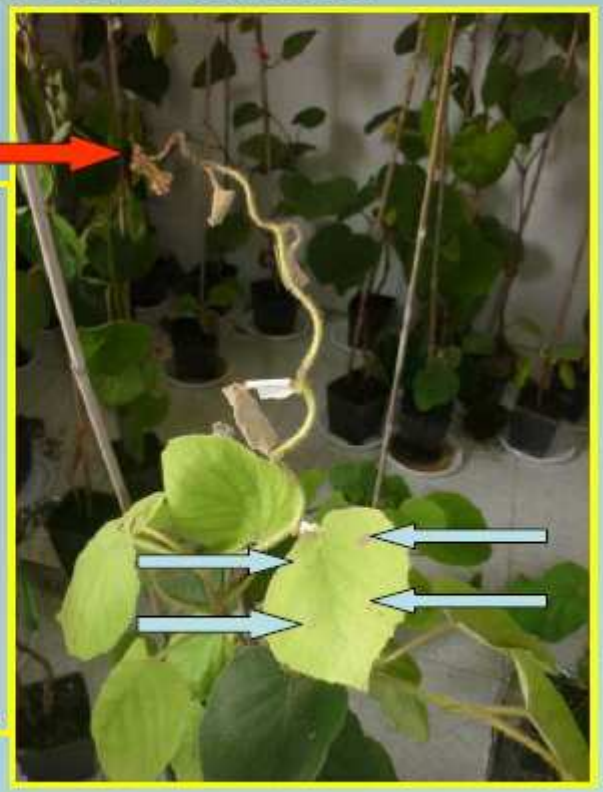
Attenzione:
In ambiente controllato si conoscono:
-Le condizioni ambientali
-Le condizioni della pianta
-Le tempistiche di trattamento ed inoculo

Molte prove in tempi e condizioni diverse per simulare il campo

MIGRAZIONE SISTEMICA IN PIANTA

Esperimenti condotti su piante in vaso, in ambiente protetto, hanno evidenziato che in seguito all'inoculazione delle lamine fogliari, si ha una migrazione sistemica del batterio che dopo circa sette giorni raggiunge i giovani germogli provocandone l'avvizzimento.





CRA-Fru (Scortichini et al.)

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA
DIPARTIMENTO DI COLTURE ARBOREE

Plant & Food RESEARCH
RANGAHAU AHUMĀRA KAI

Come Psa infetta la pianta e colonizza i tessuti dell'ospite

Spinelli F.[1], Donati I.[1], Vanneste J.[2] and Costa G.[1]

1: Università di Bologna, Dipartimento di Colture Arboree, viale Fanin 46 - 40127, Bologna, Italy
2: Plant & Food Research Ruakura East Street, Hamilton, 3214, New Zealand

E-mail: spinelli@agrsci.unibo.it

KVH KIWIFRUITVINEHEALTH

This research is supported by Zespri

Zespri Kiwifruit

Università degli studi di Bologna

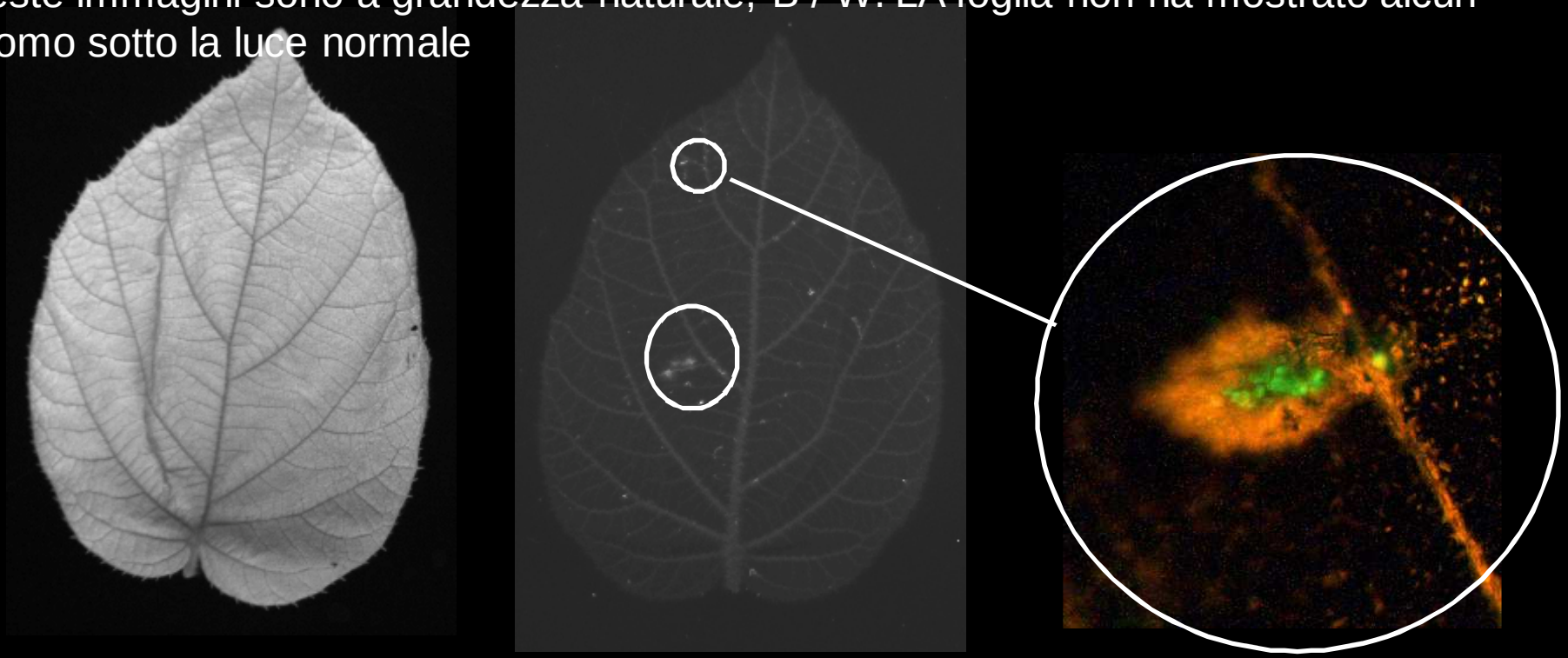
Plant & Food RESEARCH
RANGAHAU AHUMĀRA KAI

Zespri Kiwifruit

Visualizzazione a luce UV del batterio

Il batterio è stato ingegnerizzato inserendo un gene che lo rende fluorescente alla luce UV

Queste immagini sono a grandezza naturale, B / W. LA foglia non ha mostrato alcun sintomo sotto la luce normale

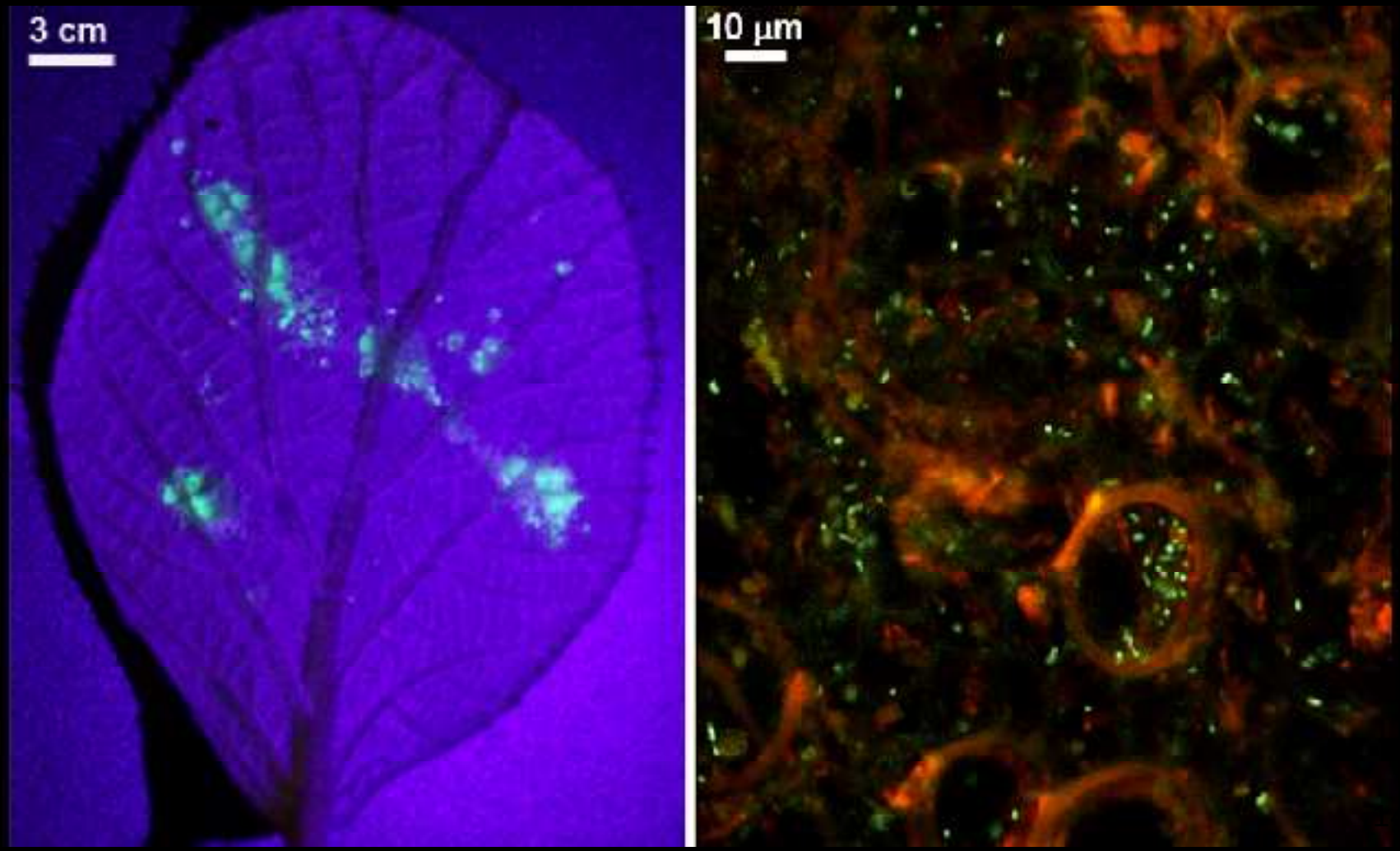


Foglia: filtro per clorofilla

Filtro per fluorescenza verde (PSA)

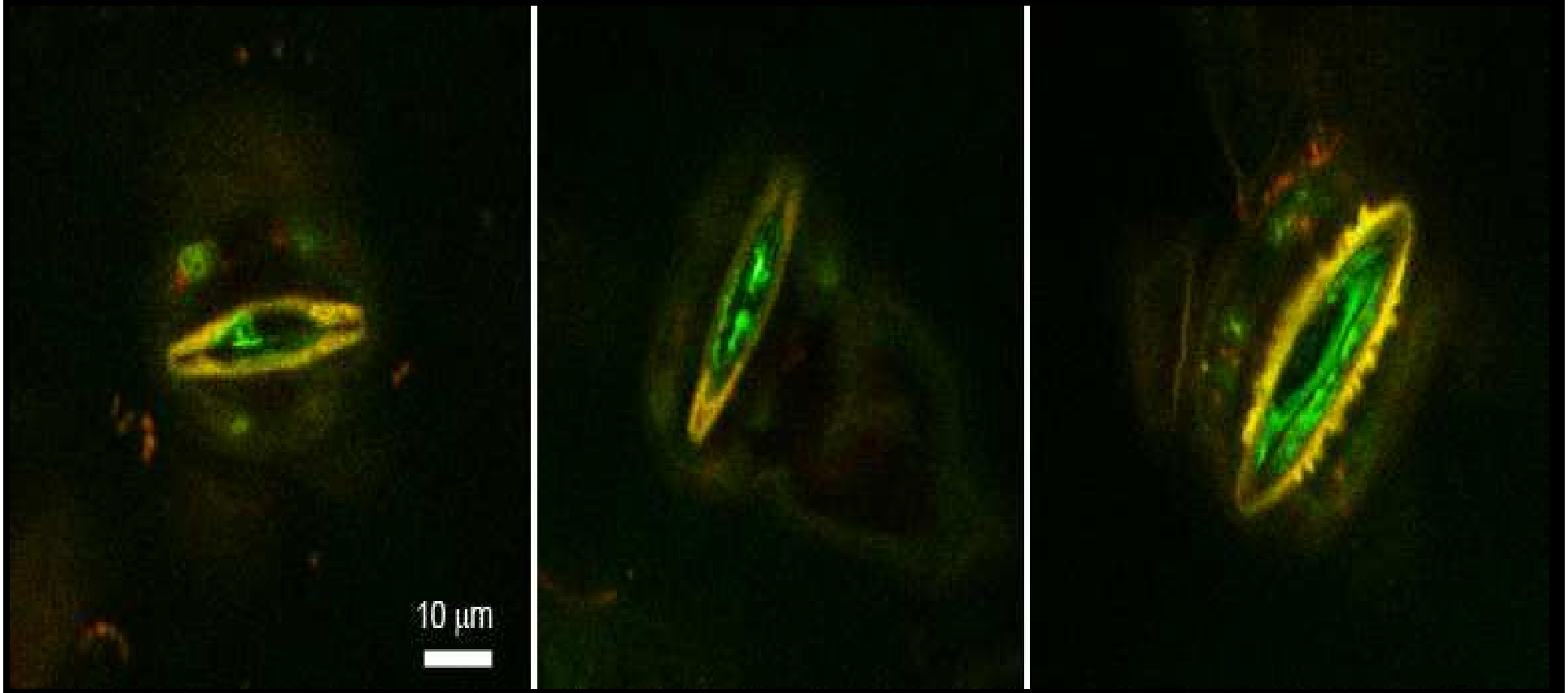
100x

Infezione su foglia

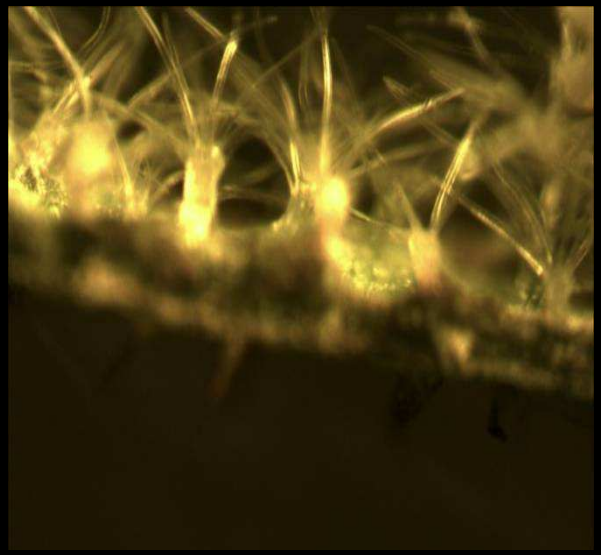


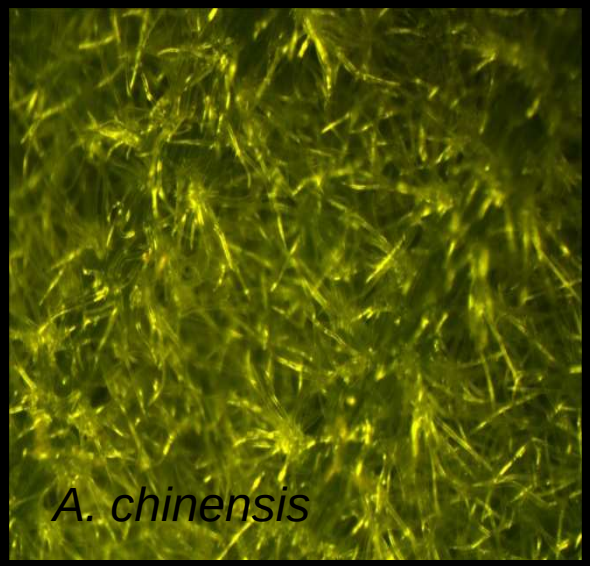
ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA
DIPARTIMENTO DI COLTURE ARBOREE

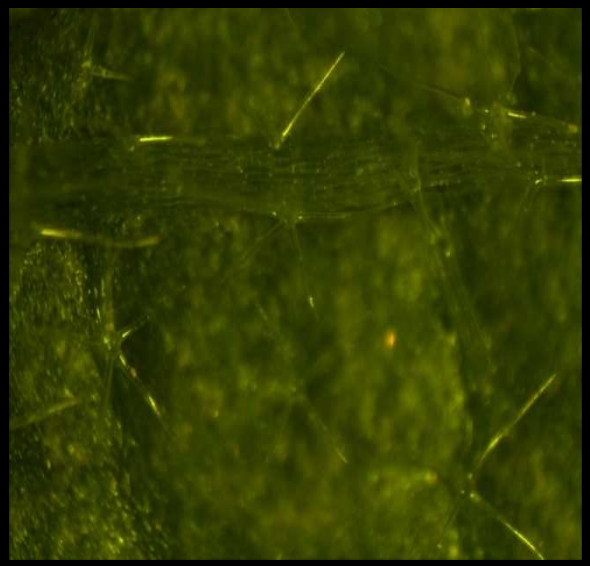
Presenza sugli stomi



Il ruolo dei tricomi



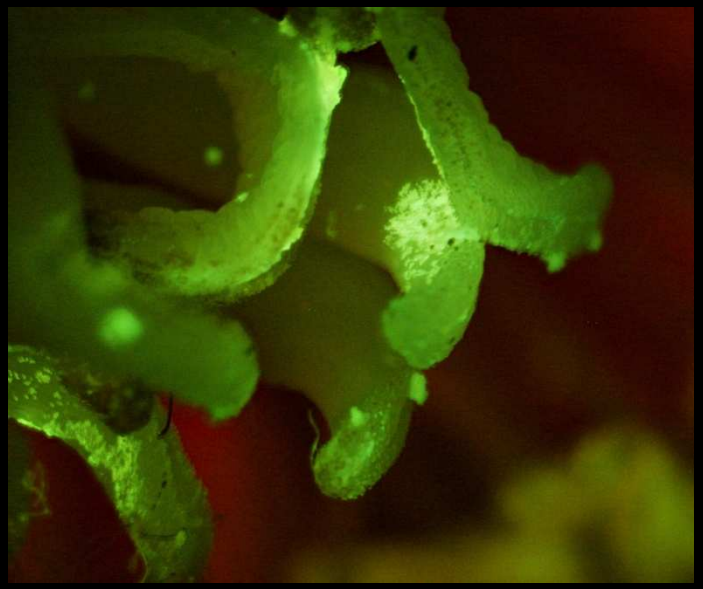


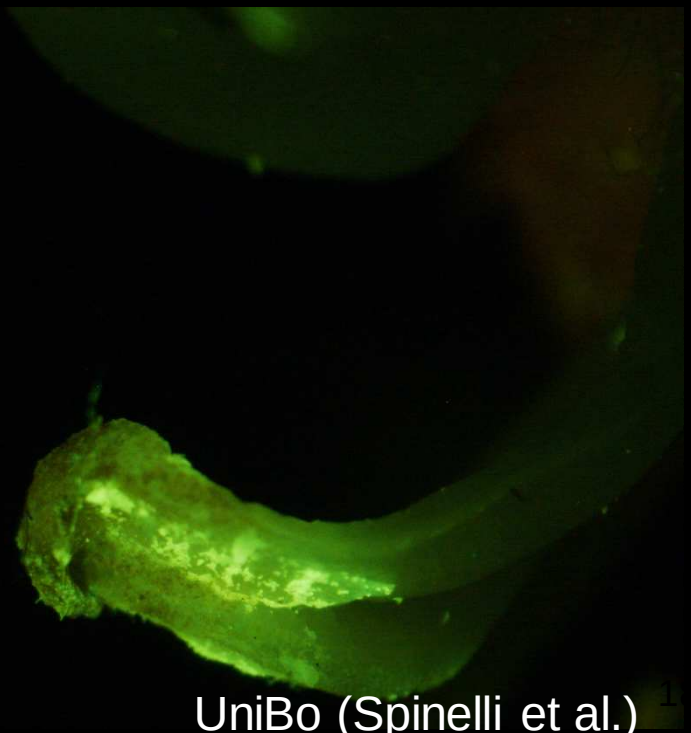


ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA
DIPARTIMENTO DI COLTURE ARBOREE

Il ruolo dei tricomi

Il ruolo del fiore: lo stigma





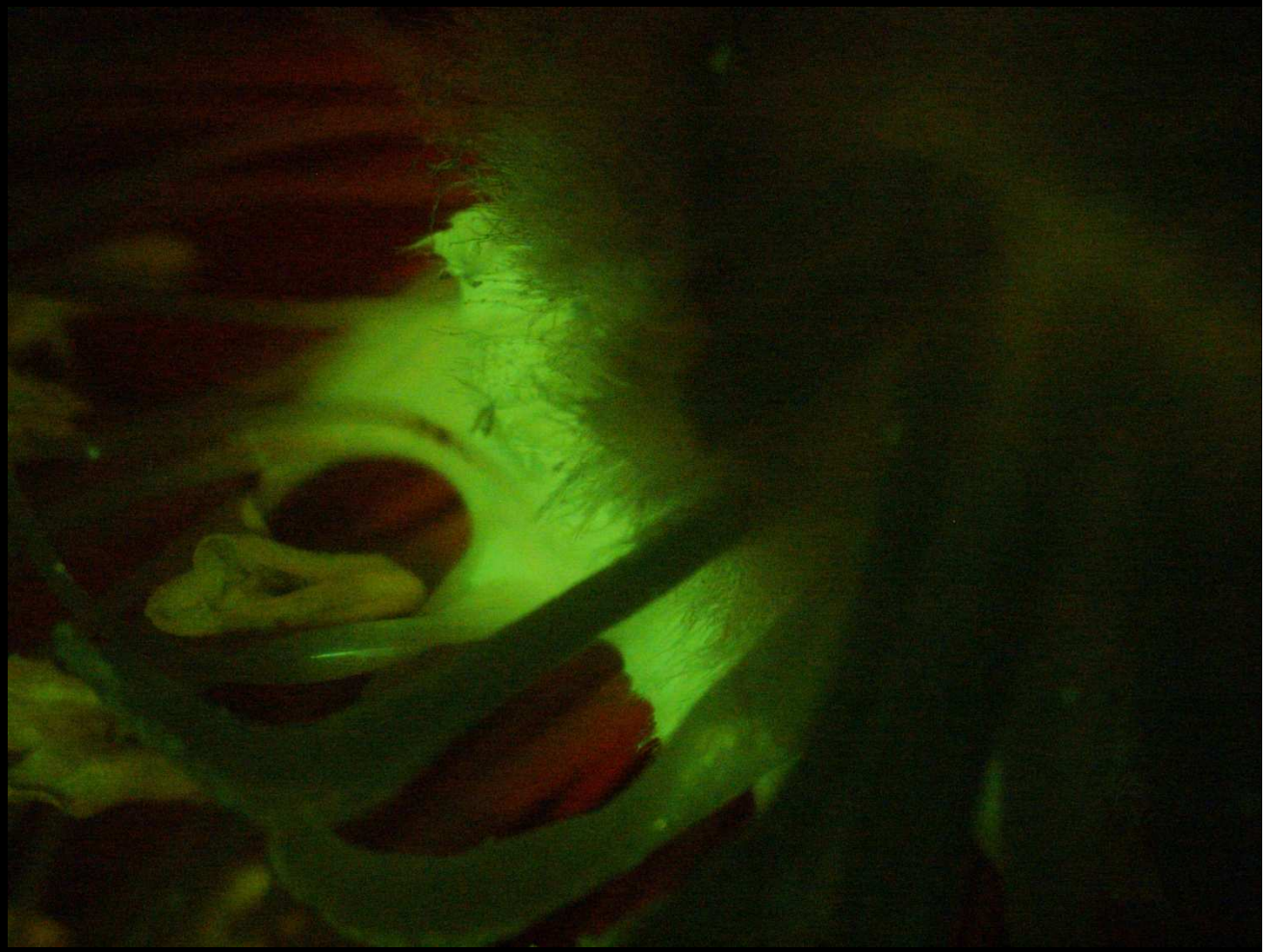
UniBo (Spinelli et al.)

Università degli studi di Bologna

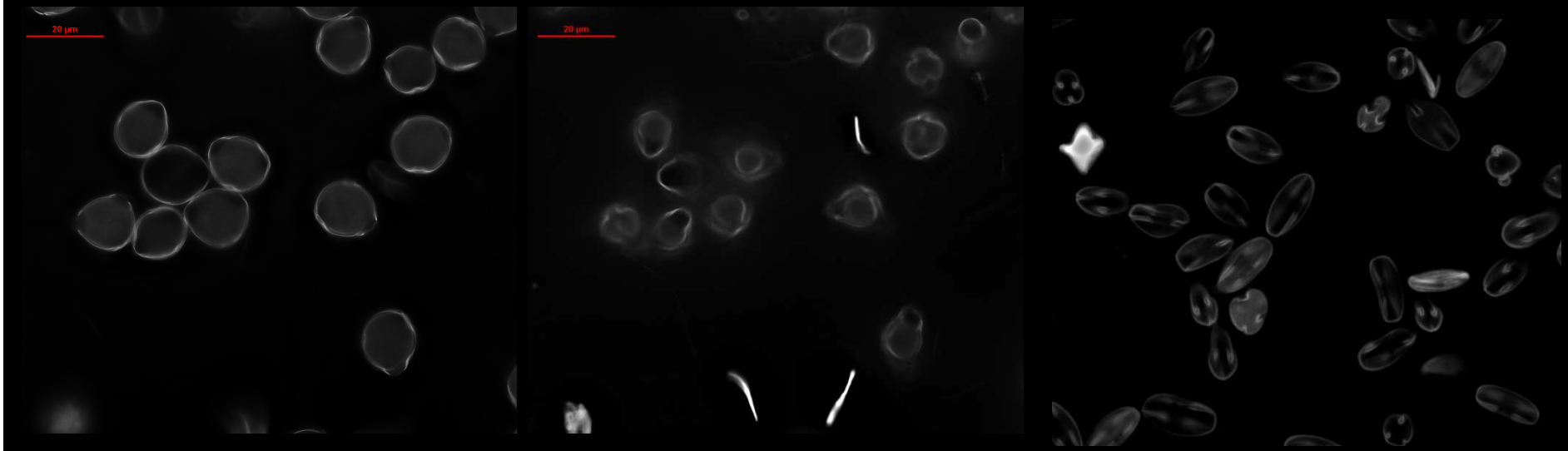
Plant & Food RESEARCH
RANGAHAU AHUMĀRA KAI

Zespri Kiwifruit

Il ruolo del fiore: la coppa nettarifera

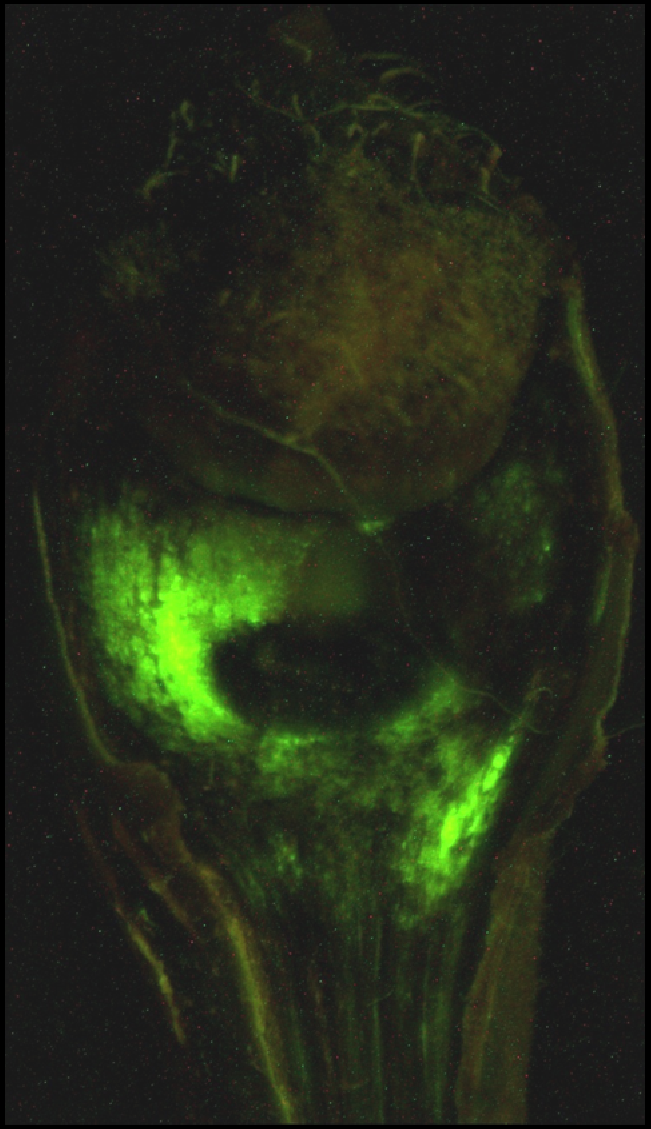


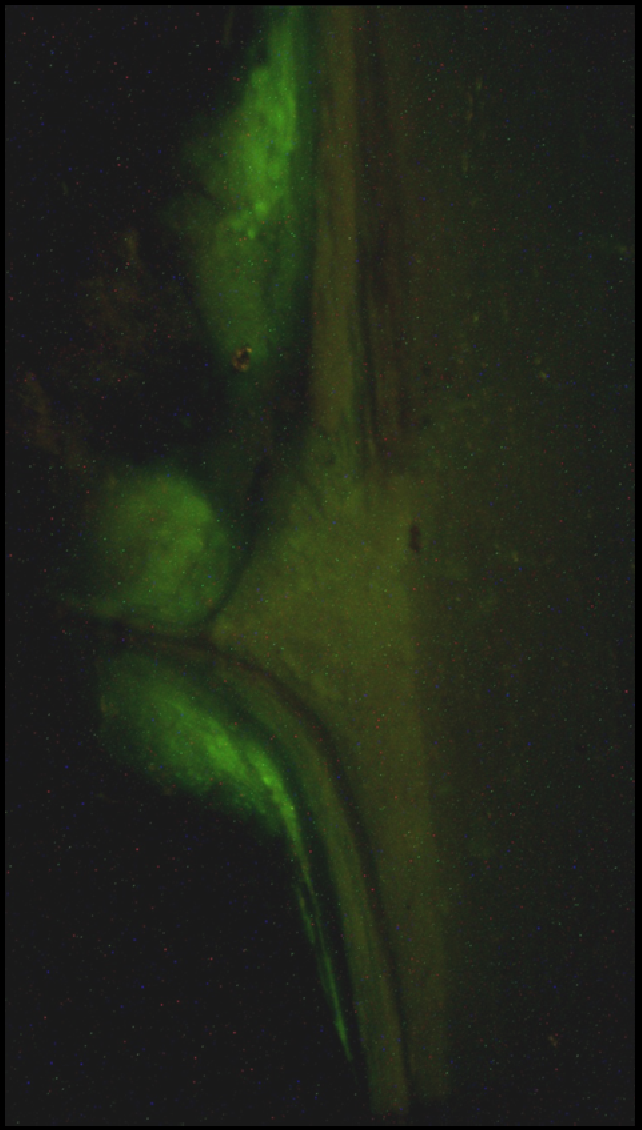
Il ruolo del fiore: il polline



Il polline può portare PSA, ma l'agente patogeno è stato trovato sul residui vegetali (ad esempio parti di antere) contaminanti il polline

Cicatrici fogliari e zona di abscissione e colonizzazion e dello stelo





UniBo (Spinelli et al.)

stomi
tricomi rotti
DANNI da Vento e grandine....

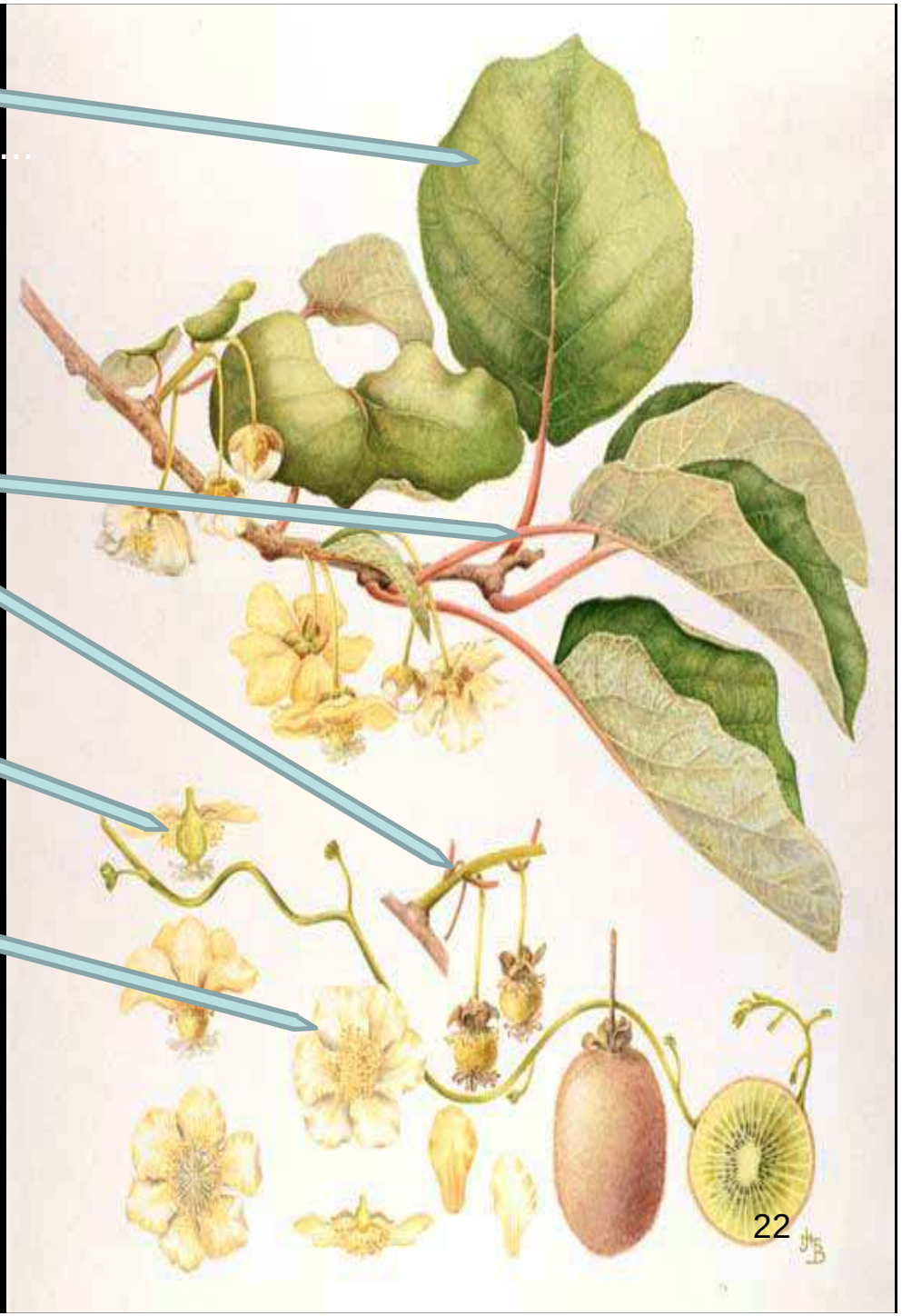
Zone di abscissione
- foglie
- fiori
- frutti

Fiore femminile

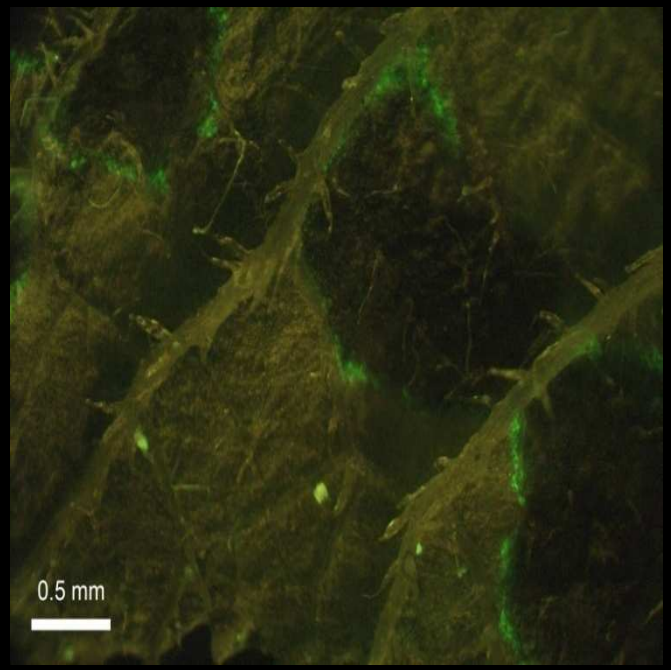
Fiore maschile

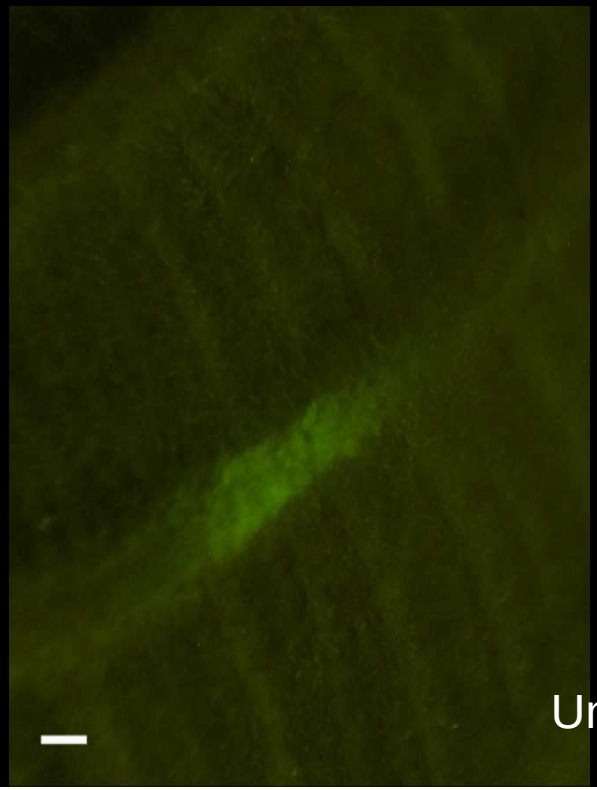
DANNI CAUSATI ARTIFICIALMENTE
FERITE E TAGLI: POTATURA,
RACCOLTA, legature

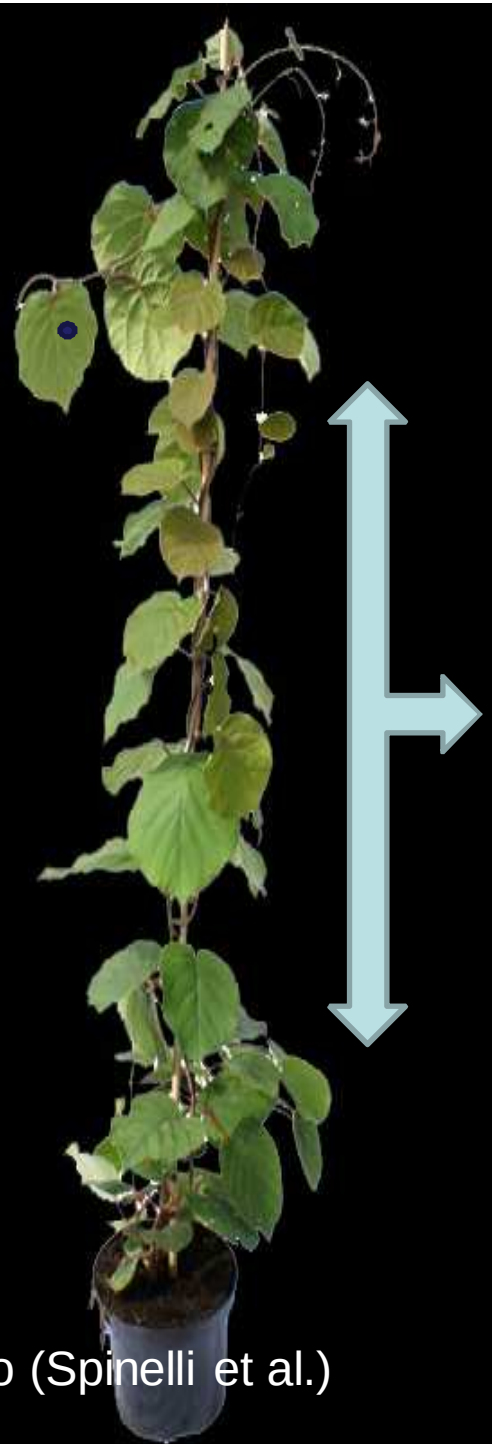
UniBo (Spinelli et al.)



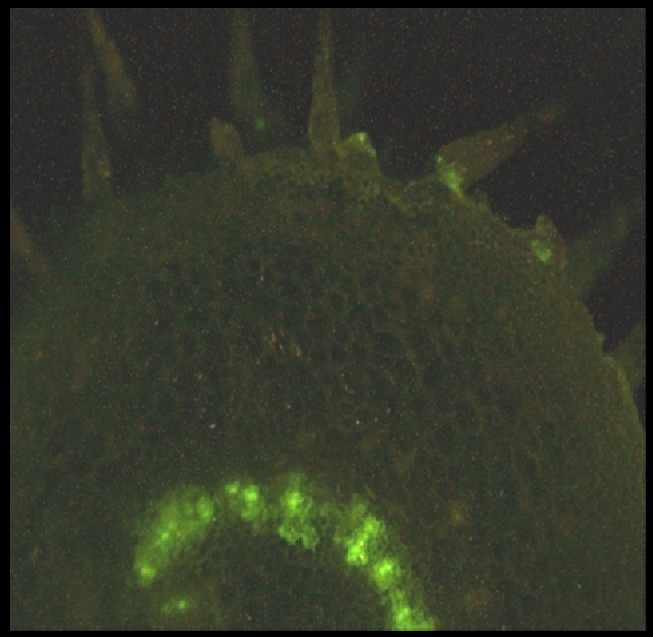
Come si muove nella pianta





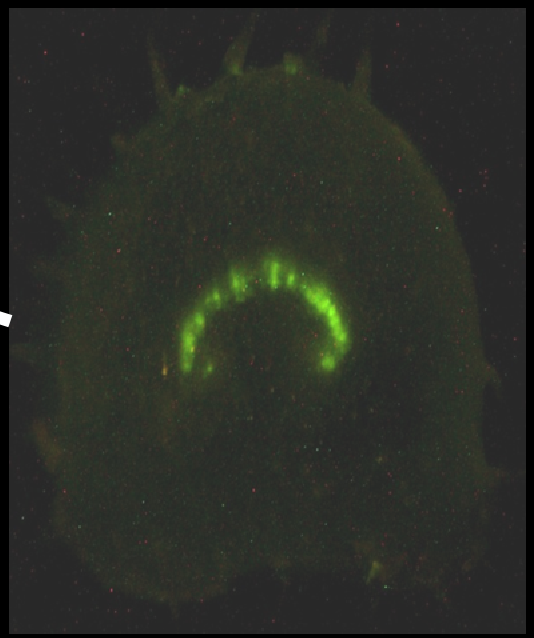


UniBo (Spinelli et al.)

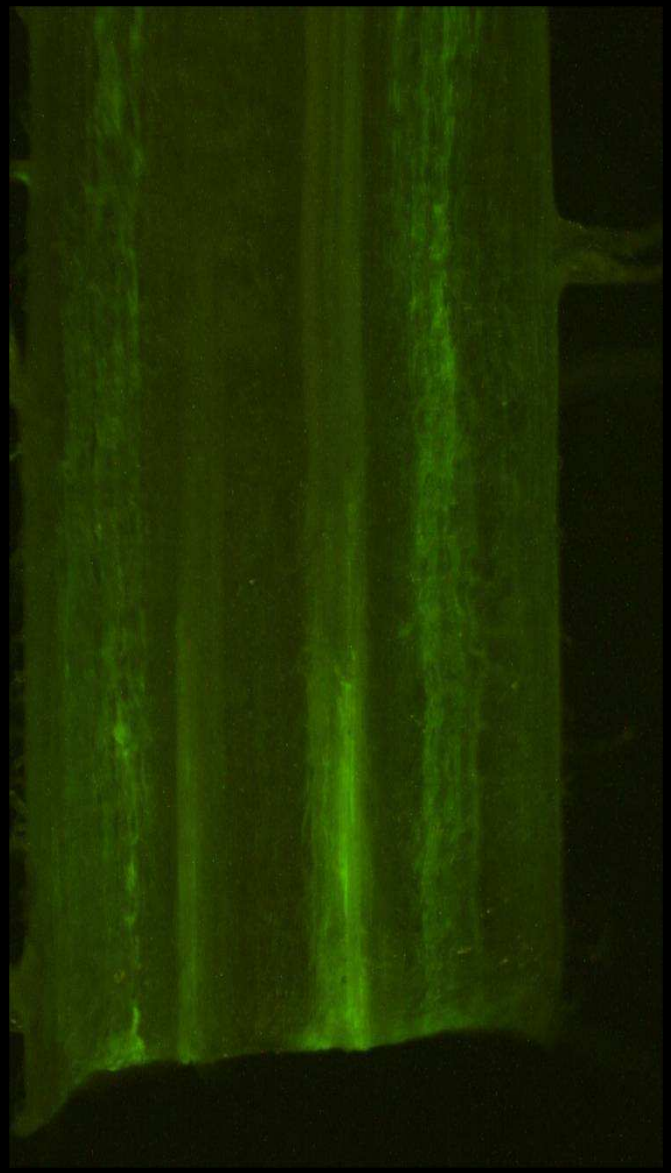


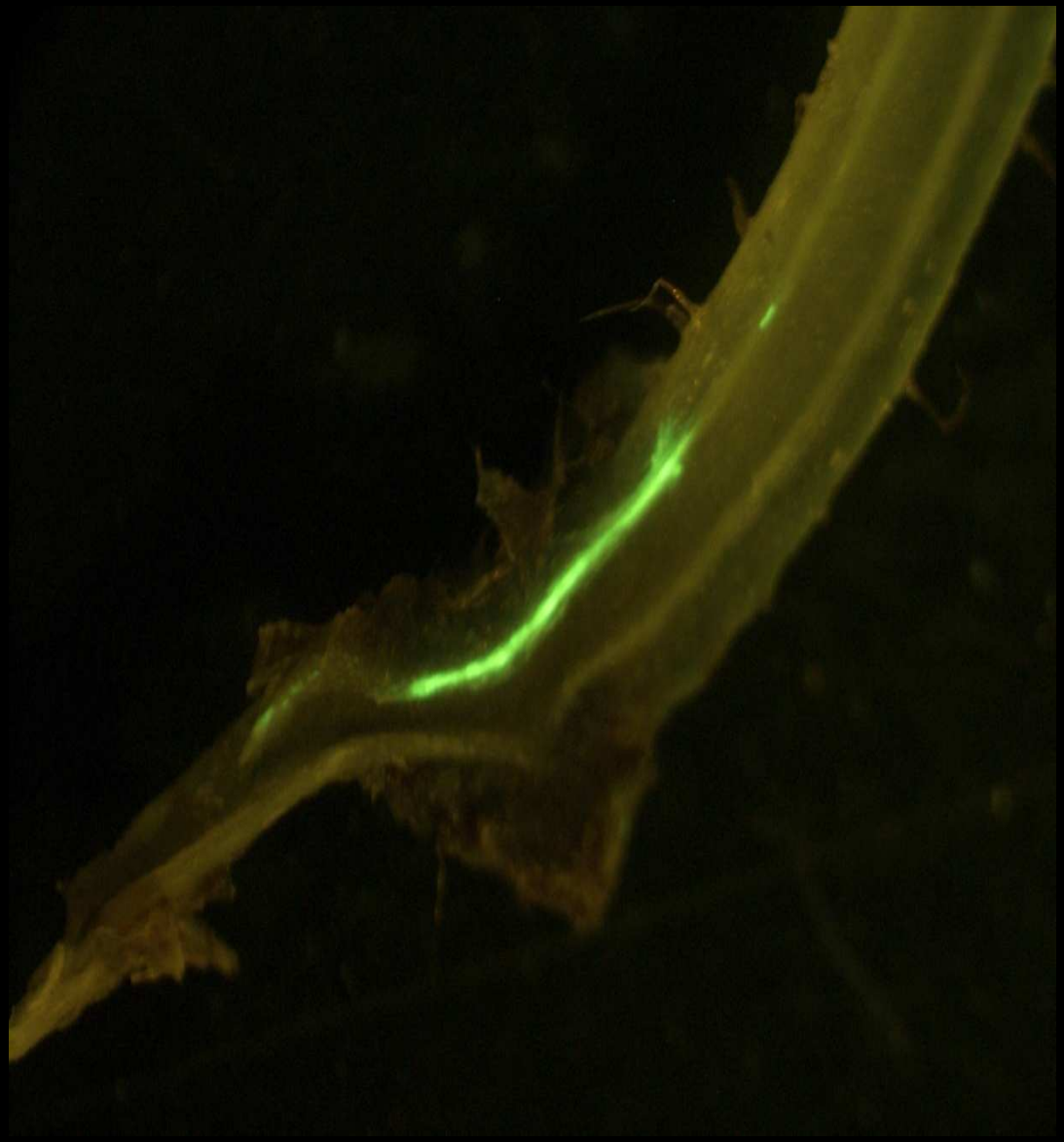
Hayward
50x

Hayward 25x

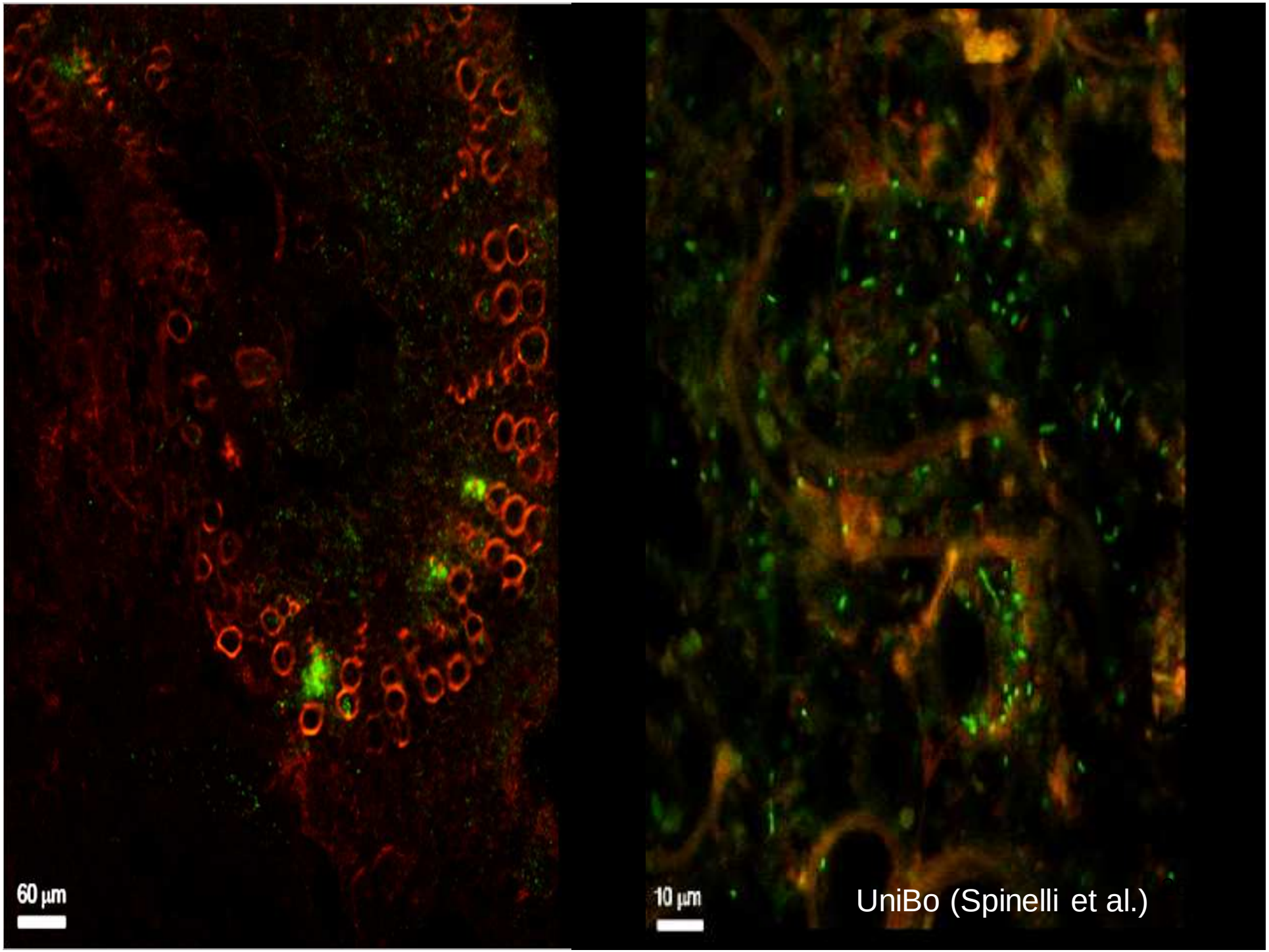


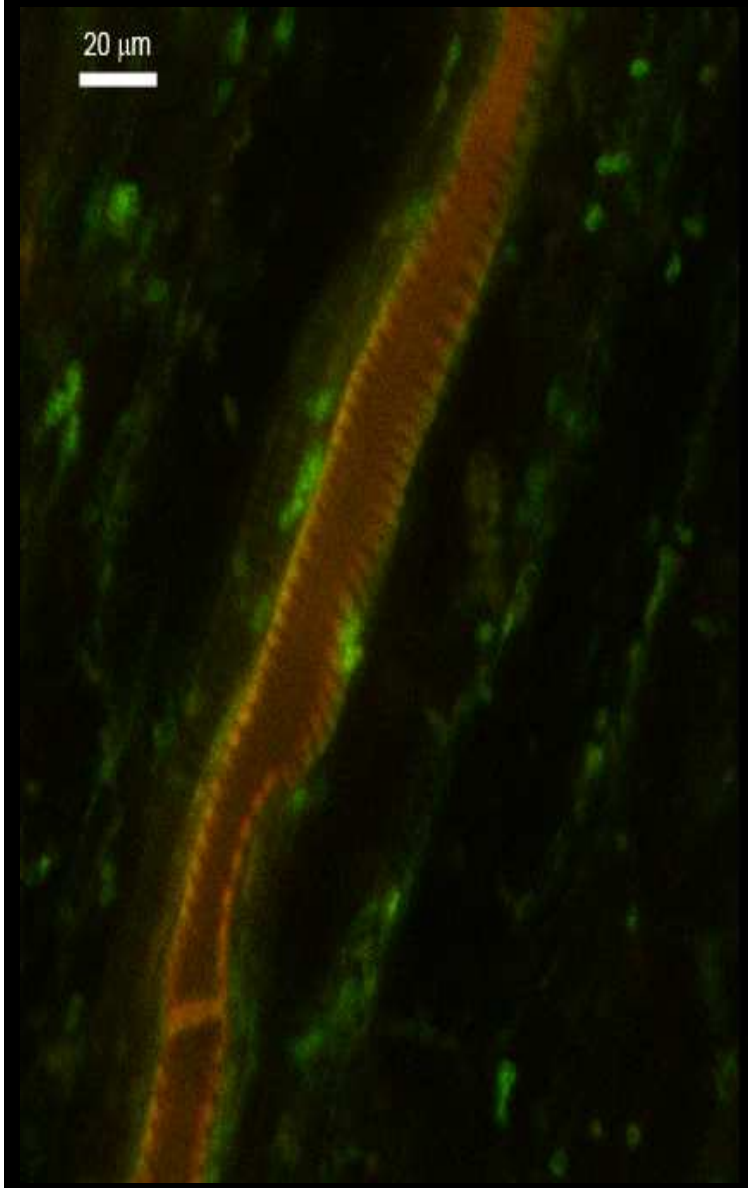
UniBo (Spinelli et al.)





UniBo (Spinelli et al.)


60 µm
10 µm
UniBo (Spinelli et al.)



Come sfrutta queste informazioni?

- Strategie di controllo sui punti di entrata
- Facilitare la selezione per la resistenza
- Prodotti schermo (cioè elicitori)
- Chiarire l'influenza dei fattori ambientali e management culturale

UniBo (Spinelli et al.)

CONCLUSIONI

• PSA può infettare la pianta attraverso gli stomi, I tricomi danneggiati e le cicatrici foliari fresche

•• Le zone di abscissione foliari non sembrano connesse con l'invasione degli altri tessuti della pianta

• kiwi verde e il giallo hanno una diversa struttura della superficie fogliare e potrebbe parzialemnte spiegare la diversa suscettibilità

• Lo stigma e la coppa nettarifera posso ospitare abbondanti popolazioni batteriche. Ciò nonostante il loro ruolo per l'infezione non è ancora del tutto noto.

• Il polline difficilmente ospita sulla sua superficie il patogeno. La PSA si può però ritrovare nel polline aderente ai frammenti di fiore raccolti con il polline

•Polline infettato artificialmente il laboratorio non ha trasmesso la malattia

UniBo (Spinelli et al.)

2°livello: prove in campo sperimentale.
Sarà allestito un campo sperimentale parcellare per testere i prodotti più promettenti sulla base della sperimentazione di 1°livello.
La prova seguirà un protocollo unico concordato e condiviso con le regioni che hanno già allestito campi sperimentali analoghi (Emilia-Romagna, Piemonte e Lazio, **Veneto**). I dati ottenuti saranno così confrontabili valutare la migliore strategia di difesa.

Il decorso dell'infezione verrà seguito sia con test specifici che con test molecolari atti a quantificare la carica batterica nella pianta

Trial plot

Disease preassure

6	7	10	13	1
8	9	4	12	2
7	1	5	11	3
1	12	2	10	4
13	4	11	9	5
11	8	3	8	6
5	6	12	7	7
10	3	13	6	8
12	2	9	5	9
9	11	1	4	10
2	13	6	3	11
4	5	8	2	12
3	10	7	1	13

Infected orchard

Schema del campo sperimentale con 5 ripetizioni di 10 tesi.
Ogni blocco è costituito da 4 piante F e 1 M

Categorie di prodotti da testare

- ❖Rameici
- ❖Disinfettanti
- ❖Induttori di resistenza
- ❖Batteri e Funghi Antagonisti

Strategie:

- ➢Strategie combinate
- ➢Strategie Agronomiche

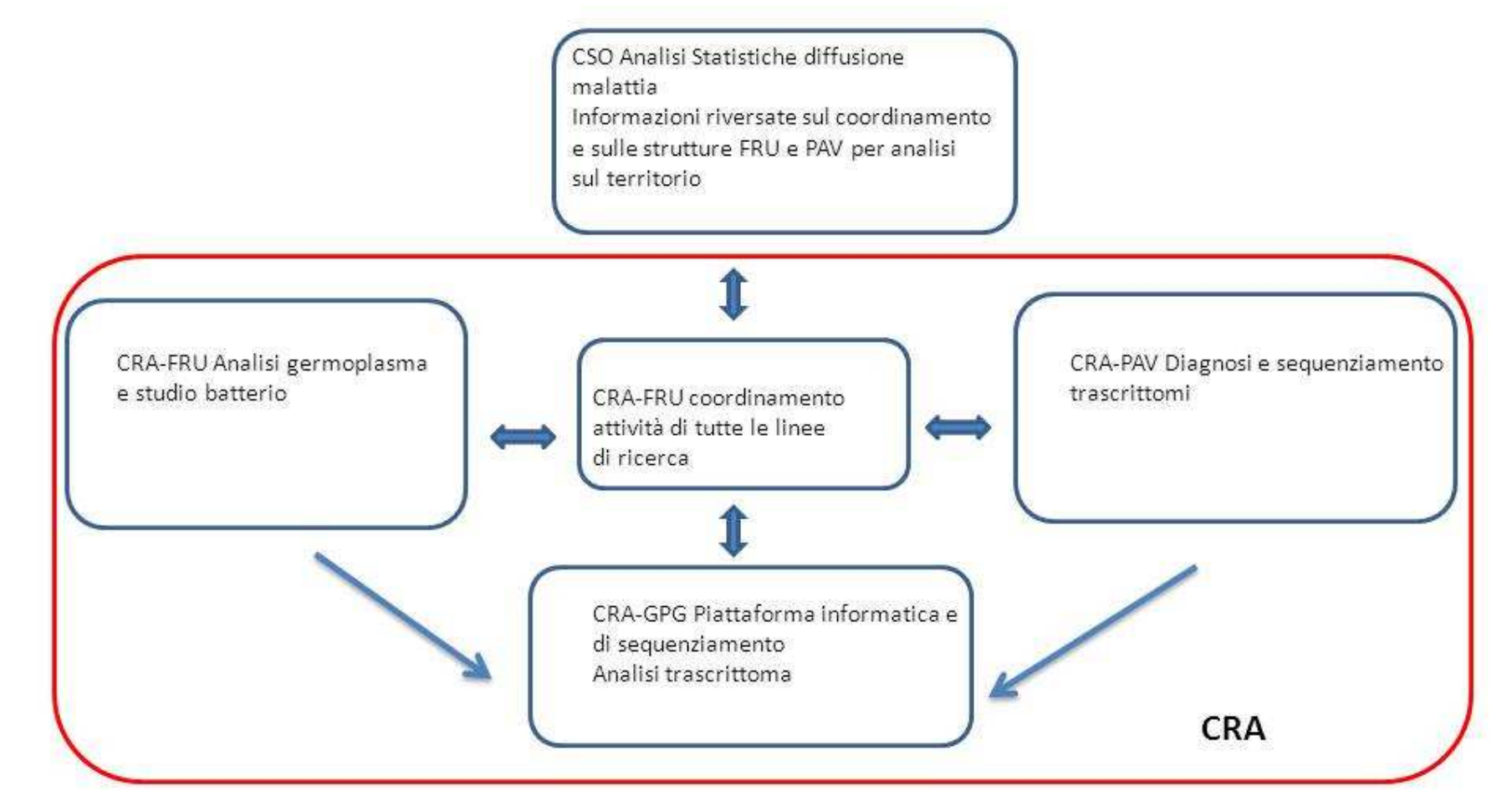
Ricerca applicata 2011 nella lotta al Psa dell'actinidia

1. VERIFICA A BLOCCHI RANDOMIZZATI (PROVA REGIONALE + CRT): 25 TESI CON APPLICAZIONE RIPETUTA DELLO STESSO PRODOTTO (400 piante: nuovo impianto con materiale indenne)
2. PROVA DI STRATEGIE DI DIFESA (CReSO): 3 PROVE A PARCELLONI (nuovi impianti con materiale indenne)
3. PROVE DI STRATEGIA CONCORDATE CON I TECNICI DEL COORDINAMENTO (prove a parcelloni su impianti esistenti)

Il Ministero delle Politiche agricole ha attivato un progetto di ricerca contro il cancro batterico del kiwi (FreshPlaza 13-01-2012)

Il progetto CRA

INTERACT: Interventi di coordinamento ed implementazione alle azioni di ricerca, lotta e difesa al cancro batterico dell'Actinidia (Psa)



Il **progetto INTERACT** si pone come obiettivo generale la messa in opera di una azione di ricerca e sperimentazione ad ampio raggio, per l'ottenimento di risultati a breve, medio e lungo termine, focalizzati su tre obiettivi prioritari:

Coordinare e concretizzare nel minor tempo possibile i risultati attesi dai **progetti in corso**, puntati ad azioni mirate di contenimento e lotta alla batteriosi del kiwi, ed alla **realizzazione di metodi diagnostici** preventivi di varie matrici vegetali, dai materiali di vivaio al polline;

Sviluppare tutte quelle aree della ricerca più avanzata che, traendo vantaggio dalla applicazione delle **tecnologie genomiche**, mira ad ampliare le conoscenze sul binomio pianta-batterio in modo tale da identificare **meccanismi genetici di controllo** della interazione dei due organismi;

Acquisire e caratterizzare, con azioni di **collaborazione internazionale**, fonte di **diversità genetica** del genere Actinidia, per poter ampliare con germoplasma differenziato i programmi di miglioramento genetico della specie.

Altri progetti in atto

“Cancro batterico dell’actinidia (Pseudomonas syringae pv. actinidiae): messa a punto di strategie e difesa”
Coordinamento: CRA-PAV. Ente finanziatore: Regioni Lazio ed Emilia Romagna. Progetto in atto: durata 3 anni (2009-2012). Il progetto affronta i seguenti ambiti di ricerca: messa a punto e validazione di **metodi diagnostici, caratterizzazione molecolare della popolazione di Psa**, studio di alcuni aspetti epidemiologici e individuazione di **strategie di controllo** della malattia.

“Linee di ricerca integrative al progetto triennale cancro batterico dell’actinidia (Pseudomonas syringae pv. actinidiae): messa a punto di strategie di difesa”.
Coordinamento: CRA-PAV. Ente finanziatore: Regione Lazio. Progetto in atto: durata 1 anno (2011). Il presente progetto nasce come integrazione del precedente; nella fattispecie affronta le seguenti aree tematiche: individuazione di strategie di difesa integrata, definizione di **schede descrittive** dei patogeni batterici del kiwi, **metodi diagnostici quantitativi**, verifica **trasmissibilità per polline**, caratterizzazione di **geni coinvolti nella risposta di resistenza** di Actinidia spp., messa a punto di un **sistema di telerilevamento per la mappatura** del cancro batterico, **miglioramento genetico**.

Progetto ACTISANA - Indagine sullo stato fitosanitario del materiale vivaistico di Actinidia spp. nelle principali aree di produzione nazionali.
Coordinamento: CRA-PAV. Ente finanziatore: MIPAAF. Progetto proposto: durata, 2 anni. Col presente progetto si intende effettuare una indagine nei principali vivai di produzione dell’actinidia nazionali al fine di garantire e valutare la qualità, in termini fitosanitari, del materiale vivaistico.

Progetto ACTINIDIA – Azioni di controllo e tecnologicamente innovative nella identificazione di avversità su Actinidia.
Coordinamento: Prof. Balestra – Università degli studi della Tuscia, Dip.to Protezione delle piante. Ente finanziatore: MIPAAF. Sviluppo di **sistemi molecolari di diagnosi qualitativa e quantitativa** rapidi efficienti ed economici per verificare la presenza, anche asintomatica, di tre patogeni batterici su Actinidia: Pseudomonas syringae pv. syringae (PSS); P.viridiflava (PV) e P.s.actinidiae (PSA).

Risultati finora ottenuti (dai progetti già in atto)

1. Linee guida di difesa:CRA (Scortichini), UniTuscia (Prof. Balestra), UniBo (Spinelli)
2. Sequenziamento batterio (Marcelletti et al., 2011)

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* Draft Genomes Comparison Reveal Strain-Specific Features Involved in Adaptation and Virulence to *Actinidia* Species

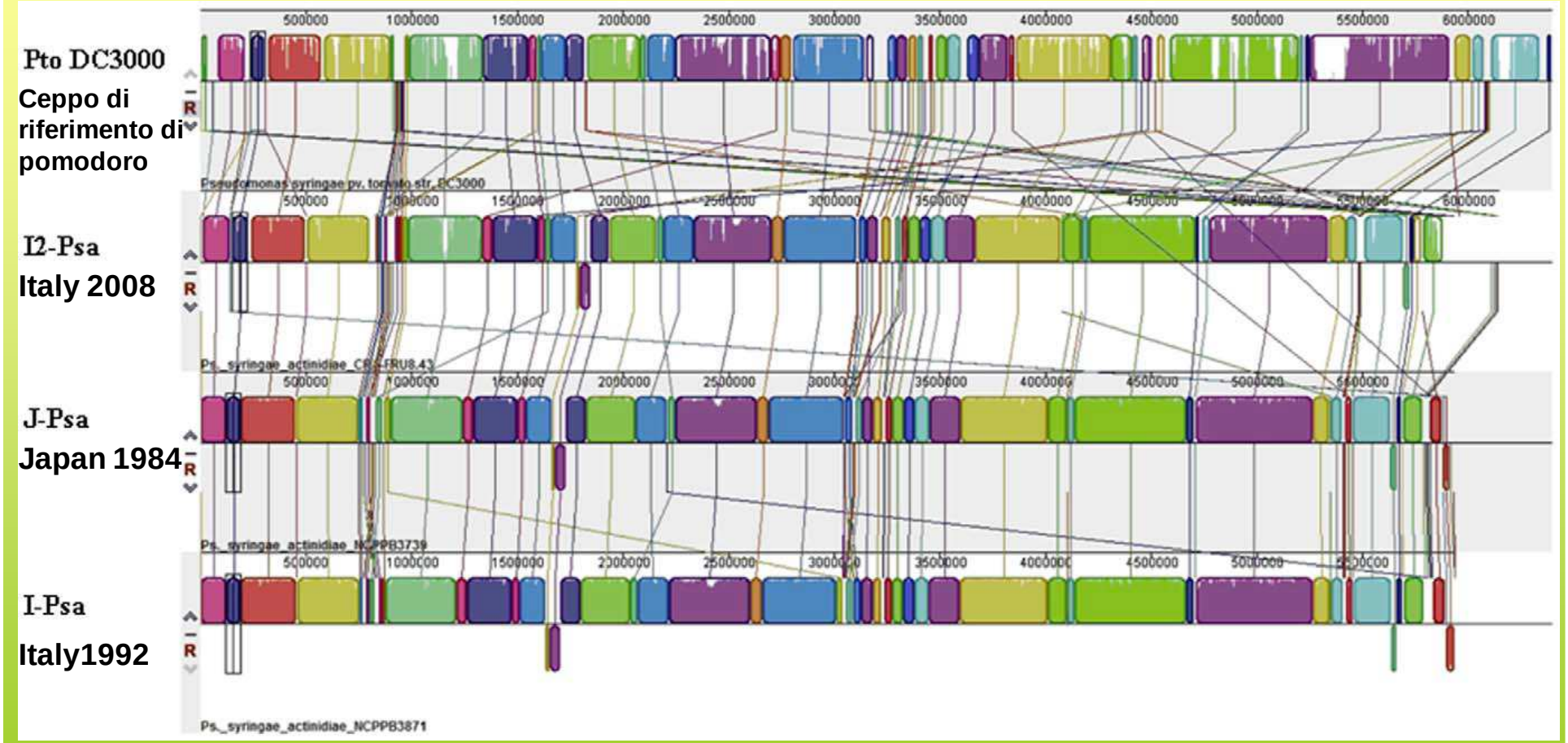
Simone Marcelletti[1], Patrizia Ferrante[1], Milena Petriccione[2], Giuseppe Firrao[3], Marco Scortichini[1]*

1 Research Centre for Fruit Trees, CRA, Roma, Italy, 2 Research Unit for Fruit Trees, CRA, Caserta, Italy, 3 Department of Agricultural and Environmental Sciences, University of Udine, Udine, Italy

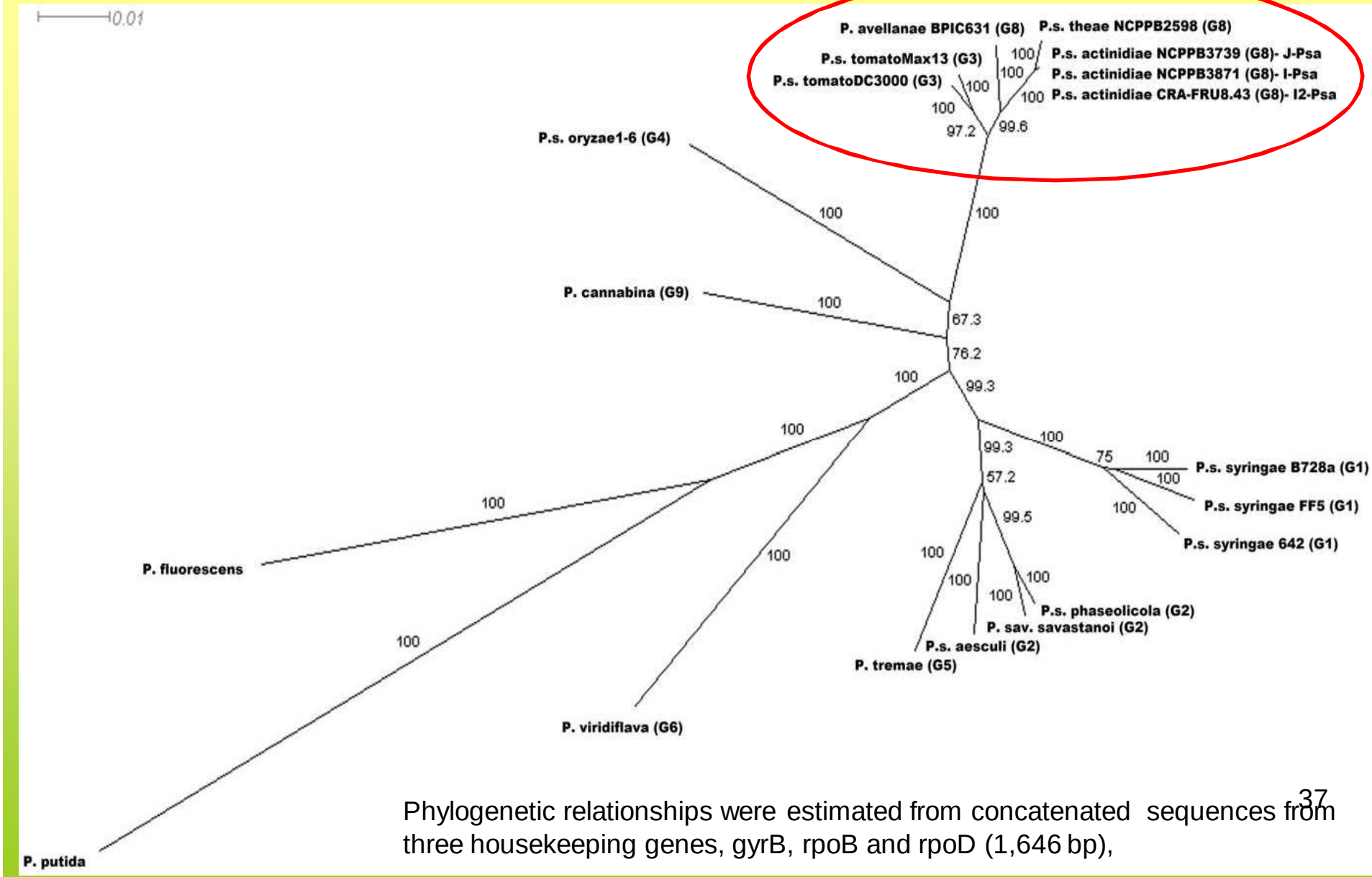
Abstract

A recent re-emerging bacterial canker disease incited by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*) is causing severe economic losses to *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* cultivations in southern Europe, New Zealand, Chile and South Korea. Little is known about the genetic features of this pathovar. We generated genome-wide Illumina sequence data from two *Psa* strains causing outbreaks of bacterial canker on the *A. deliciosa* cv. Hayward in Japan (J-*Psa*, type-strain of the pathovar) and in Italy (I-*Psa*) in 1984 and 1992, respectively as well as from a *Psa* strain (I2-*Psa*) isolated at the beginning of the recent epidemic on *A. chinensis* cv. Hort16A in Italy. All strains were isolated from typical leaf spot symptoms. The phylogenetic relationships revealed that *Psa* is more closely related to *P. s.* pv. *theae* than to *P. avellanae* within genomospecies 8. Comparative genomic analyses revealed both relevant intrapathovar variations and putative pathovar-specific genomic regions in *Psa*. The genomic sequences of J-*Psa* and I-*Psa* were very similar. Conversely, the I2-*Psa* genome encodes four additional effector protein genes, lacks a 50 kb plasmid and the phaseolotoxin gene cluster, *argK-tox* but has acquired a 160 kb plasmid and putative prophage sequences. Several lines of evidence from the analysis of the genome sequences support the hypothesis that this strain did not evolve from the *Psa* population that caused the epidemics in 1984–1992 in Japan and Italy but rather is the product of a recent independent evolution of the pathovar *actinidiae* for infecting *Actinidia* spp. All *Psa* strains share the genetic potential for copper resistance, antibiotic detoxification, high affinity iron acquisition and

Confronto dei genomi (DNA) dei tre isolati di Psa e ceppo di riferimento di pomodoro



(Marcelletti et al., 2011)



Phylogenetic relationships were estimated from concatenated sequences from three housekeeping genes, gyrB, rpoB and rpoD (1,646 bp),

(Marcelletti et al., 2011)

Come è fatto:

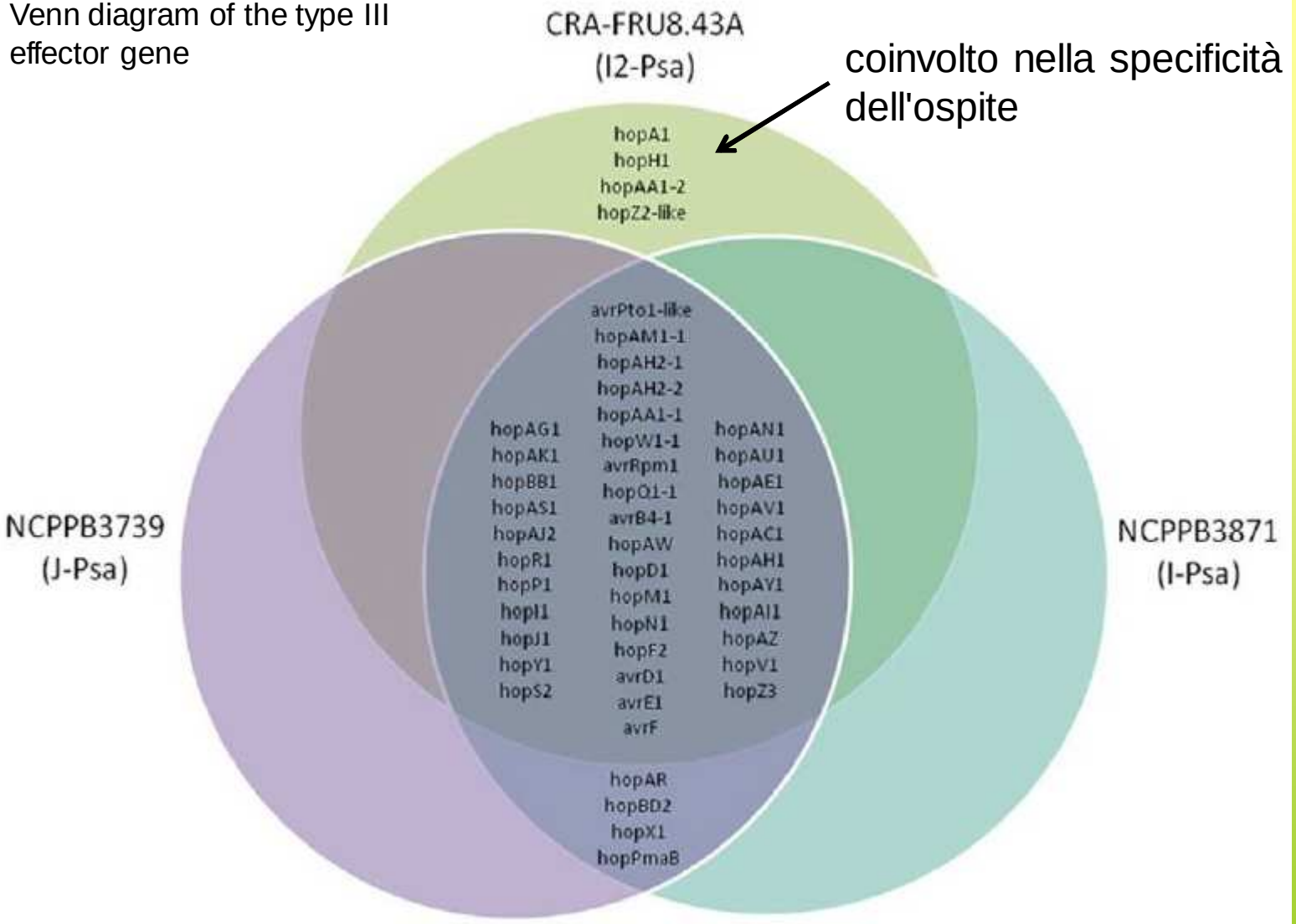
- Psa mostra variazioni genetiche intrapathovar: guadagno e la perdita di regioni genomiche variabili
- I genomi di J-Psa e I-Psa sono simili al 99,75%
- Il genoma di I2-Psa mostra una somiglianza del 88,20% con quelli degli altri due ceppi (è più simile a *P.s. pv thea*)
- Psa non ha i geni per l'utilizzo di saccarosio (come invece *P. s. pv. aesculi* che è floematico). Quindi si muove attraverso lo xilema.

Probabile origine orientale (vicino a *P.s. pv thea*)

Probabile origine in Cina nella zona di evoluzione del genere Actinidia

Forse esistono specie di actinidia selvatica resistente (analisi germoplasma)

Venn diagram of the type III effector gene



coinvolto nella specificità dell'ospite

(Marcelletti et al., 2011)

Le sue armi:

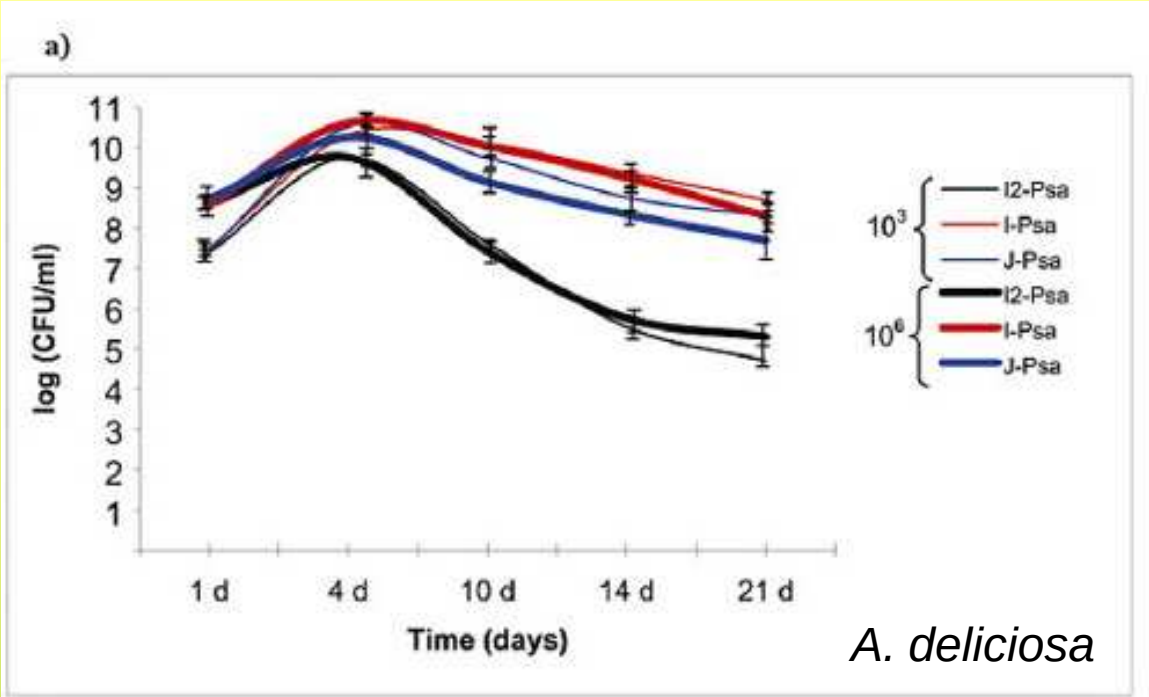
1. Geni coinvolti nel catabolismo di composti aromatici di origine vegetale (che la pianta usa per bloccare i patogeni)
2. Contiene due geni coinvolti nel metabolismo dell'ossido nitrico NO (utilizzato dalla pianta per attivare le sue difese).
3. Contiene 2 geni essenziali per la resistenza al rame (*copA* e *copB*) ma non gli ulteriori 2 geni per la massima resistenza al rame (*copR* e *copS*).
4. Inoltre, tutti i ceppi Psa hanno una vasta serie di geni coinvolti nella resistenza agli antibiotici.

Non usare rame troppo spesso
MAI usare antibiotici: si creerebbero subito ceppi resistenti

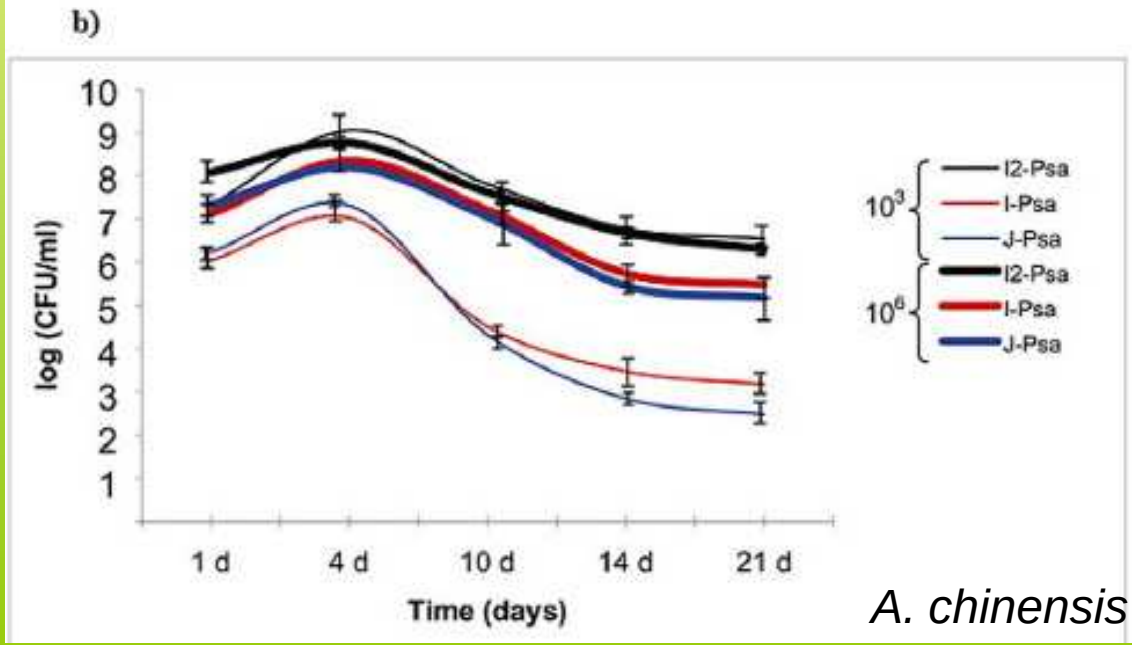
Vedi anche Informatore Agrario n°2 2012 pag. 72

I-Psa e J-Psa attaccavano preferenzialmente *A. deliciosa* e meno *A. chinensis.*

I2-Psa ha la stessa virulenza verso *A. deliciosa e A. chinensis*



A. deliciosa



A. chinensis

(Marcelletti et al., 2011)

24 al 26 maggio del 2012 a Latina organizzato dalla SOI (Società di Ortoflorofrutticoltura Italiana),
Coordinatore Comitato Organizzatore Dr. Agr. Ottavio Cacioppo

CONVEGNO NAZIONALE

SULLA BATTERIOSI DELL'ACTINIDIA

PROGRAMMA PROVVISORIO:

Sessione I:

- Introduzione (batteriosi in Italia, con particolare riferimento all'Agro Pontino);
- Caratteristiche genetiche dei batteri e meccanismi d'infezione;
- Condizioni ambientali che favoriscono la patogenicità;
- Aspetti agronomici per la prevenzione e la lotta.

Sessione II:

- L'operato dei Servizi di Fitopatologia regionali e di altri enti;

Sessione III:

- Ricerca scientifica in Italia: risultati conseguiti e attesi.

Sessione IV:

- Ricerca scientifica all'Estero: risultati conseguiti e attesi.

Visite tecniche ad aziende actinidicole colpite dalle batteriosi

Ringraziamenti:

Marco Scortichini - Unità di Ricerca per la Frutticoltura di Caserta (*CRA*-FRC)
marco.scortichini@entecra.it

Francesco Spinelli - Università di Bologna, Dipartimento di Colture Arboree, viale Fanin 46 - 40127, Bologna, Italy.
francesco.spinelli3@unibo.it

Graziano Vittone - *CReSO*, Centro Ricerche per la frutticoltura - Via Falicetto, 24 - 12030 *Manta*

PhD Tacconi Gianni

CRA-GPG Centro di Ricerche per la Genomica e la Postgenomica Animale e Vegetale
CRA-GPG Genomic Research Center
Via S. Protaso, 302, CAP I-29017 Fiorenzuola d'Arda,Piacenza, Italy
centrodigenomica**.entecra.**it/
www.entecra.it
email: gianni.tacconi@entecra.it
tel. 0039 0523 983758
fax. 0039 0523 983750