# Sviluppo di q-PCR per *Venturia inaequalis* su melo

**Simona Prencipe*,** - Maria Lodovica Gullino*,** - Angelo Garibaldi*- Davide Spadaro*,****

**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 melo (*Malus* x *domestica*) è una delle più importanti colture da frutto in paesi con clima temperato. Una delle principali malattie del melo è causata dall'ascomicete eterotallico *Venturia inaequalis* (Wint Cooke) agente causale della ticchiolatura, responsabile di ingenti perdite economiche. La malattia viene gestita principalmente mediante applicazione di fungicidi e impiego di cultivar resistenti.
Quest'ultima basata su programmi di incrocio risulta di particolare importanza, così come la valutazione della gravità dei sintomi osservata. L'utilizzo di scale qualitative ha però alcuni limiti tra cui la soggettività nell'assegnazione visiva degli indici di gravità, l'erronea valutazione dei sintomi in campo e la loro mancata assegnazione per ritardo nello sviluppo della malattia, come può accadere nel caso di utilizzo di fungicidi. Inoltre, le lesioni possono svilupparsi in tempi differenti in funzione dell'età della foglia (Schwabe, 1979) oppure tessuti apparentemente sani potrebbero essere fonte di inoculo per l'infezione primaria della successiva primavera (Li e Xu, 2002). L'utilizzo di metodi molecolari, tra cui la reazione a catena polimerasi in tempo reale (RT-PCR), risulta essere un metodo diagnostico importante per la quantificazione, il rilevamento dei patogeni e l'approfondimento delle dinamiche di crescita utili per la gestione della malattia (Schena *et al*., 2004).
Lo scopo di questo lavoro è stato quello di sviluppare una PCR quantitativa specifica per *V. inaequalis* ( Fig. 1) in grado di discriminare questo patogeno da altre specie filogeneticamente vicine e da altri patogeni su melo, e di permetterne il rilevamento a basse concentrazioni. Il multi-allineamento di sequenze del gene per il fattore di allungamento trascrizionale (tef 1-alpha) ha mostrato una delezione di 31 nucleotidi presente nella sola specie *V. inaequalis*. Tale regione è stata scelta per sviluppare la PCR quantitativa per la diagnosi di questo patogeno. La specificità della tecnica è stata confermata su DNA genomico di altre specie di *Venturia*, *V. carpophila*, *V. pirina*, *V. nashicola*, *V. asperata* e *V. cerasi*, quest'ultima recentemente segnalata in Italia su melo. Sono state inoltre analizzate nel saggio di specificità altre specie patogene su melo e patogeni comunemente presenti in campo come *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum fioriniae*, *Penicillium expansum*, *Cladosporium cladosporioidies*, *Botryosphaeria dothidea* e *Alternaria alternata*. Tale tecnica è stata anche applicata per il rilevamento di *V. inaequalis* su campioni di foglie ticchiolate e di mele con sintomi di ticchiolatura da magazzino, confermando la specificità di amplificazione. Nessuna amplificazione è stata ottenuta nei saggi con DNA totale estratto da campioni sani di foglie e mele. La sensibilità della tecnica è stata determinata mediante la costruzione di una retta di taratura stabilendo il limite di rilevamento a 2 femtogrammi.

**Ringraziamenti**
*Lavoro svolto con il contributo del progetto "FRUITSENSOR- Tecnologie convergenti per una frutticultura di precisione sostenibile", finanziato da Cassa di Risparmio di Cuneo.*

**Lavori citati**
Li B., Xu X. (2002) - Infection and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) in old leaves. Journal of Phytopathology, 150, 687-691.
Schena L., Nigro F., Ippolito A., Gallitelli D. (2004) - Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. European Journal of Plant Pathology, 110, 893-908.
Schwabe W. F. S. (1979) - Change in scab susceptibility of apple leaves as influenced by age. Phytophylactica, 11, 53-56.

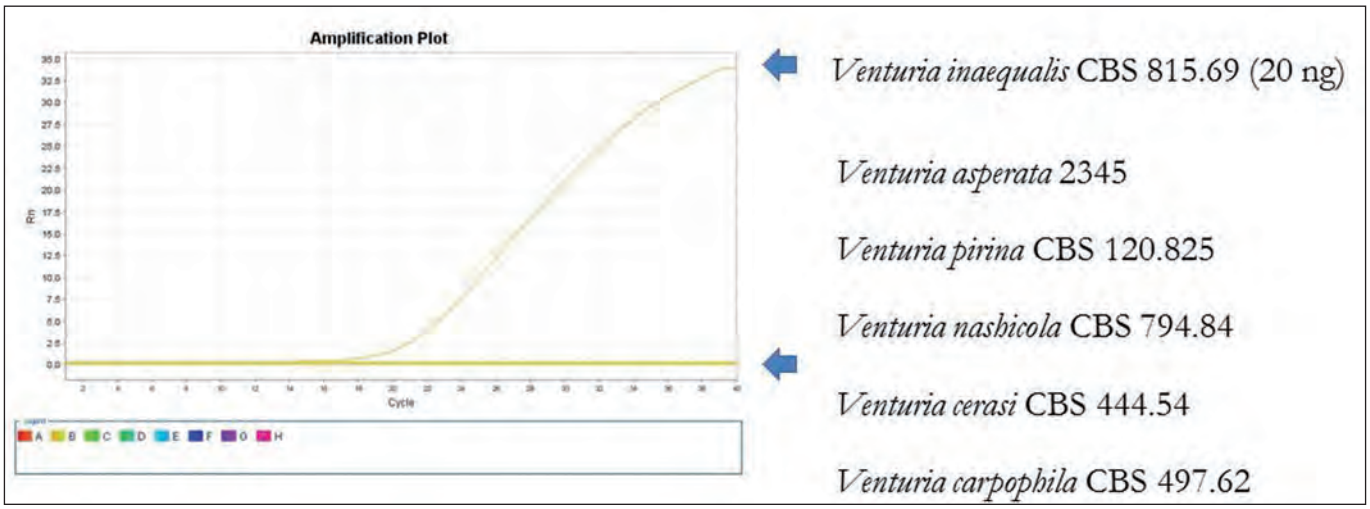


Figura 1 - Amplificazione ottenuta tramite PCR quantitativa con utilizzo di Sybr-Green. La specificità della tecnica ha permesso il rilevamento della sola specie *Venturia inaequalis* e nessuna amplificazione per le altre specie di *Venturia* saggiate.
*Figure 1 – Amplification plot obtained by quantitative PCR with Sybr-Green. The technique specificity permitted to detect only* Venturia inaequalis *species. No amplifications was obtained for other tested* Venturia *species.*