

Figura 2 - Indice di malattia e produzione di *Alternaria* tossine su basilico da parte di diversi isolati.

Figure 2 - Disease severity and *Alternaria* toxin production on artificial inoculated basil by different isolates.

basata su 8 regioni geniche: elongation factor 1- α , (Fig.1) β -tubulina, endopoligalatturonidasi, il principale *Alternaria* antigene AltA1, Large SubUnit (LSU), il gene della melanina reductasi e due regioni non codificanti, OPA 10.2 e OPA 1.3, specifiche per *Alternaria* sect. *alternata*. I diversi alberi ottenuti mostrano differenze nella suddivisione degli isolati e hanno anche mostrato una capacità risolutiva diversa. La maggiore parte dei campioni sono stati identificati come *Alternaria* sect. *alternata*, mentre altri campioni appartengono alle sezioni *panax* e *porri*; tre campioni risultano essere appartenenti a specie filogeneticamente vicine al genere *Alternaria*.

Le principali micotossine prodotte da specie del genere *Alternaria* sono alternariolo (AOH), alternariolo monometilere (AME), altenuene (ALT), altertossina I e II (ATX-I e ATX-II), acido tenuazonico (TeA) e la tentossina (TTX). In questo lavoro è stata saggiata mediante HPLC-MS/MS la capacità produttiva di cinque tra le principali micotossine (TeA, AOH, AME, TTX e ATX-I) da parte di 21 ceppi del genere *Alternaria* inoculati *in vitro* su terreno induttivo (terreno Czapek-Dox modificato) e *in vivo* su basilico. Per tutti i ceppi è stato inoltre valutato l'indice di malattia. (Fig.2). Vista la difficoltà di differenziazione delle diverse specie, i campioni sono stati posti a sviluppare su terreno induttivo in modo da poterne poi analizzare il profilo metabolico completo. La concatenazione dei geni e il confronto con le analisi dei metaboliti potrebbe permettere di ottenere una più chiara identificazione dei campioni.

Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato svolto con un contributo del progetto EMPHASIS "Effective Management of Pests and Harmful Alien Species-Integrated Solutions" finanziato da European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant No. 634179).

Lavori citati

ANDERSEN, B.; FRISVAD, J.C. (2002) - Characterization of *Alternaria* and *Penicillium* species from similar substrata based on growth at different temperature, pH and water activity. *Systematic and Applied Microbiology*. 25, 162-172.
LAWRENCE, D.P.; ROTONDO, F.; GANNIBAL, P.B. (2016) - Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress*. 15, 3.

Sviluppo di LAMP per l'identificazione di *Fusarium fujikuroi* su semi di riso

Sara Franco Ortega* - Davide Spadaro**,* - Maria Lodovica Gullino**,* - Angelo Garibaldi*

*Centro di competenza per l'Innovazione in campo agro-ambientale AGROINNOVA - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

**Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali ed Alimentari DISAFA - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

Il genere *Fusarium* è agente causale di importanti malattie su varie colture. *Fusarium fujikuroi*, principale responsabile della malattia nota come bakanae nel riso, appartiene al *Gibberella fujikuroi* species complex (GFSC), nel quale sono inclusi anche *F. graminearum*, *F. commune*, *F. andiyazi*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* e *F. equiseti* (O'Donnell *et al.*, 1998).

L'identificazione di *F. fujikuroi* da seme di riso permetterebbe un migliore contenimento della malattia e una prevenzione efficace della stessa, evitandone la diffusione. Diverse tecniche, come la PCR e la Taqman Real Time PCR (Amatulli *et al.*, 2010), basate sull'amplificazione del DNA, sono state utilizzate per il rivelamento del patogeno sul riso. La LAMP PCR (Loop-mediated isothermal amplification) si è dimostrata una tecnica efficace nella diagnosi, grazie alla sua alta specificità, sensibilità, semplicità e velocità, (Notomi *et al.*, 2000) permettendo l'amplificazione, anche di poche copie di DNA, in meno di un'ora. Per l'amplificazione sono necessari 6 primer (F3, B3, loopF, loopB, FIP and BIP) progettati su otto regioni del gene o della regione genica scelta. I risultati dell'analisi possono essere visualizzati mediante gel di agarosio o utilizzando tecniche come turbidimetria, colorimetria o real time che necessitano però dell'utilizzo di strumenti specifici. Esistono anche strumenti portatili (Genie II/GenieIII) che permettono il monitoraggio del patogeno direttamente in campo.

La LAMP sviluppata per l'identificazione di *F. fujikuroi* è stata progettata sul gene elongation factor 1- α (EF-1 α) (Fig.1 e 2) coprendo 398 paia di basi e utilizzando una delezione di 6 nucleotidi presente solo in *F. fujikuroi* e non nelle altre specie appartenenti al GFSC.

Tutte le specie che fanno parte del GFSC sono state usate per validare la specificità della LAMP ottimizzata, ottenendo amplificazione positiva solo per i campioni di *F. fujikuroi*. La sensibilità è stata valutata utilizzando diluzioni seriali di DNA del fungo target; il limite di determinazione ottenuto è 0,865 pg/ μ l.

Ulteriori analisi effettuate mediante LAMP verranno effettuate su semi naturalmente infetti da *F. fujikuroi* per valutare l'efficacia del metodo. La LAMP, per l'identificazione di *F. fujikuroi*, potrà essere utilizzata per il rilevamento precoce del patogeno per cercare di evitare la sua diffusione in campo.

Ringraziamenti

Lavoro svolto nell'ambito del programma Horizon 2020 UE, No 634179 "Effective Management of Pests and Harmful Alien Species - Integrated Solutions" (EMPHASIS).

Lavori citati

AMATULLI M. T., SPADARO D., GULLINO M.L., GARIBALDI A. (2010). Molecular identification of *fusarium* spp. Associated with bakanae disease of rice in Italy and assessment of their

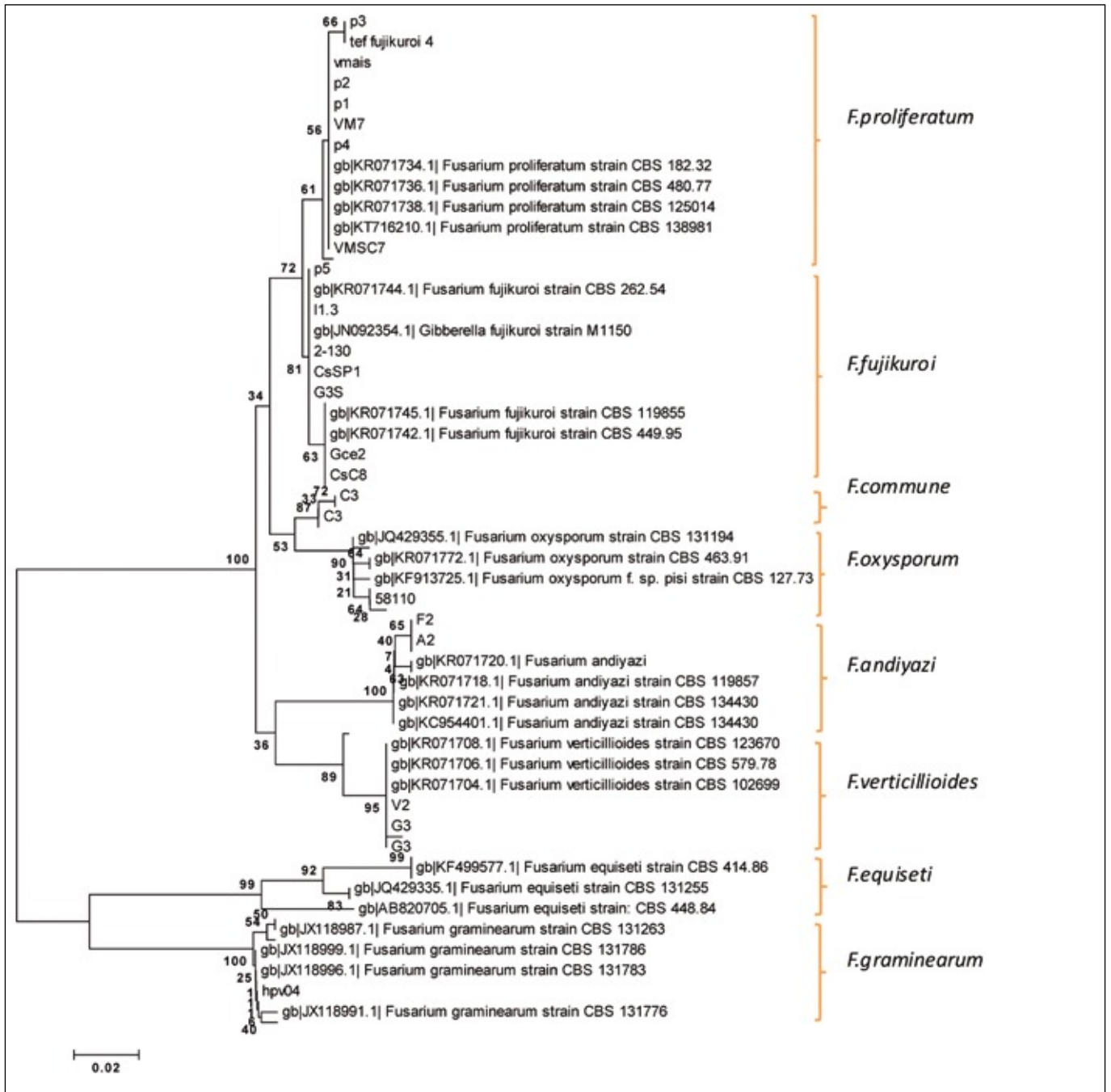
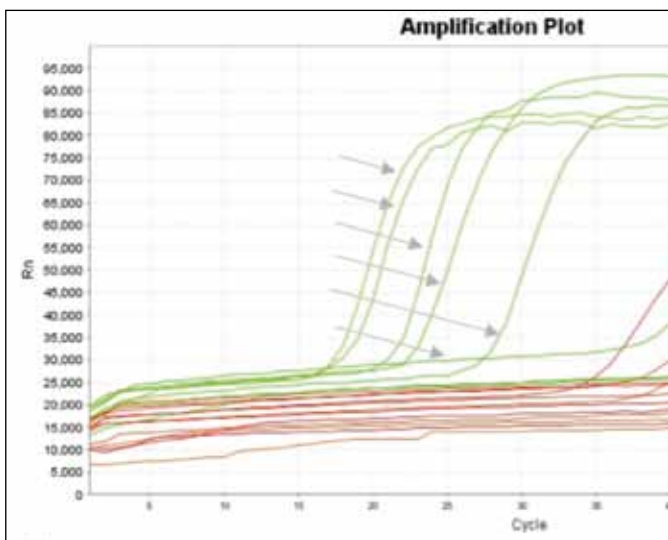


Figura 1 - Analisi (Neighbor-joining) della relazione filogenetica basata sul gene elongation factor 1- α (EF-1 α) di funghi appartenenti al *Gibberella fujikuroi* species complex.

Figure 1 - Neighbor-joining tree of the elongation factor 1- α (EF-1 α) gene showing the phylogenetic relationship of the species within *Gibberella fujikuroi* species complex.



pathogenicity. *Plant pathology*. 59, 839–844.
 NOTOMI T., OKAYAMA H., MASUBUCHI H., YONEKAWA T., WATANABE K., AMINO N., HASE T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of dna. *Nucleic acids research*. 28,e63.

O'DONNELL K., CIGELNIK E., NIRENBERG H.I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *gibberella fujikuroi* Specie Complex. *Mycologia*. 90. 465-493.

Figura 2 - LAMP sviluppata per l'identificazione di *F. fujikuroi*. I primers sono stati progettati sul gene elongation factor 1- α (EF-1 α) coprendo 398 paia di basi e utilizzando una delezione di 6 nucleotidi presente solo in *F. fujikuroi* e non nelle altre specie appartenenti al GFSC.

Figure 2 - LAMP carried out by Real Time PCR, for the detection of *F. fujikuroi*. Primers were designed based on elongation factor 1-alpha gene.