



La peronospora del girasole: identificazione delle razze presenti in Italia

Luisa M. Manici
CREA
Centro Ricerca Agricoltura e Ambiente - Bologna
Via di Corticella 133 Bologna
luisamaria.manici@crea.gov.it

Le aspettative per la coltura del girasole, tra sperimentazione, mercato e industria
Fermo, 19 Febbraio 2016

Organizzazione della presentazione

1. Introduzione e stato dell'arte su *Plasmopara halstedii*
2. Evoluzione delle razze di peronospora del girasole e situazione ad oggi in Europa
3. Prospettive di sviluppo delle studio su peronospora in Italia



Fermo, 19 febbraio 2016

2

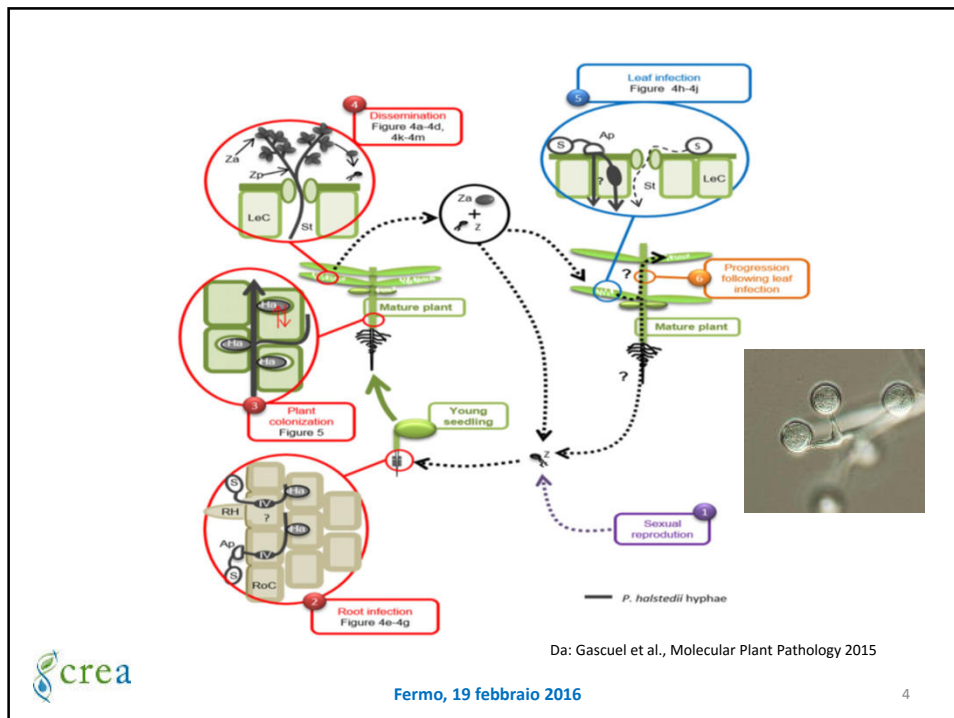
Breve introduzione sul patogeno

- *Plasmopara halstedii* è un parassita obbligato sotto controllo oligogenico. Questo dà la possibilità di controllare il patogeno con varietà resistenti ma implica il problema della evoluzione del patogeno chiamata «**Gene-for-Gene coevolution between plants and parasites**» ovvero:
- Il superamento della resistenza varietale da parte del patogeno con un'evoluzione tanto più rapida quanti più genotipi con geni specifici di resistenza vengono inseriti nell'ambiente.
- Nei patogeni obbligati (biotrofi) esiste la difficoltà pratica di identificazione delle razze in quanto l'unico modo è l'inoculo su differenziali *in vivo*. Pertanto, il monitoraggio del patogeno in funzione anche della applicazione di quarantena e della prevenzione nella sua diffusione attraverso il seme sono difficoltose e non vengono svolte sistematicamente.
- *P. halstedii* ha una grande capacità di adattabilità agli agro-ambienti, infatti ha sviluppato resistenza a *metaxyl* riportata in Europa centrale già nel 1992, che ne ha ridotto la possibilità di controllo con un incremento della pressione attraverso l'immissione di nuovi genotipi resistenti.



Fermo, 19 febbraio 2016

3



Fermo, 19 febbraio 2016

4

Riduzione di accrescimento e sporificazione da infezione primaria sistemica



Sintomi da infezione secondaria delle foglie



Da Dr. M.R Harveson, University of Nebraska
<http://extensionpublications.unl.edu/assets/pdf/g2075.pdf>



Fermo, 19 febbraio 2016

5

Storia e status attuale

- Identificata nel Nord America nel 1922, *P. halstedii* è stata rilevata in Francia nel 1966 per la prima volta e un aumento drammatico del numero di razze è stato osservato negli anni successivi.
- Fino al 1980 erano conosciute 2 razze di *P. halstedii*
- Dal 1980 al 1998 il numero di razze è aumentato, ma le linee differenziali erano spesso diverse e di conseguenza la classificazione delle razze non era omogenea
- Nel 1998 è stato definito un sistema di nomenclatura internazionale per le razze di *P. halstedii* (Gulya, et al. 1998) che da allora è stato adottato e continua ad essere seguito:
 - Definizione delle differenziali e delle loro caratteristiche (definite 9 differenziali da USDA e INRA)
 - Definizione della metodologia di infezione
 - Reazione delle linee differenziali a infezione con peronospora
 - Definizione delle razze di peronospora basata sulle triplette

Gulya, T.J., et al., Proposal for the standardized nomenclature and identification of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In: Sunflower Downy Mildew Symposium, vol. Proc. of Sunflower Downy Mildew Symposium, Fargo, North Dakota, USA, 1998, pp. 130–136.



Fermo 19 febbraio 2016

6

Reazione a infezione di peronospora

- Subito dopo (anni 2000) sono stati definiti 2 tipi di resistenza alla peronospora sono stati, entrambi conferiti da geni *PI* girasole
 - tipo I è caratterizzato dall'assenza di sintomi sulla parte aerea della pianta, rimane localizzato nelle radici con una **reazione di tipo necrotico, il patogeno non passa sopra la base dell'ipocotile;**
 - tipo II è caratterizzata da sintomi deboli sporulazione limitata a cotiledoni, l'assenza di sintomi nella parte superiore della pianta in cui **il patogeno non raggiunge mai le foglie vere.**
- I geni *PI* conferiscono la resistenza a 1 o più patotipi di *H. halstedii*. Più di 20 geni *PI* sono stati descritti, essi sono utilizzati fino ad ora per proteggere le nuove varietà di girasole, ma alcune di queste resistenze sono state superate; sono comparsi isolati di peronospora con nuove virulenze.



Fermo, 19 febbraio 2016

7

Caratterizzazione delle razze sulla base delle triplette

Table 1

Virulence profiles of 14 *P. halstedii* races on nine sunflower hosts with differential genetic resistance. S indicates host susceptible to race in column one and R indicates resistance. Races underlined are endemic in France.

Host	Virulence profile on sunflower differential hosts								
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Score	1	2	4	1	2	4	1	2	4
Races									
100	S	R	R	R	R	R	R	R	R
300	S	S	R	R	R	R	R	R	R
<u>304</u>	S	S	R	R	R	R	R	R	S
<u>307</u>	1+2+0=3	R		1+0+0=1	R		0+0+4=4		S
<u>314</u>	S	S	R	S	R	R	R	R	S
<u>334</u>	S	S	R	S	S	R	R	R	S
700	S	S	S	R	R	R	R	R	R
703	S	S	S	R	R	R	S	S	R
704	S	S	S	R	R	R	R	R	S
707	S	S	S	R	R	R	S	S	S
710	S	S	S	S	R	R	R	R	R
<u>714</u>	S	S	S	S	R	R	R	R	S
717	S	S	S	S	R	R	S	S	S
730	S	S	S	S	S	R	R	R	R

Da : S. Ahmed et al. / Fungal Genetics and Biology 49 (2012) 847–855



Fermo, 19 febbraio 2016

8

Organizzazione della presentazione

1. Introduzione e stato dell'arte su *Plasmopara halstedii*
2. Evoluzione delle razze di peronospora del girasole e situazione ad oggi in Europa
3. Prospettive di sviluppo delle studio su peronospora in Italia



Fermo, 19 febbraio 2016

9

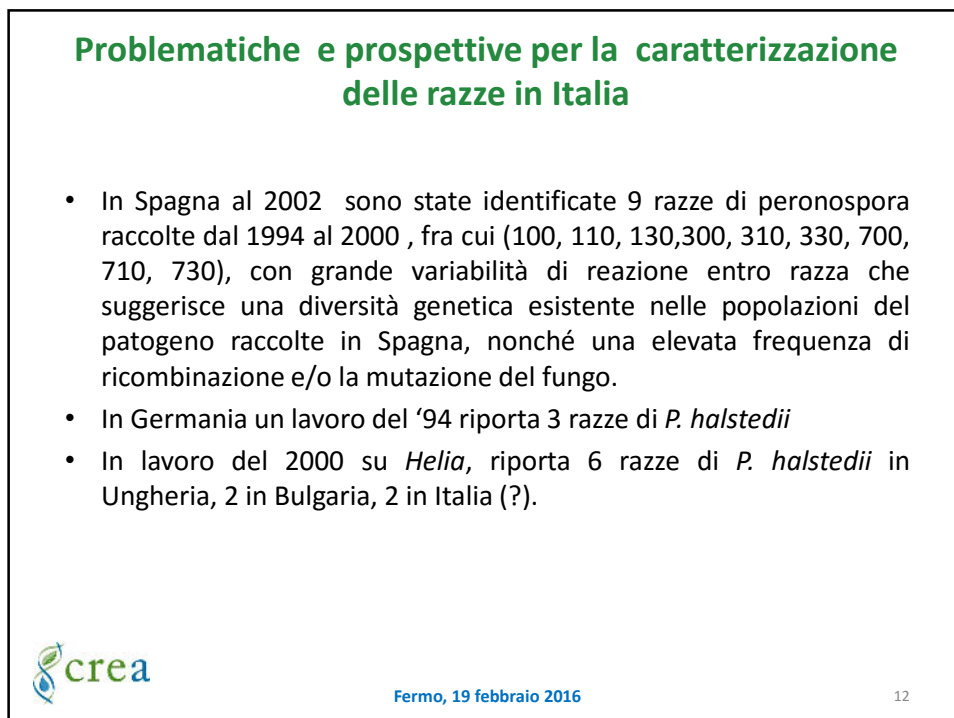
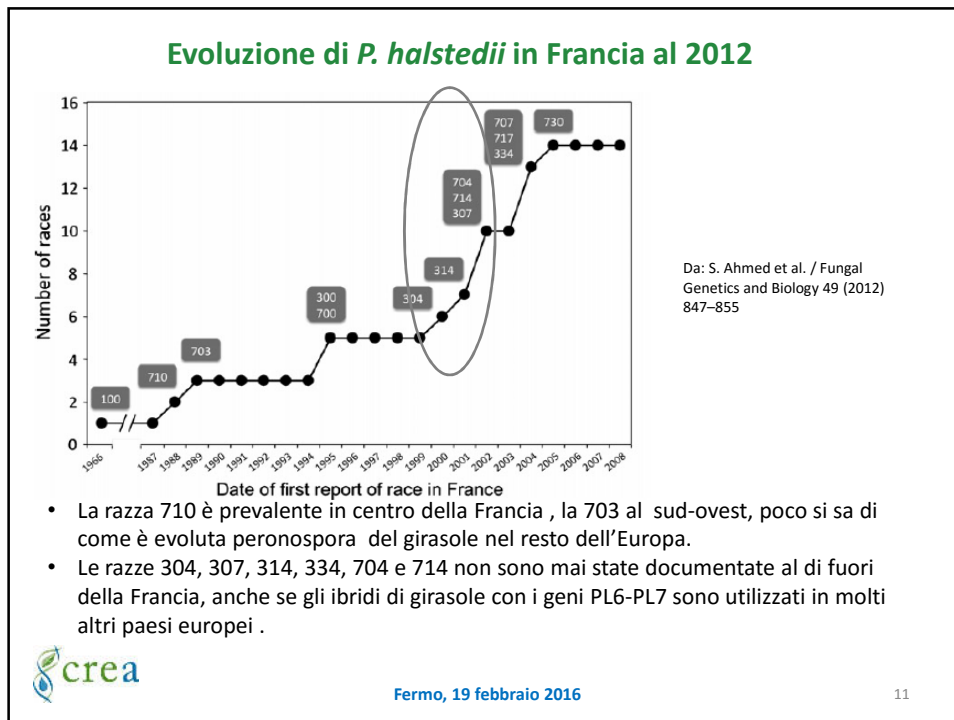
Situazione ad oggi in Francia

- 17 razze note: alle 15 razze definite con le triplette classiche, si aggiungono due patotipi di *P. halstedii* che mostrano nuovi profili di virulenza e sono stati registrati più di recente.
- Essi sono stati differenziati con l'aggiunta di sei ulteriori linee di girasole (**304 30** e **774 73**), estendendo la nomenclatura patotipo a codice a cinque triplette (Tourvieille de Labrouhe et al., 2012) . L'aggiunta di questi sei differenziali è stato anche un approccio finalizzato a migliorare la distinzione di patotipi emergenti, secondo INRA.
- Secondo lo standard internazionale le triplette sono ad oggi 4 con 12 differenziali ufficiali.



Fermo, 19 febbraio 2016

10



La ricerca su girasole-*P. halstedii* richiede un'alta specializzazione come quello di INRA

<http://lipm-helianthus.toulouse.inra.fr/>

Helianthus au LIPM

Recherchages Mode Storage Sites

INRA
Institut National de la Recherche Agronomique

Lipm
Laboratoire Interactions Plantes-Micro-organismes

English version

Gestion du site Suivi des contrats de l'équipe

Bonjour! Vous visitez HELIANTHUS, le wiki de l'équipe INRA "Tournesol" de Toulouse (LIPM) impliquée dans des recherches en Génétique, Génomique, interaction avec les microorganismes

Pages en accès libre:

- Ressources documentaires
- Ressources génétiques publiques (USDA, INRA et autres sources)
- Ressources génomiques publiques
- Ressource d'annotation des sites HELIANTHUS
- Site public du projet "Investissements d'avenir" EMMISE
- Site de l'International Rice Genomes Consortium (IRG)

Projets en cours (accès possiblement réservé)

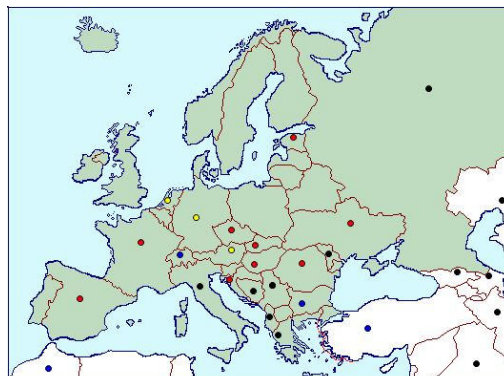
- Bioinformatique
- Alliance CROQUANT
- Programmes PROMOSOL: Accès réservés aux membres de l'association PROMOSOL
- SUNRISE
- ANR REFLECTOBRIS

crea

Fermo, 19 febbraio 2016

13

Distribuzione di *P. halstedii* in Europa da schede CABI <http://www.cabi.org/> al 20-6-2015



- = Present, no further details
- = Widespread
- = Localised
- = Confined and subject to quarantine
- = Occasional or few reports
- = Evidence of pathogen
- = Last reported
- = Presence unconfirmed
- = See regional map for distribution within the country

Organizzazione della presentazione

1. Introduzione e stato dell'arte su *Plasmopara halstedii*
2. Evoluzione delle razze di peronospora del girasole e situazione ad oggi in Europa
3. Prospettive di sviluppo delle studio su peronospora in Italia



Fermo, 19 febbraio 2016

15

Problematiche e prospettive per la caratterizzazione delle razze in Italia – il patogeno

- Dato per scontato che:
 - ✓ la assenza di informazioni storiche sulla presenza di *P. halstedii*,
 - ✓ la variabilità delle popolazioni osservata in altri paesi
 - ✓ che la fonte principale di infezioni sono le oospore svernati nel suolo,
 - ✓ che non c'è stato nessun monitoraggio sulle immissioni di razze con seme infetto

E' necessario una indagine sulle razze di peronospora a partire da un numero minimo di isolati superiore a 40, che può essere raggiunto in più anni di raccolta o con una raccolta sistematica sul territorio in 2-3 anni.



Fermo, 19 febbraio 2016

16

Problematiche e prospettive per la caratterizzazione delle razze in Italia – raccolta isolati

Raccolta materiale infetto:

- In campi con sintomi di peronospora (maggio-giugno), raccogliere foglie intatte (possibilmente fresche con sintomi leggeri) con sintomi anche lievi, in modo da poter ottenere la sporificazione della foglia in camera umida in laboratorio.



Spedizione

- mettere le foglie singole (massimo 2-3 se vicine) in buste di carta poi plastica conservarle in frigo e consegnarle appena possibile.
- Segnare luogo, data e, se possibile, la varietà di girasole ospite.



Fermo, 19 febbraio 2016

17

Cosa abbiamo fatto? Raccolta isolati

- Raccolta 9 isolati di peronospora nel maggio giugno 2015
- Produzione inoculo standard e conservazione
 - Giugno 2015 - Camera umida delle foglie infette per esaltare inoculo esistente, e ottenere una sospensione di sporangi vitali con cui è stata inocolata varietà sensibile
 - Luglio 2015 - Allevamento piantine infette fino a 2 foglie vere (20 °C , 16/8 luce/buio)



- Luglio 2015 – ottenuti sporangi da piantine infette in camera umida a 15 °C e raccolto sporangi per prove di crio-conservazione (soluzione sporangi e foglie infette)
- Gennaio 2016 re-inoculati per valutare vitalità e miglior forma di stoccaggio degli isolati
- Gennaio 2016 stiamo lavorando sulla concentrazione di oospore ottimale per espressione della suscettibilità



Fermo, 19 febbraio 2016

18

Raccolta isolati - considerazioni

- Abbiamo notato variabilità di risposta ai 9 isolati di peronospora testati su una linea suscettibile.
- È stato standardizzato il metodo: tempi di germinazione e infezione, materiali (uso di substrati sterili), inoculo (?),
- La raccolta degli isolati è fattibile, ma con numeri limitatissimi, visto la disponibilità di una sola cella climatica presso il CREA AA di Bologna.



Fermo, 19 febbraio 2016

19

Cosa abbiamo fatto?

Attività preliminare 2 isolati 2015 rigenerati

Linea	Nome	PI R Gene	
Differenziale 1	HA 304	nessuna	I set
Differenziale 2	RHA 265 sensibile	PI1 ←	
Differenziale 3	RHA 274 sensibile	PI12/PL51 ←	
Differenziale 4	DH - 2 ca resistente		II set
Differenziale 5	PM 17 ca	PI15 ←	
Differenziale 6	FT 803 - 1	PI15+ ←	
Differenziale 7	HAR 4	PI15	III set
Differenziale 8	HAR 5		
Differenziale 9	HA 335 sensibile	PI6 ←	
Differenziale 10	HA 295		IV set
Differenziale 11	HA 325		
Differenziale 12	HA 340		



20

Quale strategia per prospettiva applicativa nel breve periodo?

Per ora CREA- AA può;

- Costruire una collezione di isolati di *P. halstedii*, catalogati per provenienza e varietà, ripulirli e crio-conservarli. Dato l'impegno richiesto per la sola messa in conservazione la programmazione può essere fatta su 3 anni (15-20 isolati per anno) (CREA AA Bologna).

Fattibile, se la raccolta viene fatta con il supporto di compagnie sementiere con campi prova o comunque personale che segue la coltura di girasole su territorio.

- Mantenere e aumentare la produzione di linee differenziali.

Fattibile con un lavoro aggiuntivo di CREA AA Osimo-Bologna.



Fermo, 19 febbraio 2016

21

Quale strategia per prospettiva applicativa per un futuro?

Per gli *steps* successivi della attività servono investimenti quali:

- Superficie e personale per la produzione di seme delle linee differenziali.
- Camere climatiche a dimensioni tali da consentire più cicli di valutazione contemporaneamente con numeri standard.
- Strumentazione per disinfezione substrati e mantenimento sterilità delle camere.
- Personale dedicato ad una **attività di servizio - monitotraggio**

Nota: eventuale attività di ricerca richiede tempo, a meno che non si coinvolgano da un 1-2 ricercatori con interesse specifico e si imposti una attività Girasole-peronospora con un contatto diretto con INRA con il supporto di un progetto specifico e ambizioso.



Fermo, 19 febbraio 2016

22

Quale strategia per prospettiva applicativa?
Obbiettivi raggiungibili nel medio periodo con finanziamento specifico

1. Caratterizzazione delle razze di peronospora in Italia esistenti
 - i. Permetterebbe di valutare la storia e la evoluzione dell'ingresso delle razze di *P. halstedii* in Italia, verificare se l'ambiente favorisce alcuni clusters di razze invece che altri
 - ii. Supporterebbe una scelta più accurata delle varietà di girasole da immettere sul mercato nazionale
 - iii. Permetterebbe la individuazione di eventuali nuovi ingressi attraverso seme infetto.
2. Messa a disposizione di collezione di isolati di peronospora caratterizzati per razza di appartenenza per test.

Il raggiungimento degli obiettivi 1 e 2 aprirebbe a collaborazioni più paritarie con INRA o Compagnie sementiere.

Tuttavia, non consentirebbe di offrire attività di servizio per la valutazione della sensibilità varietale a razze note di *P. halstedii*



Fermo, 19 febbraio 2016

23

Piano di minimo fattibilità per la caratterizzazione delle razze di peronospora in Italia

Svolgendo il lavoro pur con numeri ridotti, per riconoscere le razze di peronospora in agro-ambienti italiani sono necessari:

1. uno-due armadi climatici per poter svolgere in continuo per almeno 2 anni la valutazione degli isolati di *P. halstedii*
2. Personale tecnico (1) dedicato solo a *P. halstedii* per almeno 2 anni
3. Disponibilità minima di fondi per materiali laboratorio e campo e servizi



Fermo, 19 febbraio 2016

24

Quali opzioni operative e di sviluppo abbiamo nel medio lungo periodo?

- Sviluppo di un centro di ricerca specializzato su girasole con annessa attività di servizio.....?
- Spin off ?
- Lavoriamo sulla possibilità di collaborazioni con INRA?

