

DIAGNOSI MOLECOLARE DI *PERONOSPORA DESTRUCTOR* IN PIANTE DI CIPOLLA

Valeria Mancini, Sergio Murolo, Gianfranco Romanazzi

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche
Via Breccie Bianche, I-60131 Ancona - E-mail: g.romanazzi@univpm.it

La peronospora della cipolla, causata da *Peronospora destructor* Berk. (Casp.), è una delle più gravi malattie della cipolla, su cui provoca notevoli perdite di produzione (Schwartz e Mohan, 2008). L'identificazione del patogeno e la conoscenza del suo ciclo biologico sono di fondamentale importanza per trovare nuove e più efficaci strategie nel controllo della malattia. La determinazione univoca dell'agente causale è fondamentale nella pianificazione di un'adeguata e precoce strategia di controllo, senza attendere la comparsa dei primi sintomi. Essendo un parassita obbligato, *P. destructor* può sopravvivere solo sui tessuti dell'ospite, quindi per l'identificazione non possono essere impiegati metodi di diagnosi tradizionali. I metodi diagnostici molecolari forniscono risultati in tempi rapidi, aspetto importante nel caso in cui vadano prese misure di controllo; inoltre la loro maggiore sensibilità permette di effettuare una diagnosi precoce della malattia, in modo da intervenire tempestivamente con l'applicazione di agrofarmaci.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di mettere a punto un protocollo di diagnosi per l'identificazione molecolare di *P. destructor* in tessuti di cipolla

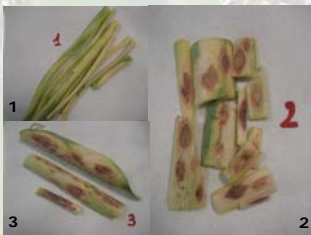
MATERIALI E METODI

Campionamento di foglie, gambi (sintomatici e asintomatici) e bulbi (asintomatici) di cipolla da campi sperimentali e vivai



Sintomi su foglie e gambi

- 1 clorosi
- 2 necrosi circoscritta
- 3 necrosi estesa



Estrazione del DNA



Amplificazione del DNA

- ✓ primer generici ITS3F/ITS4R;
- ✓ primer specifici PdesF1/PdesR1 (disegnati sulla regione ITS2 della sequenza di *P. destructor*).

RISULTATI

In seguito ad amplificazione del DNA con i primer generici ITS3F/ITS4R e ad elettroforesi su gel d'agarosio, sono state visualizzate due bande: una da 450 bp relativa a cipolla e una pari a 610 bp corrispondente a *P. destructor*, quest'ultima è risultata presente in alcuni campioni di foglie e gambi sintomatici. I campioni risultati infetti da *P. destructor* mostravano tutte le tipologie sintomatiche: clorosi, necrosi circoscritte ed estese sui tessuti. Dai campioni asintomatici di foglie, gambi e bulbi non è risultata la presenza di ampliconi corrispondenti a *P. destructor* (Fig.1).

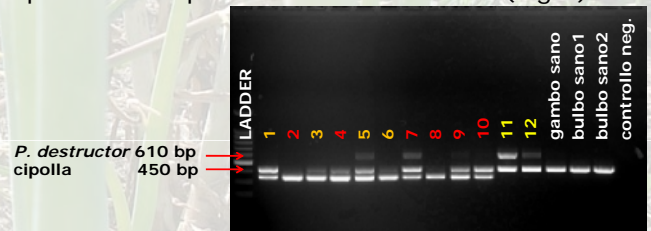


Fig.1 Frammenti amplificati dalla coppia di primer ITS3F/ITS4R. I campioni 5, 7, 9, 11, 12 mostrano bande specifiche di *P. destructor* (610 bp) e relative a cipolla (450 bp). I campioni di gambi 11, 12 presentano sintomi della tipologia 1, i campioni 2, 4, 7, 8, 9, 10 sintomi della tipologia 2 e i campioni 1, 3, 5, 6 sintomi della tipologia 3. Il gambo e i bulbi asintomatici sono risultati negativi così come il controllo negativo.

In seguito ad amplificazione con i primer specifici PdesF1/PdesR1 è stata visualizzata una banda da 412 bp sia in campioni di foglie e gambi sintomatici (Fig.2a) che in campioni di foglie, gambi e bulbi asintomatici (Fig.2b).

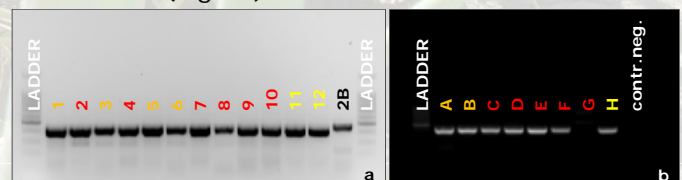


Fig.2 Frammenti amplificati dalla coppia di primer PdesF1/PdesR1. (a) Tutti i campioni sintomatici sono risultati positivi a *P. destructor* (banda specifica di 412 bp). I campioni di gambi 11, 12 presentano sintomi della tipologia 1, i campioni 2, 4, 7, 8, 9, 10 sintomi della tipologia 2 e i campioni 1, 3, 5, 6 sintomi della tipologia 3. Il campione 2B è un controllo positivo. (b) I campioni asintomatici di foglie (A, B), gambi (C, D, E, F) e bulbi (H) sono risultati positivi a *P. destructor*.

CONCLUSIONI

La PCR eseguita con entrambe le coppie di primer è stata efficace nell'individuare la presenza di *P. destructor* in tessuti sintomatici di cipolla. Il livello di specificità e sensibilità delle coppie di primer va confermato in ulteriori prove.

LAVORI CITATI

DOYLE J.J., J.L. DOYLE, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**, 13-15.

SARACCHI M., S. QUARONI, S. OSTI, 2000. Studies on molecular probes for *Peronospora destructor* detection. In: Proceedings of the 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology, 134-137.

SCHWARTZ H.F., S.K. MOHAN, 2008. Compendium of Onion and Garlic Diseases and Pests, 2nd Ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota pp.127.