

Università degli Studi di Bari Aldo Moro

Orientamento consapevole 2019
BIOTECNOLOGIE INNOVATIVE

Le piattaforme high throughput sequencing (HTS)
e l'identificazione dei patogeni vegetali

Donato Gallitelli

Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta e degli Alimenti



Come tutti gli esseri viventi, anche le piante si ammalano

Gli agenti che causano malattia nelle piante sono della stessa natura di quelli che causano malattia nell'uomo e negli animali. Fra essi, infatti, includiamo prevalentemente **virus, batteri, fitoplasmi e funghi** mentre altri, come i **viroidi**, sono noti come agenti di malattia solo per le piante

Le malattie provocate da questi agenti sono definite **malattie infettive**, cioè la malattia può essere trasmessa da un ospite all'altro

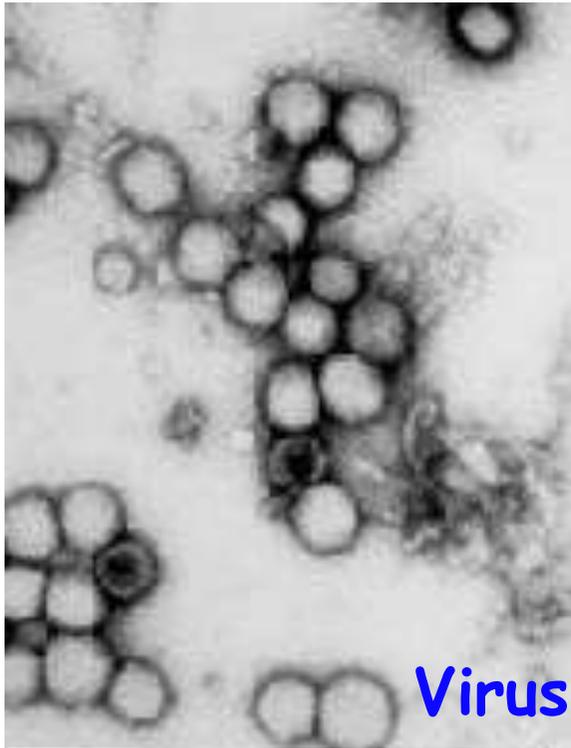
Le piante possono anche ammalarsi a causa di fattori ambientali quali **freddo, caldo, siccità, contaminazione da agenti chimici, improprie pratiche colturali** in tal caso, la malattia è definita **abiotica**

E gli insetti?

Gli insetti ed altri parassiti animali delle piante come gli **acari** e i **nematodi** non provocano malattie nelle piante ma, piuttosto, danni.

Il danno non può essere trasmesso da un ospite ad un altro e, quindi, il danno non rientra nel concetto di malattia infettiva

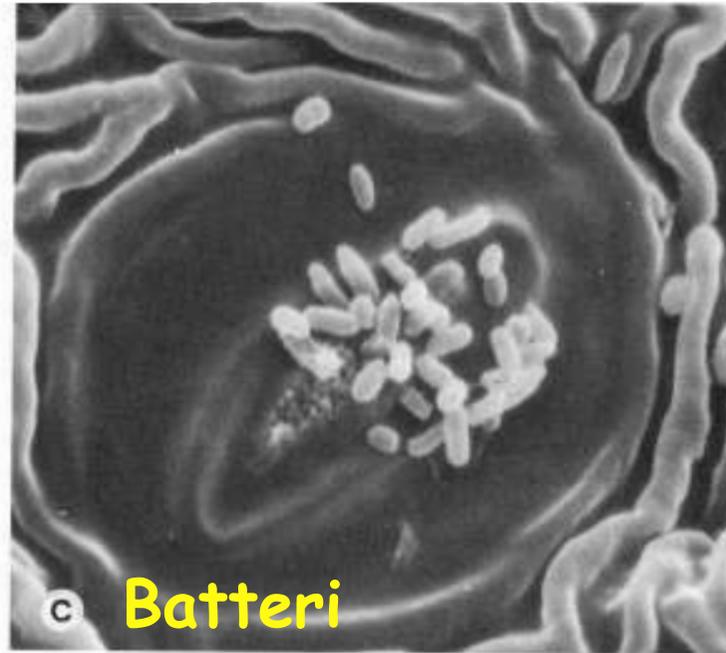
Tuttavia gli insetti possono trasmettere agenti di malattie infettive



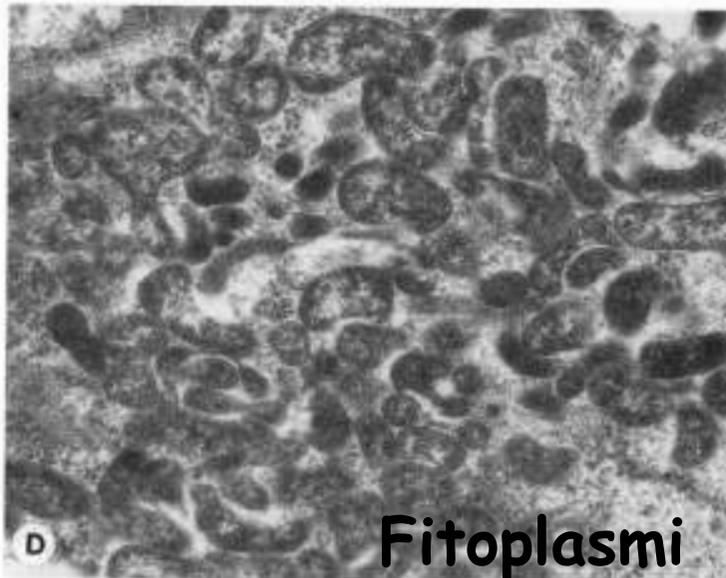
Virus



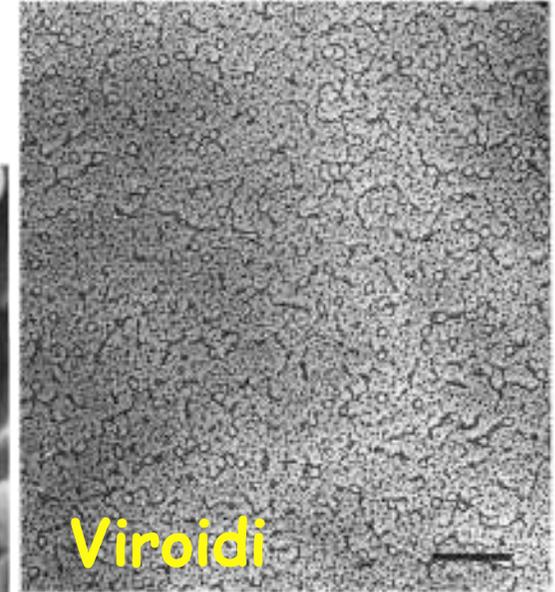
Funghi



Batteri



Fitoplasmi



Viroidi

Agenti di
malattie infettive
nelle piante

Parte prima: La diagnosi delle malattie delle piante

In genere, i termini diagnosi, rilevamento (detection) e identificazione sono usati come sinonimi; in realtà si riferiscono a situazioni differenti:

Diagnosi: stabilire una connessione tra un effetto (per esempio alcune alterazioni che osserviamo su una pianta) e la causa che l'ha determinata

Rilevamento (detection): formulare un'ipotesi sulla causa dell'alterazione (ad esempio un patogeno) ed attraverso procedimenti scientifici, rilevarlo

Identificazione: il patogeno rilevato può essere identificato a livello di genere, specie, razza, ceppo o variante in base a specifiche caratteristiche morfologiche, genetiche, metaboliche, epidemiologiche ecc

Quando una
pianta si può
definire malata ?

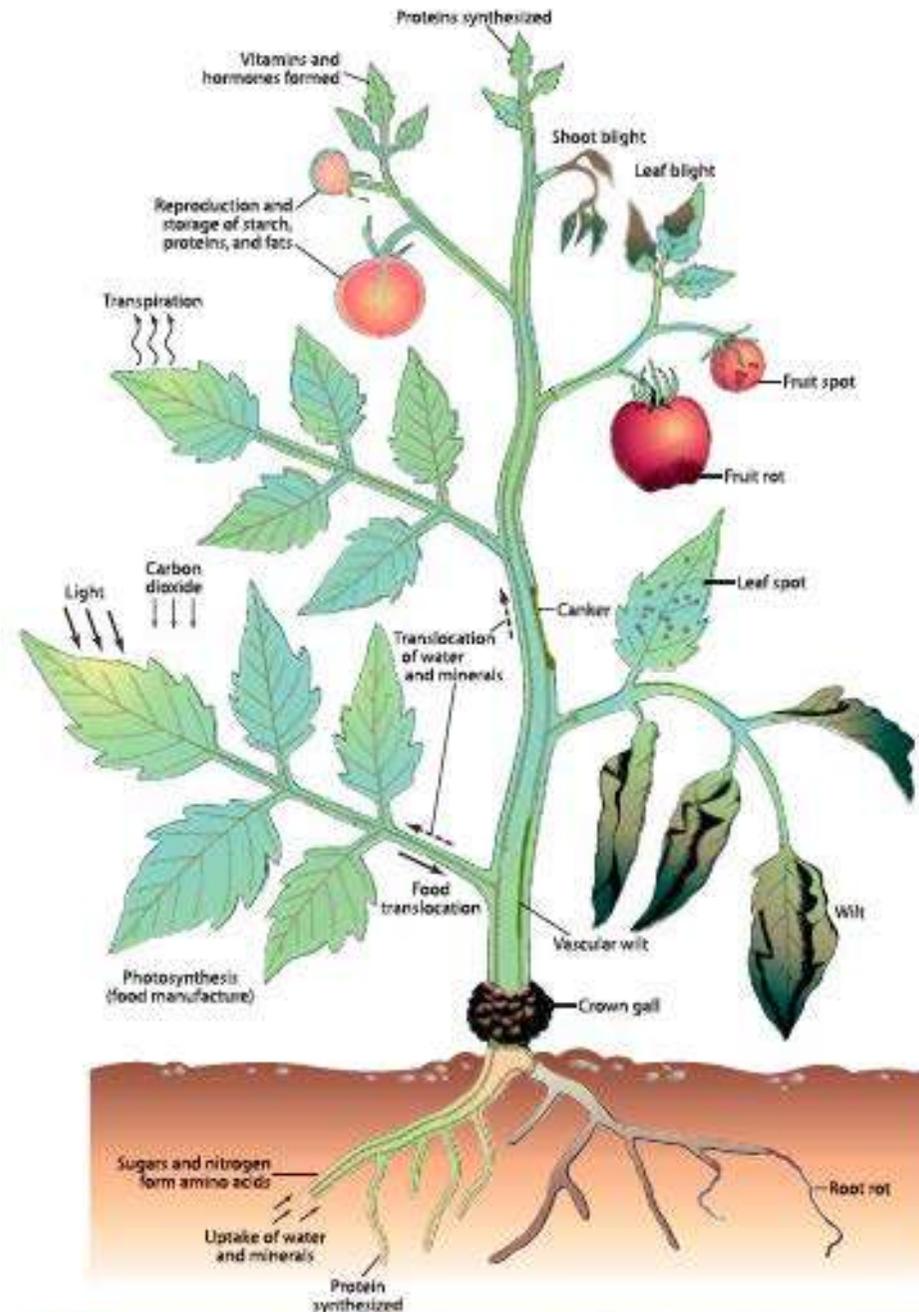
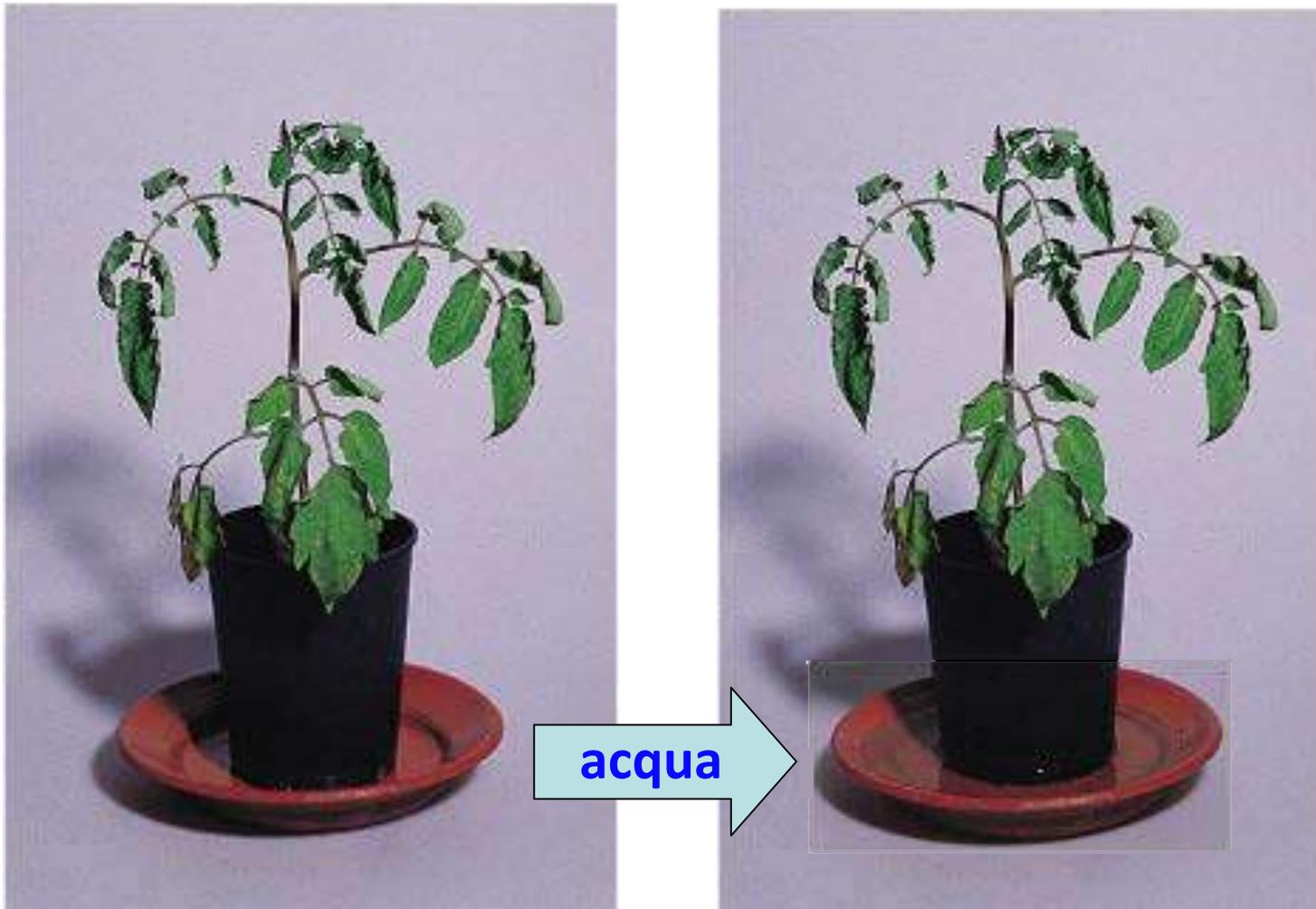


FIGURE 1-1 Schematic representation of the basic functions in a plant (left) and of the kinds of interference with these functions (right) caused by some common types of plant diseases.



L'appassimento (a sinistra) è un fenomeno normale nelle piante ed è **reversibile**. Basta innaffiare per ristabilire il normale turgore cellulare (a destra) **Quindi, l'appassimento, non è una malattia**



L'avvizzimento è **irreversibile**. Anche dopo la somministrazione di acqua le cellule non riacquistano turgore
Quindi l'avvizzimento è una malattia

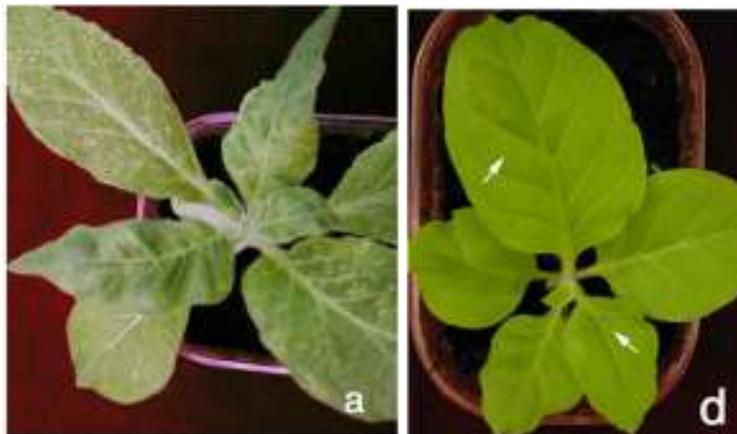
Come facciamo a riconoscere una pianta malata?

L'effetto "visibile" delle modificazioni indotte da un agente di malattia infettiva sulla crescita, lo sviluppo ed il metabolismo della pianta è rappresentato dai **sintomi**



Alcune volte i **sintomi** non sono visibili e l'infezione è definita **latente**

Infezione sintomatica



Infezione latente

Sviluppo dei metodi diagnostici

1905



A Robert Koch è assegnato il premio Nobel per la medicina per aver dimostrato il collegamento tra una causa, il bacillo della tubercolosi (*Mycobacterium tuberculosis*) e il sintomo (tubercolosi)

1955

Biologica

costo



specificità



sensibilità



applicabilità



1976

Sierologica



1980

ELISA



2000

Molecolare
Mabs



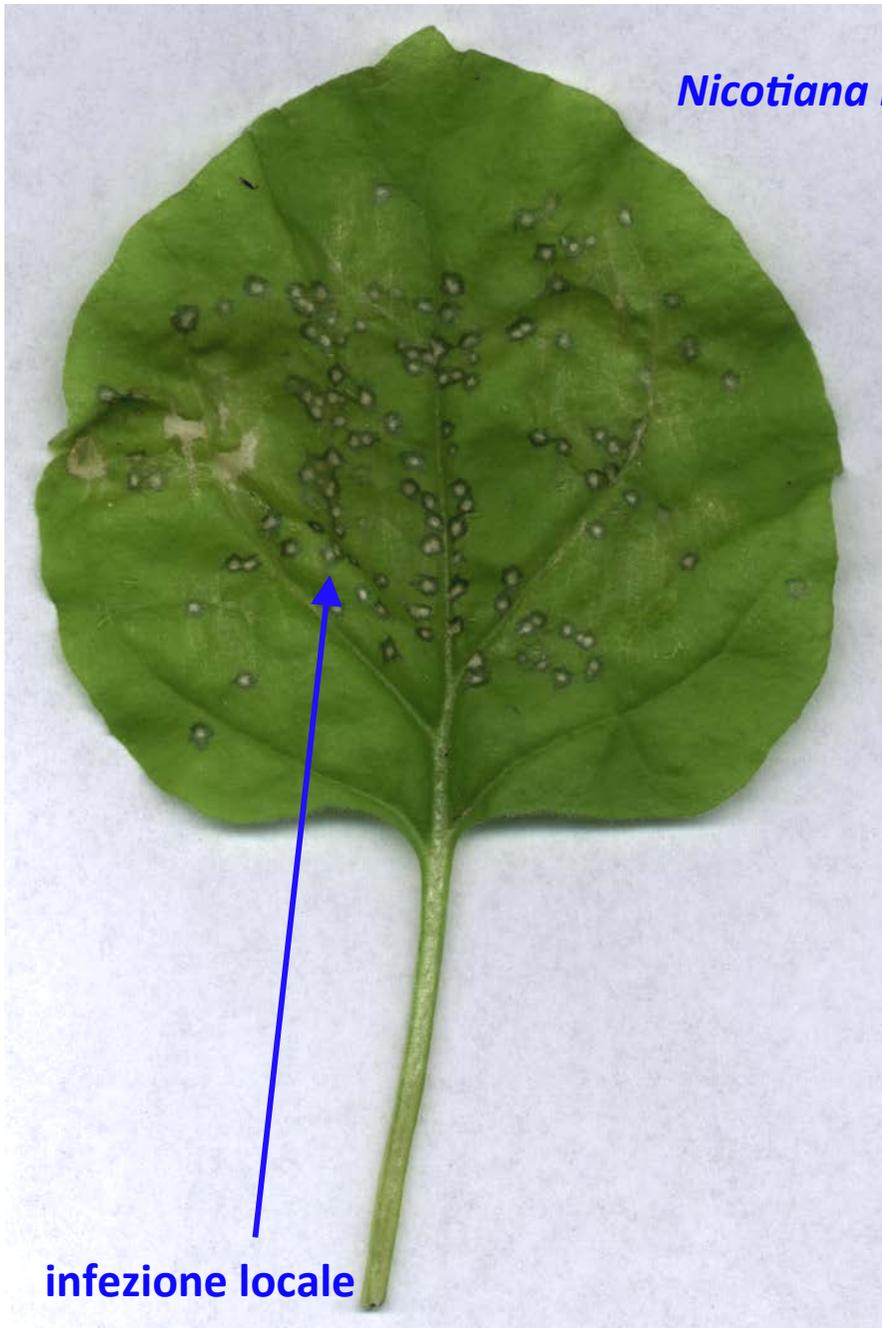
Oggi

Genomica
Proteomica
Trascrittomica
Metabolomica
Biologia dei sistemi

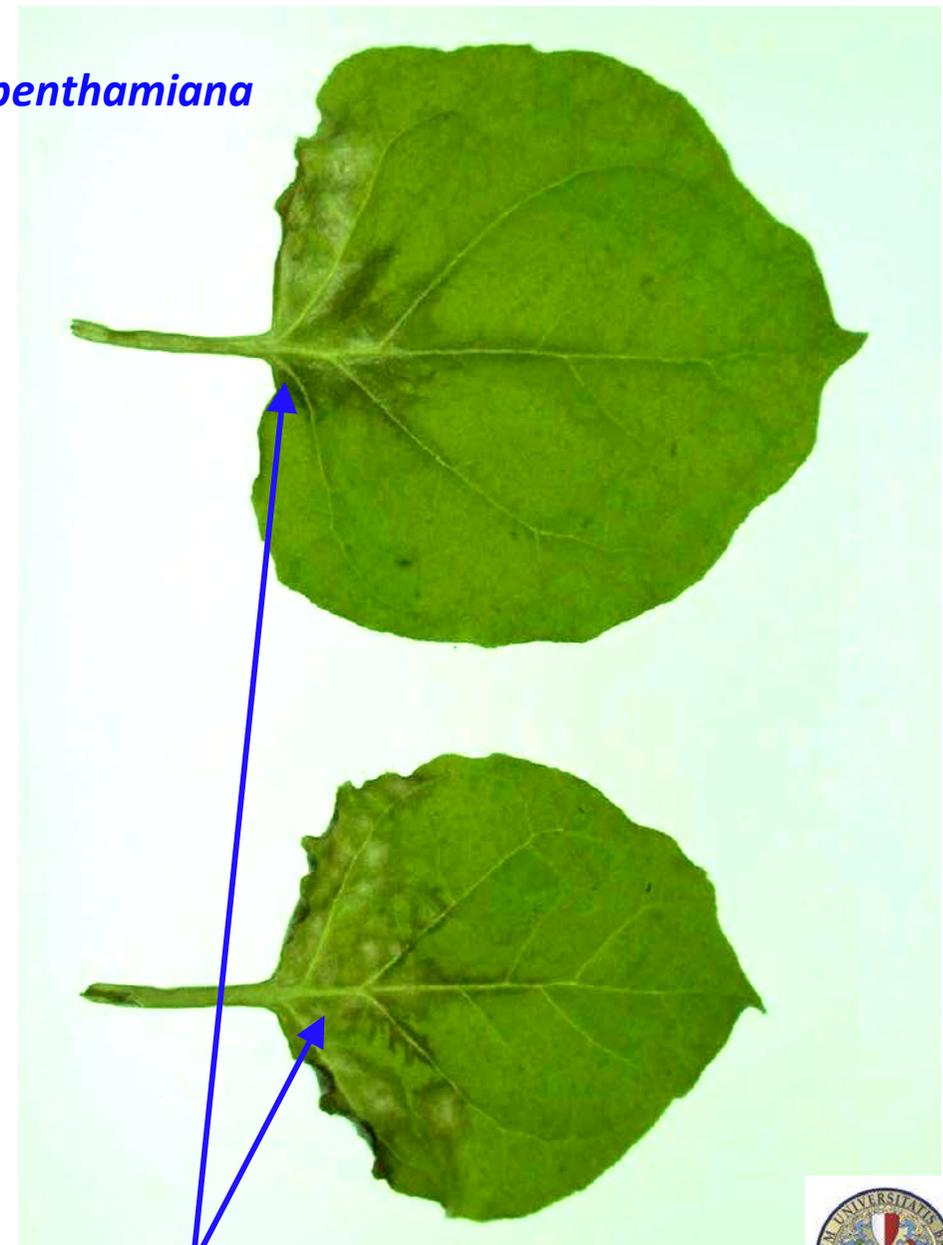


Rilevamento biologico

Nicotiana benthamiana

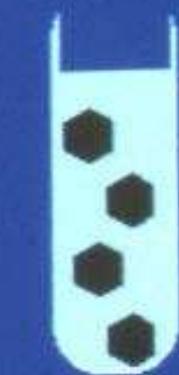


infezione locale

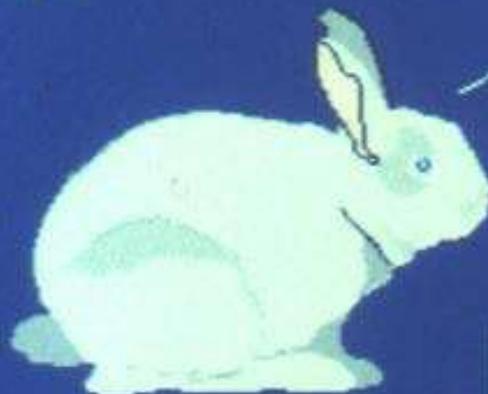


infezione sistemica

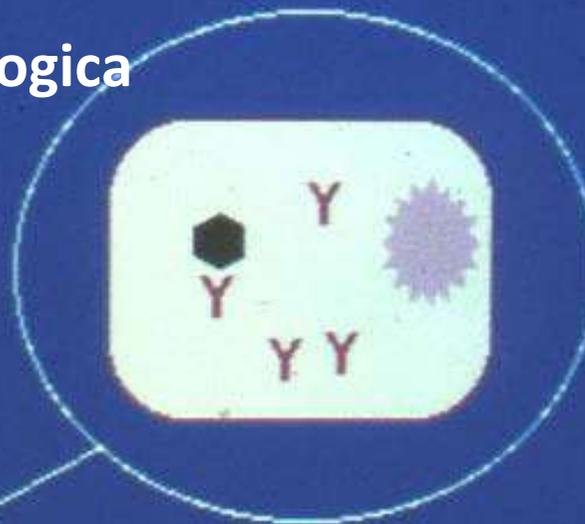
Rilevamento e identificazione sierologica



Virus purificato
dalla pianta
infetta



Il coniglio produce
anticorpi



Antisiero



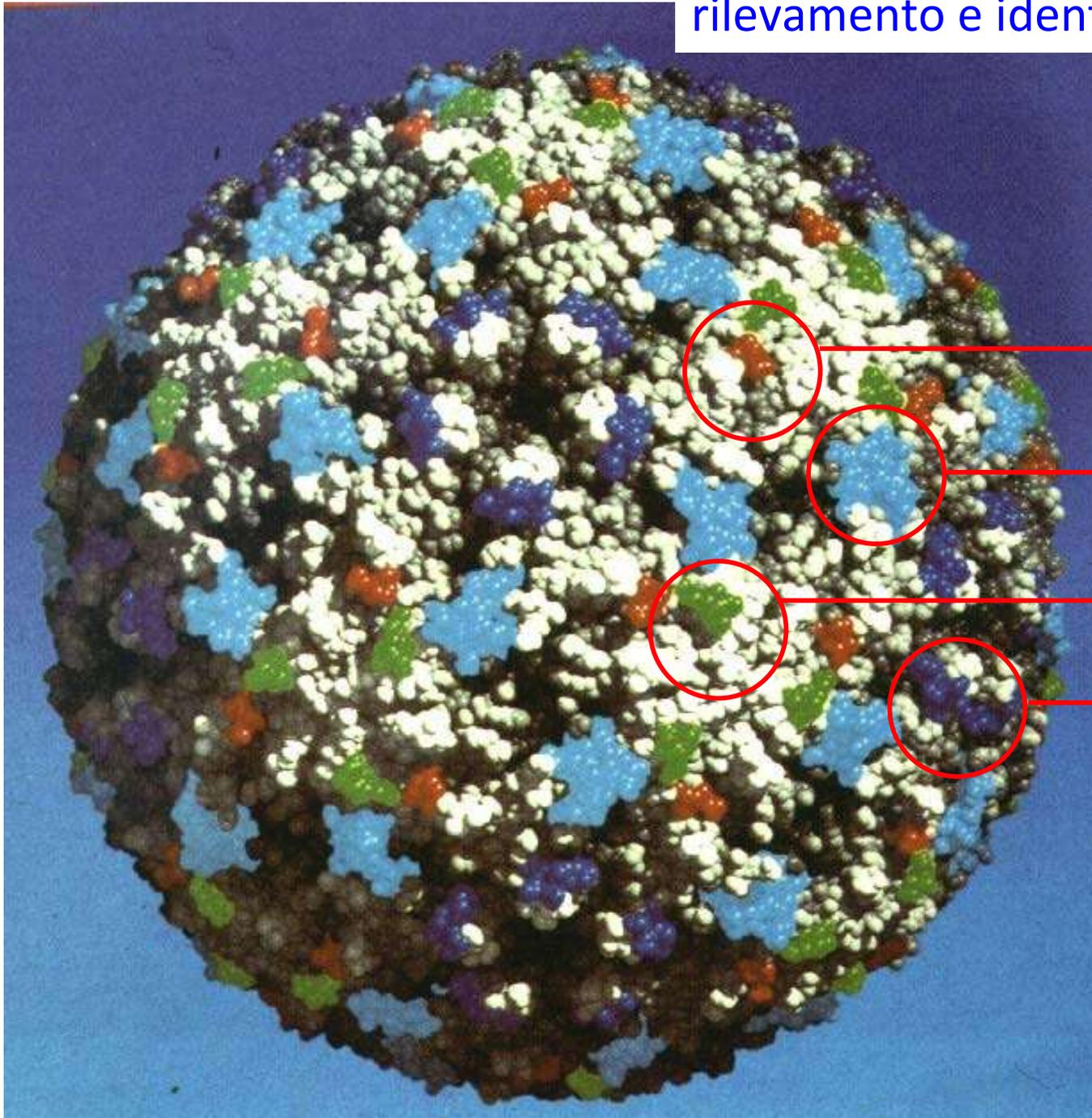
Dopo circa 30gg
il coniglio viene
salassato



rilevamento e identificazione sierologica

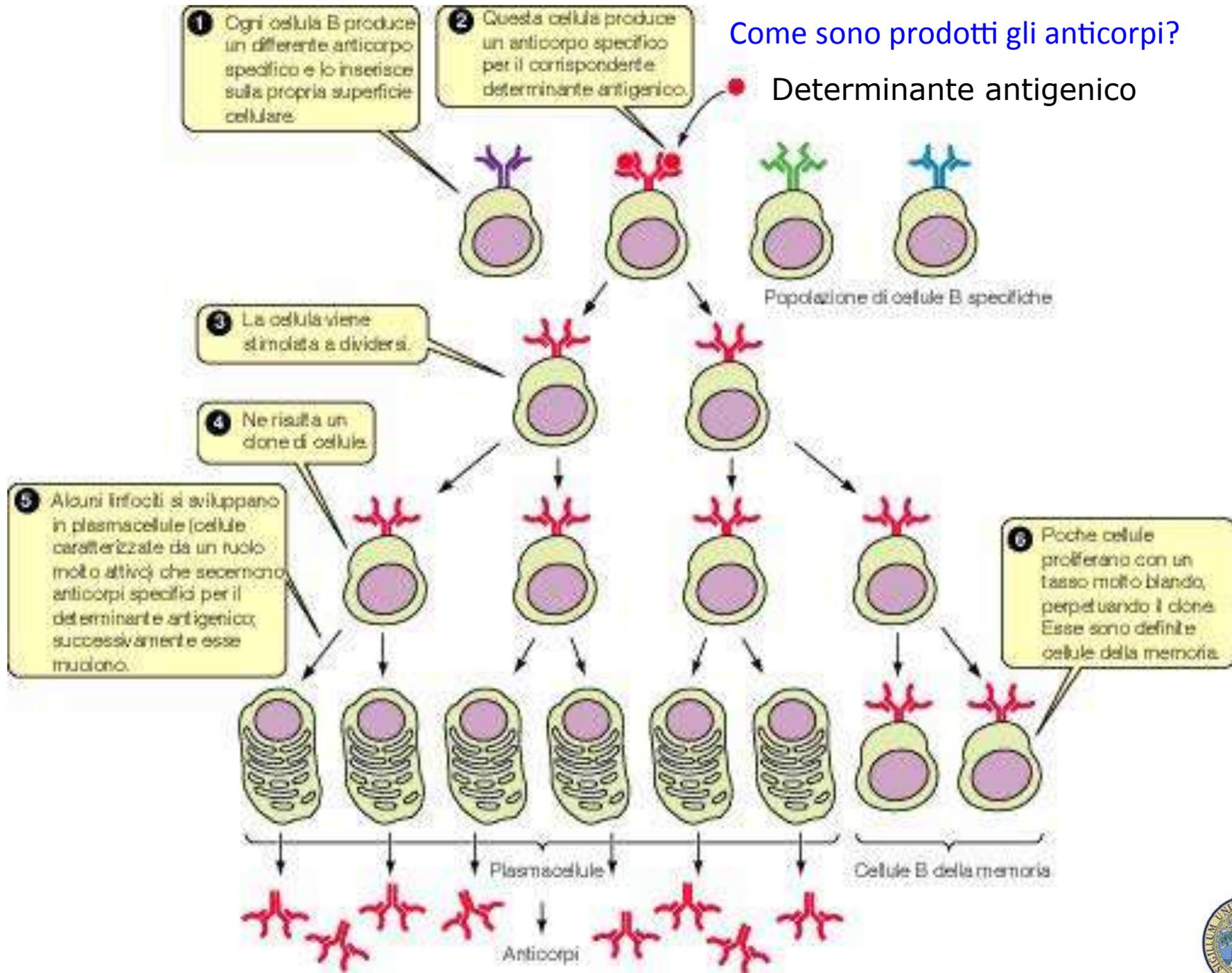
I determinanti antigenici
o epitopi

Quattro
determinanti
antigenici
diversi

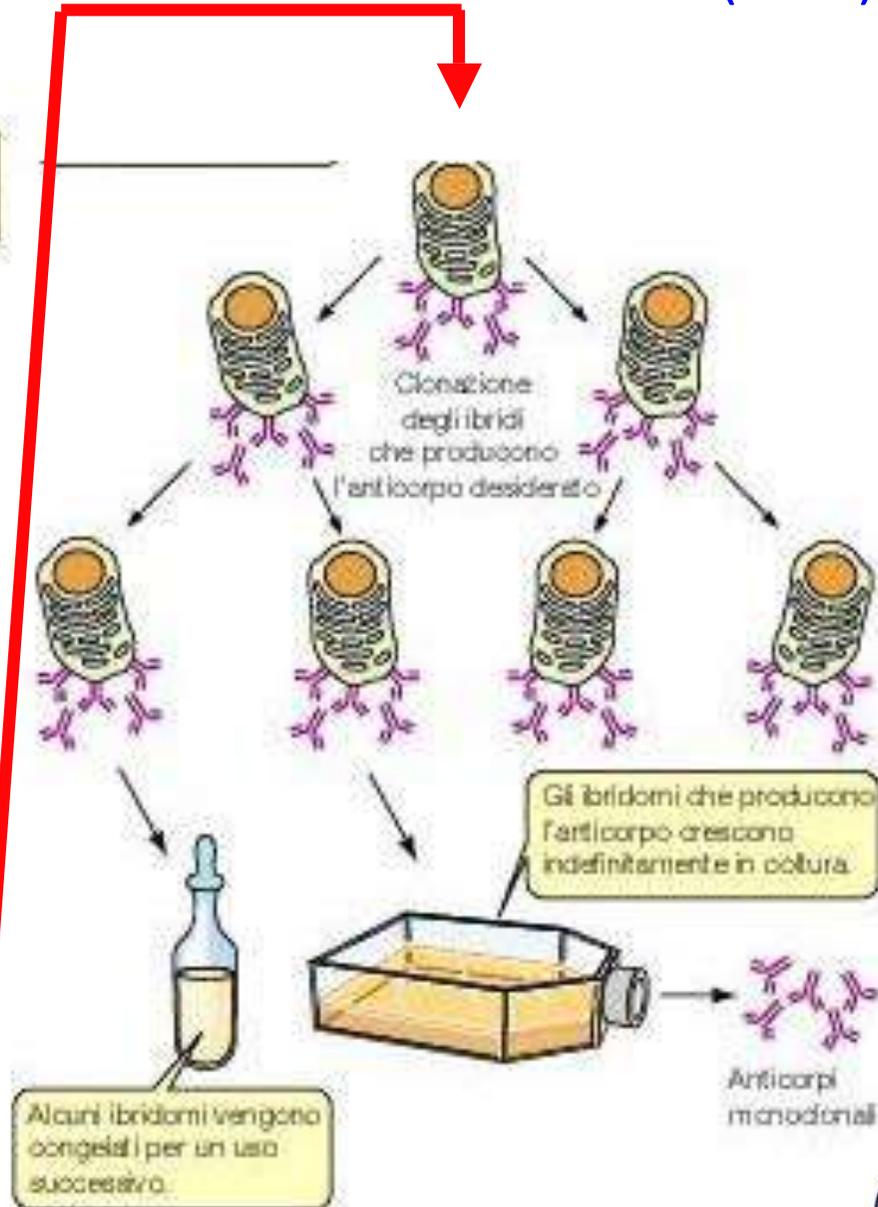
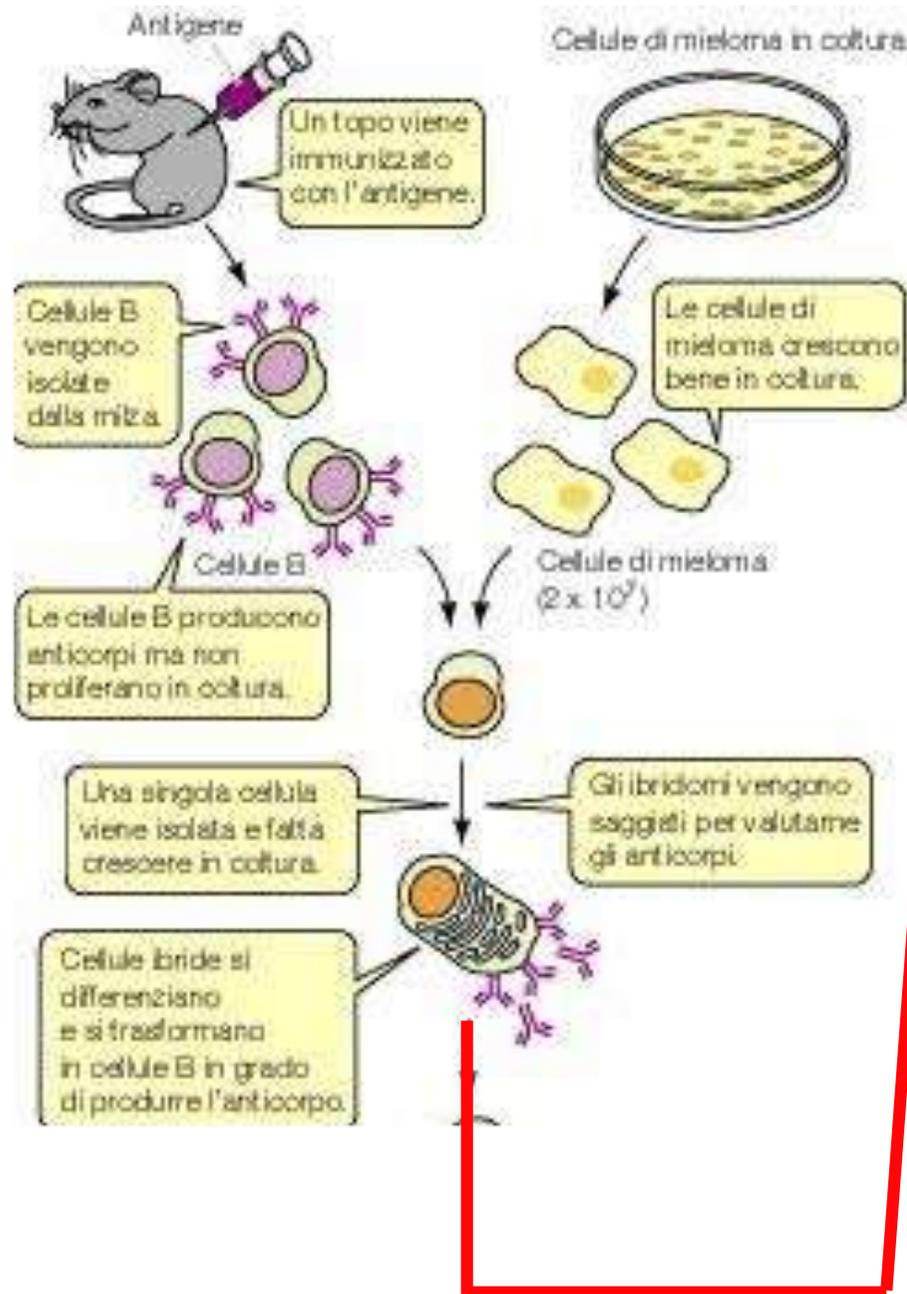


Come sono prodotti gli anticorpi?

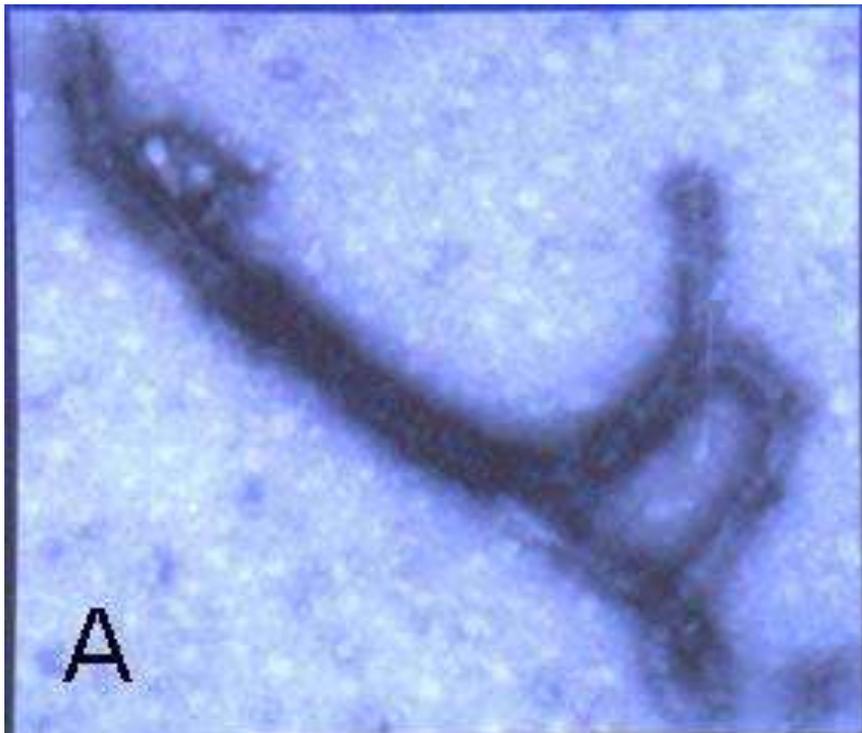
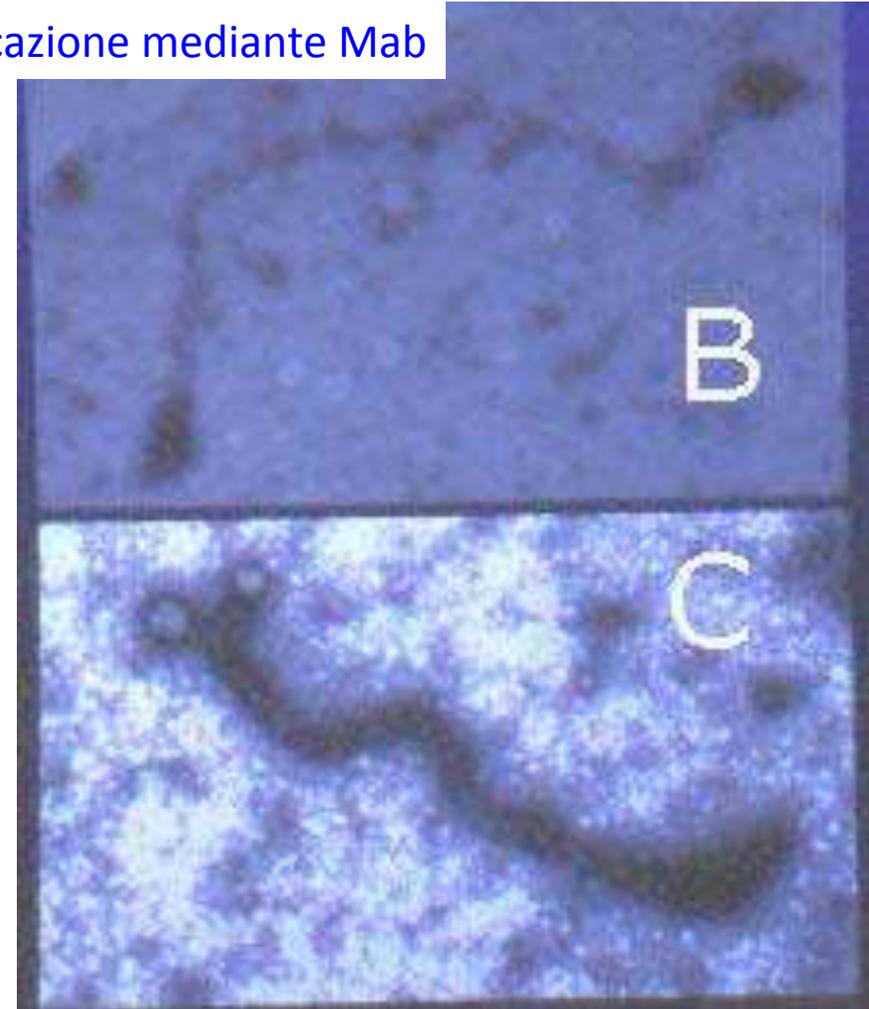
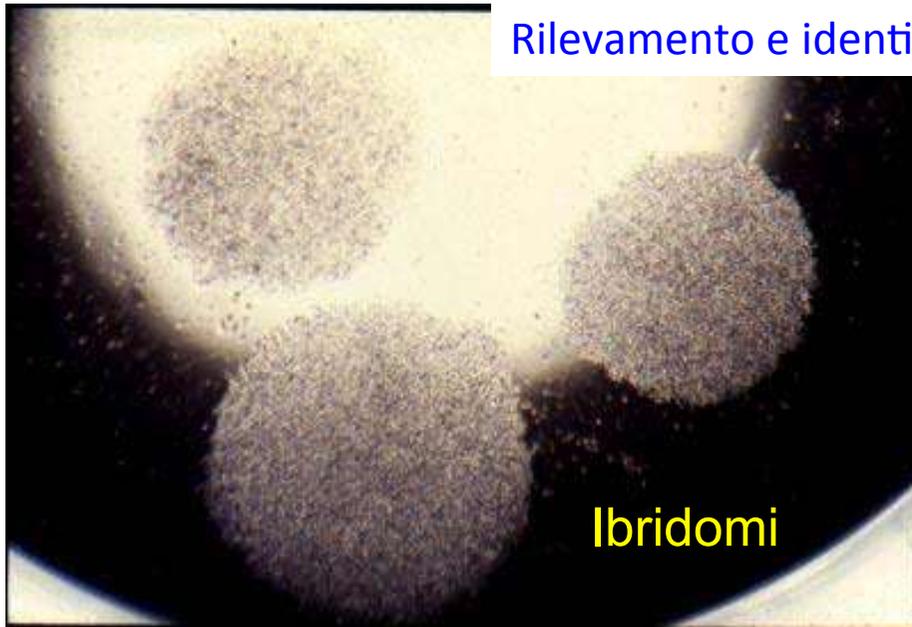
Determinante antigenico



Produzione di anticorpi monoclonali (Mab)



Rilevamento e identificazione mediante Mab

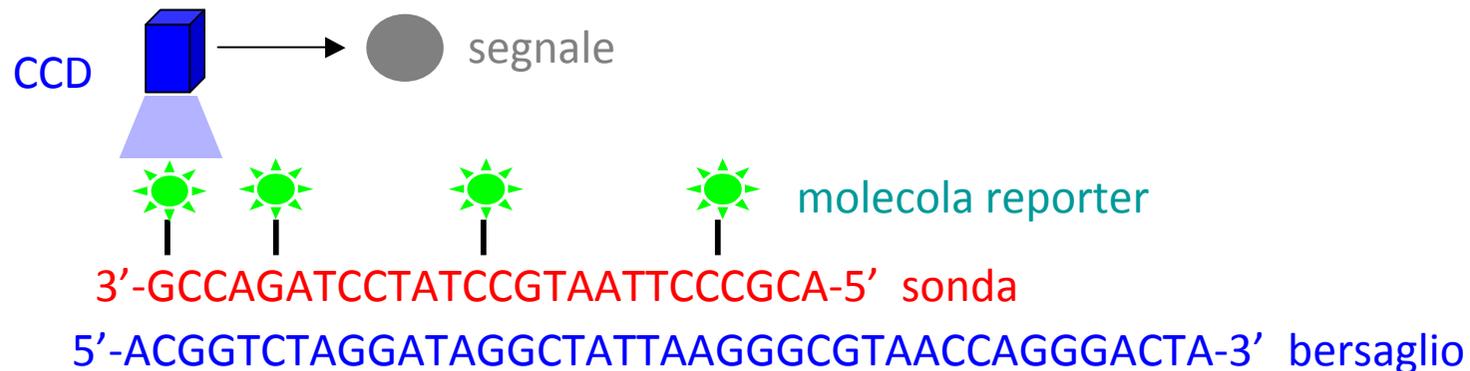


**Immuno-Sorbent Electron
Microscopy = ISEM**

Rilevamento e identificazione basati sulle proprietà degli acidi nucleici

Questo tipo di rilevamento e identificazione è basato sul riconoscimento di un frammento di un acido nucleico (DNA o RNA) del patogeno (bersaglio) presente in un tessuto vegetale mediante un altro frammento (**sonda**) con il quale forma un ibrido stabile per complementarità fra le basi

La formazione dell'ibrido è rilevata mediante il segnale emesso da una molecola reporter radioattiva o fredda (non radioattiva) legata alla sonda



Parte seconda

Struttura e replicazione del DNA

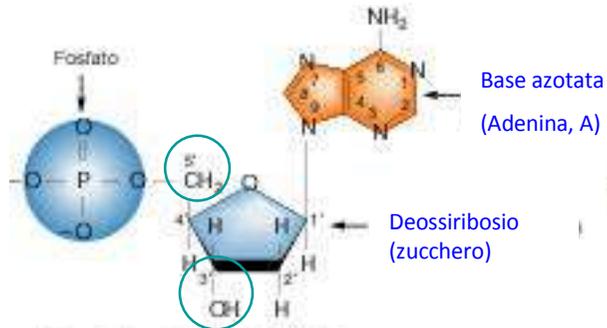
La **struttura primaria** del DNA è costituita da un filamento polinucleotidico in cui il desossiribosio e i gruppi fosfato hanno un ruolo strutturale, e la **sequenza** delle basi azotate caratterizza l'acido nucleico. Ogni filamento di polimero ha un'estremità 5' fosforilata e un'estremità 3' con l'ossidrile dello zucchero libero per potersi legare al nucleotide successivo

La **struttura secondaria** è organizzata in due filamenti appaiati e complementari che si avvolgono a spirale intorno un asse comune e che procedono in direzioni opposte (antiparallela). I due filamenti sono accoppiati mediante **ponti-idrogeno** fra coppie di basi complementari Adenina/Timina e Guanina/Citosina. Tali accoppiamenti favoriscono il maggior numero di legami idrogeno (due per Adenina/Timina e tre per Guanina/Citosina) e la massima stabilità alla struttura

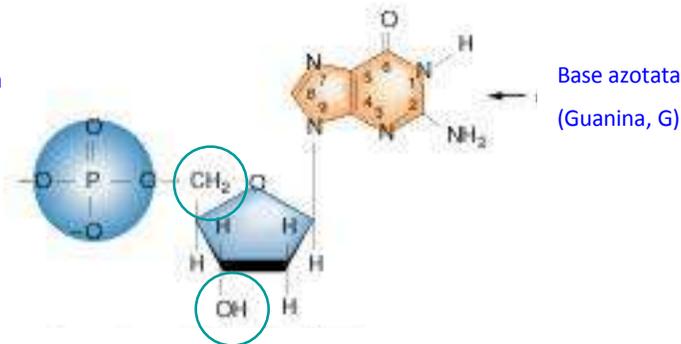
A causa delle ridotte dimensioni del nucleo, rispetto alla lunghezza del DNA (fino a 2 metri) il DNA si avvolge intorno ad **istoni** con formazione di **nucleosomi** e successivamente forma una struttura detta **cromatina**. Quest'ultima si organizza in **cromosomi** che poi costituiscono il genoma dell'individuo. Nel complesso, queste strutture costituiscono la **struttura terziaria** del DNA

Struttura degli acidi nucleici DNA ed RNA

Nucleotidi purinici

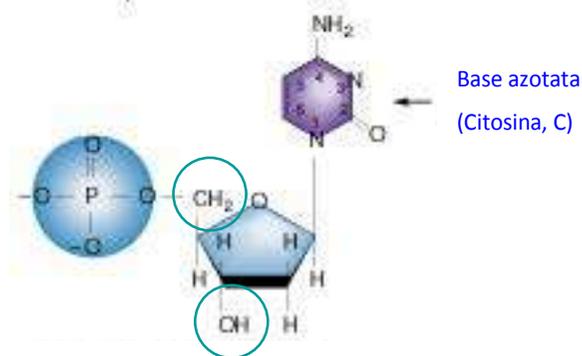


Deossadenosina 5' fosfato (dAMP)

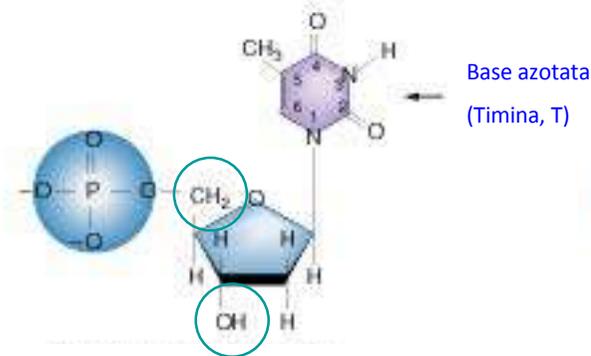


Deossiguanosina 5' fosfato (dGMP)

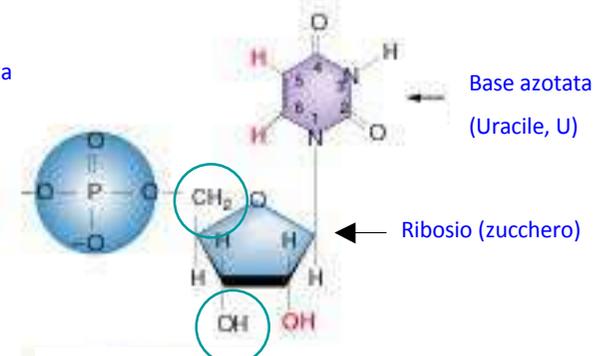
Nucleotidi pirimidinici



Deossicitidina 5' fosfato (dCMP)

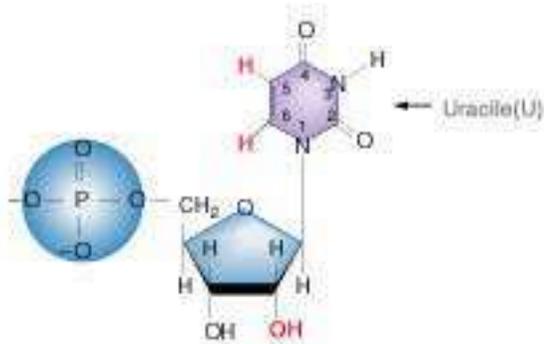


Deossitimidina 5' fosfato (TMP)



Uridina 5' monofosfato (UMP)

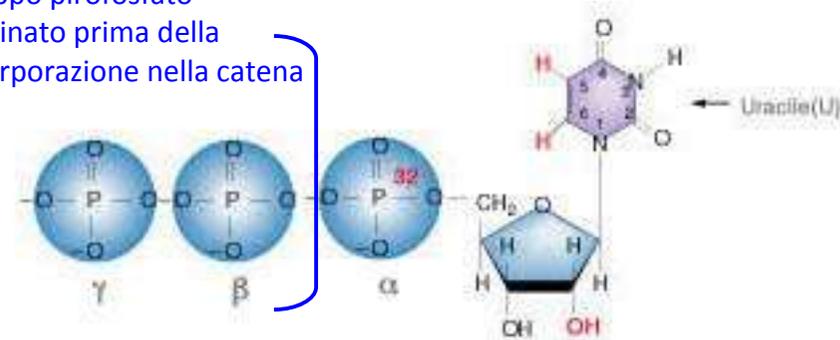
Struttura degli acidi nucleici DNA ed RNA



Uridina 5' monofosfato (UMP)

nucleotide

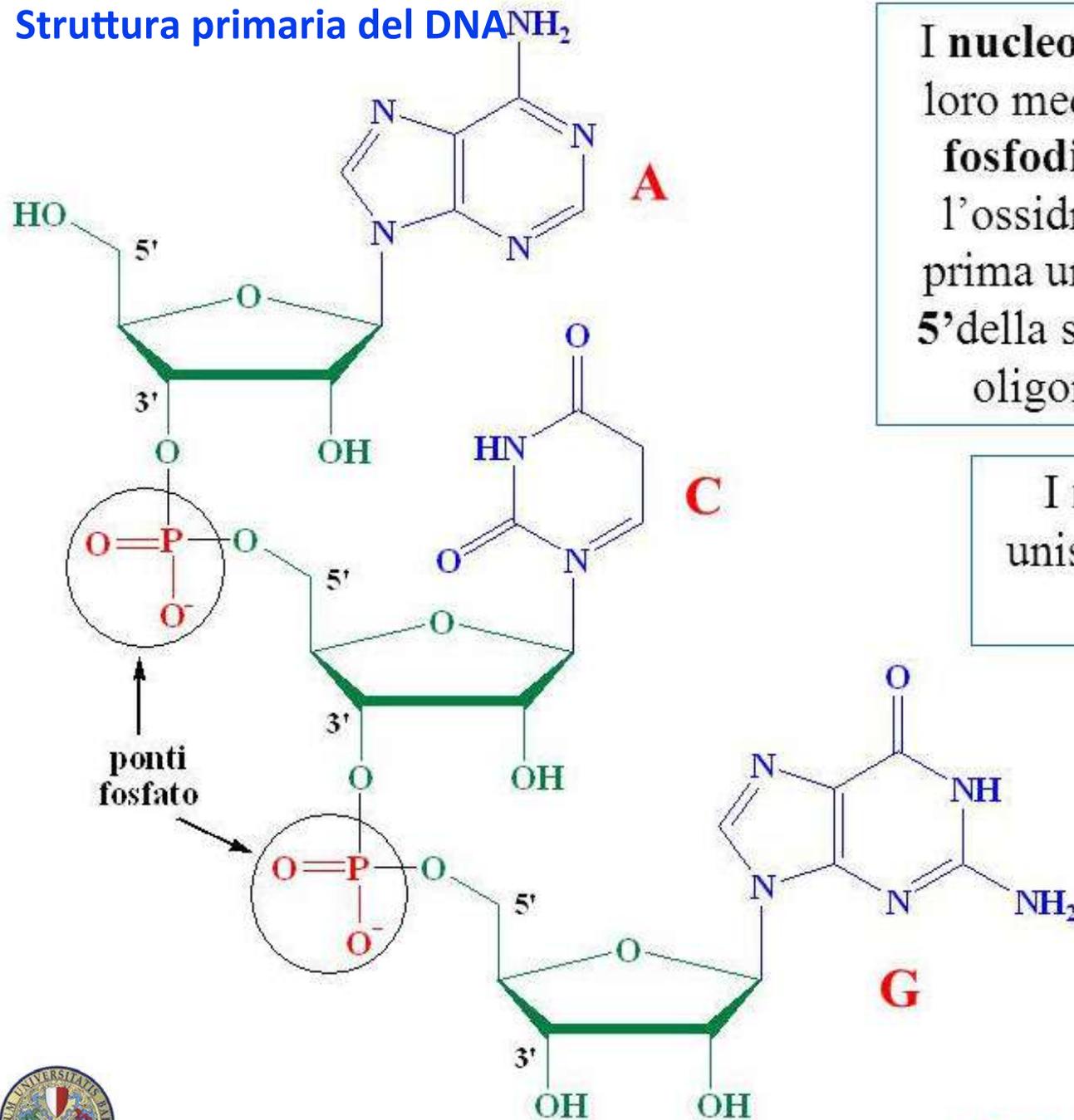
Gruppo pirofosfato
Eliminato prima della
Incorporazione nella catena



Uridina 5' trifosfato (α - ^{32}P) UTP

nucleoside

Struttura primaria del DNA^{NH₂}



I **nucleotidi** si possono legare fra loro mediante un ponte **fosfato** o **fosfodiesterico** che si forma tra l'ossidrile in posizione **3'** della prima unità e quello in posizione **5'** della seconda per formare degli oligomeri (**oligonucleotidi**)

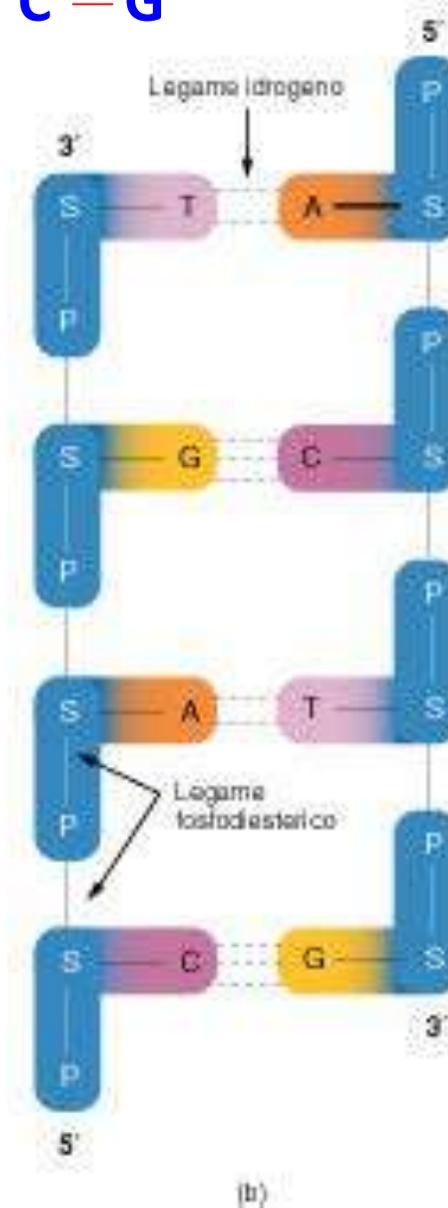
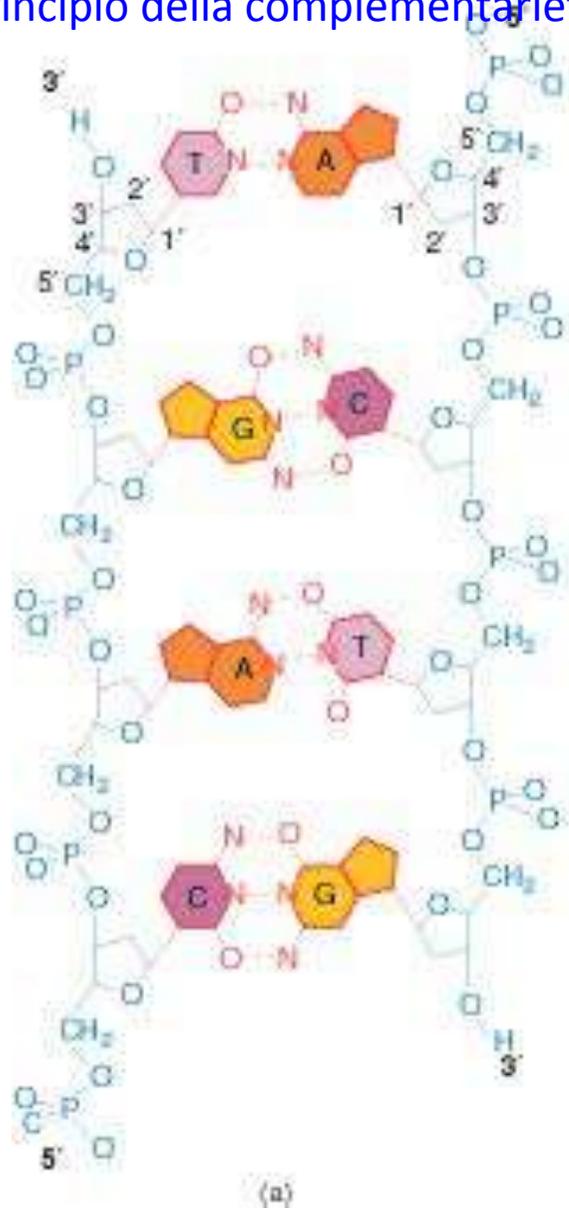
I **nucleotidi** monomeri si uniscono tra loro per formare catene molto lunghe

Per convenzione le sequenze **oligonucleotidiche** vengono indicate e scritte dall'estremità terminale **5' libera** all'estremità **3' libera**

ACG (adenina, citosina, guanina)

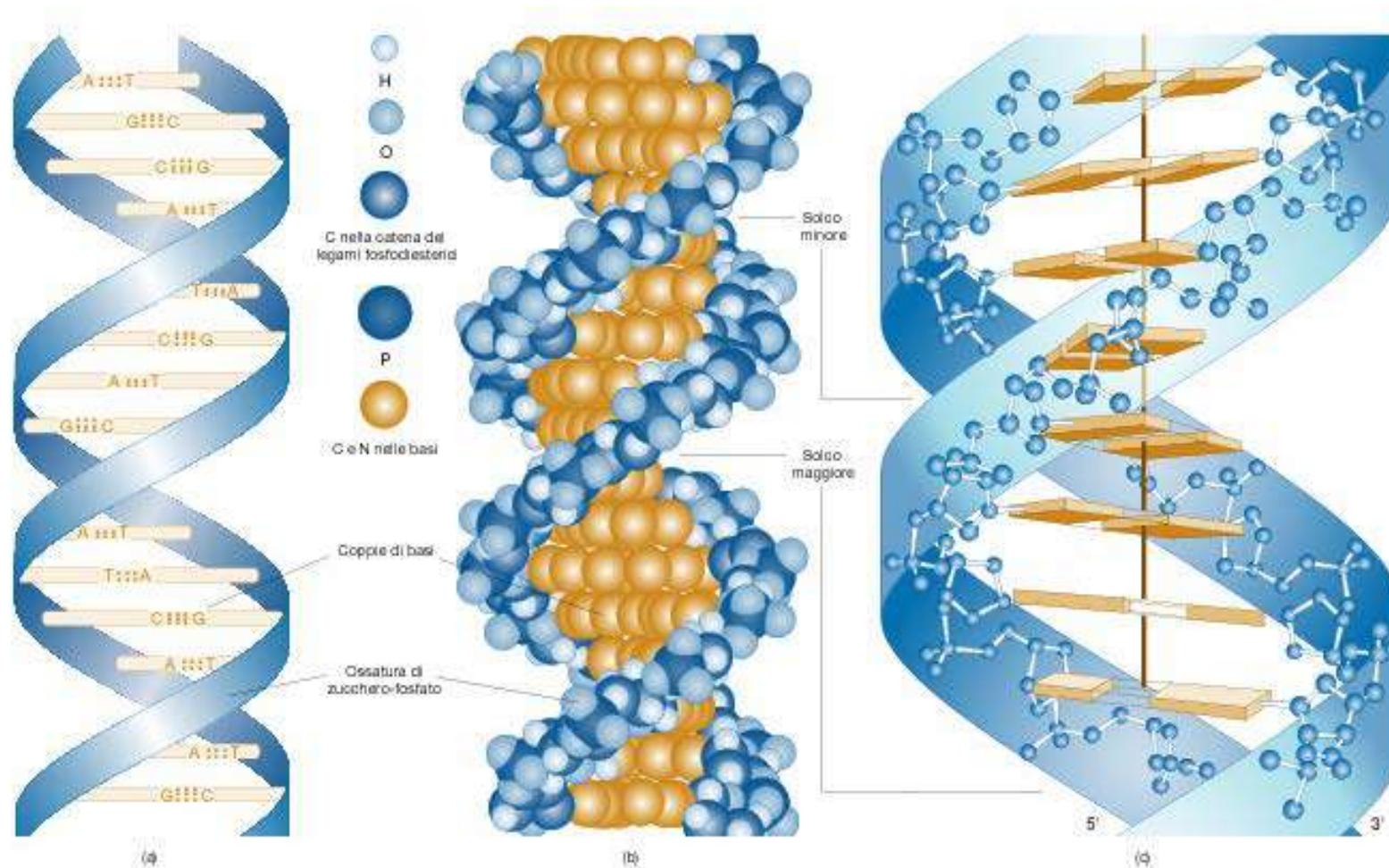
Organizzazione della struttura secondaria del DNA

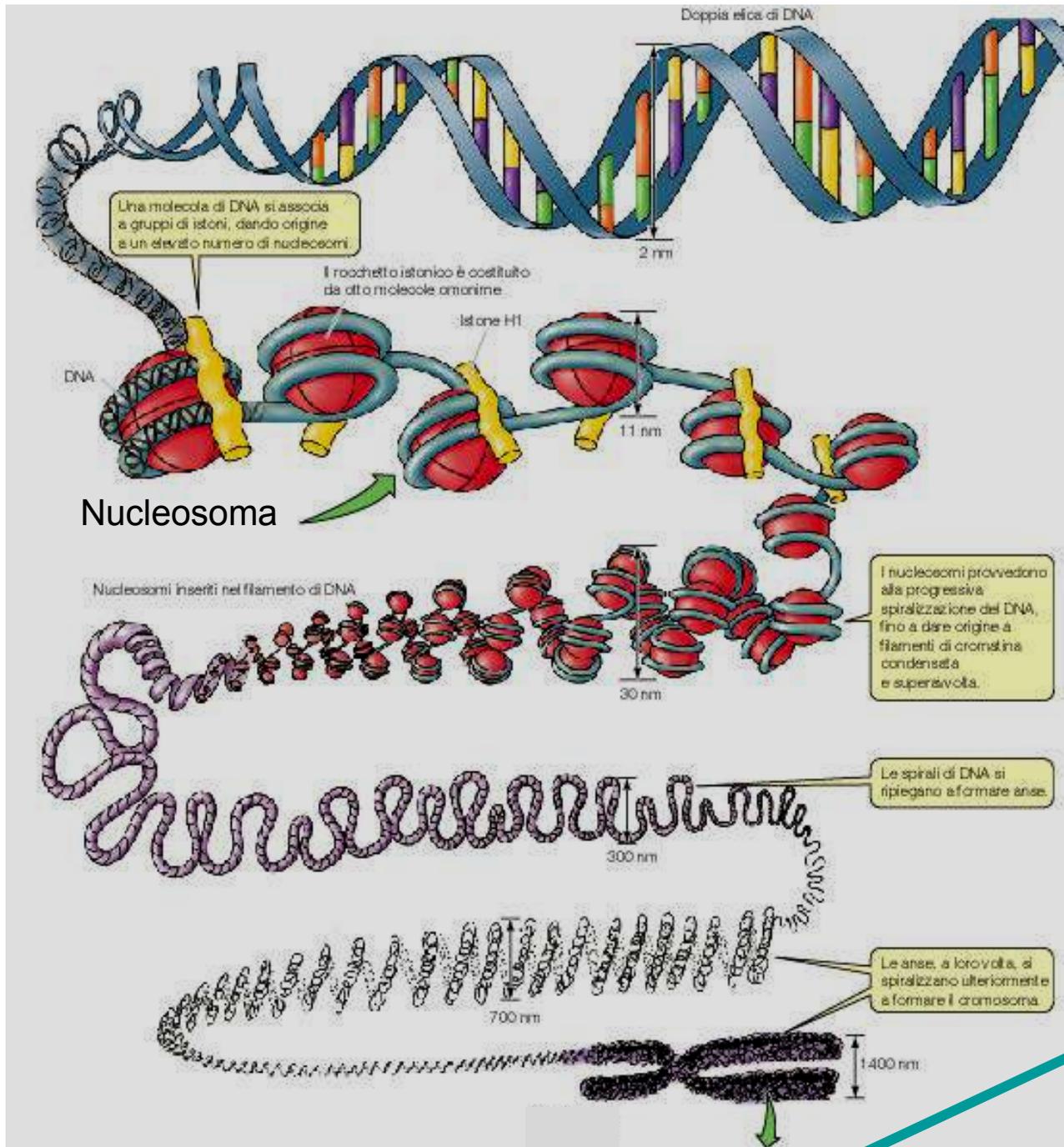
Tra le basi azotate di ciascuna catena (filamento) si formano 2 o 3 legami idrogeno secondo il principio della complementarità **A = T** **C ≡ G**



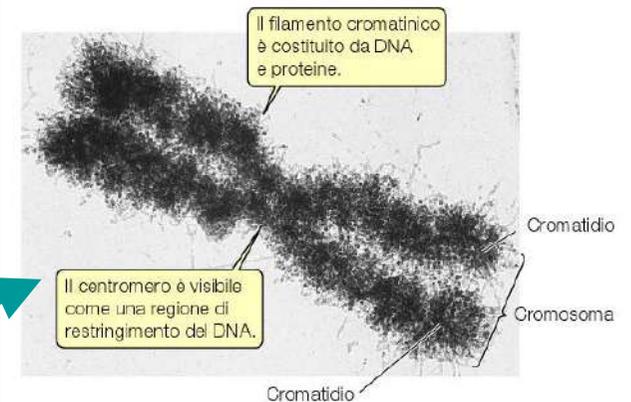
Organizzazione della struttura secondaria del DNA

Quindi la struttura a doppia elica del DNA è stabilizzata da legami fosfodiesterici e legami idrogeno





Organizzazione della struttura terziaria del DNA



La replicazione del DNA

La replicazione avviene in punti specifici detti **origine di replicazione** in corrispondenza dei quali si forma la **forcella di replicazione**, cioè un punto di biforcazione in cui interviene l'enzima **elicasi** che determina il progressivo srotolamento della doppia elica del DNA parentale, **favorendo la separazione dei due filamenti di DNA (denaturazione)**

Chiameremo i due filamenti **filamento guida** (o leading strand) e **filamento lento** (lagging strand). La separazione dei due filamenti viene garantita da **proteine** denominate **SSB** (single strand-binding proteins) che si legano ai due filamenti denaturati, impedendone il riavvolgimento ed il blocco della replicazione

La sintesi dei nuovi filamenti di DNA è operata da una **DNA polimerasi** che usa i deossinucleosidi trifosfati (dATP, dCTP, dGTP e dTTP). Per iniziare la sintesi, l'enzima ha bisogno di un 3' libero a cui aggiungere, per complementarità, i vari deossinucleotidi usando, come stampo, i due filamenti parentali. Il 3' libero è fornito da una **primasi** che catalizza la sintesi di un filamento di 3-5 nucleotidi di RNA, chiamato **primer**

La sintesi del DNA è **asimmetrica e semi-discontinua** perché la DNA polimerasi si muove in direzione 5'→3', aggiungendo nucleotidi in successione al gruppo -OH libero al 3' del primer. Questo è possibile solo per il filamento guida che è orientato nella direzione corretta mentre è impossibile per il filamento lento che è orientato in senso contrario (antiparallelo)

La replicazione del DNA

La sintesi del **filamento lento** avviene in modo discontinuo attraverso la produzione di **frammenti di 100-200 nucleotidi** detti **frammenti di Okazaki** che sono prodotti dalla DNA polimerasi utilizzando i primer ad RNA prodotti dalla primasi. Come già detto, il primer fornisce un 3' libero a cui la DNA polimerasi aggiunge il primo nucleotide e così via fino a che non incontra il 5' del primer successivo che arresta la sintesi.

Tutti i primer sono rimossi da una **RNasi H** e sostituiti da deossinucleotidi, sempre ad opera di una DNA polimerasi.

La formazione dei legami fosfodiesterici tra i vari frammenti è realizzata da una **DNA ligasi**

L'energia necessaria al processo di replicazione è fornita dall'idrolisi dei due gruppi fosfato presenti nel **pirofosfato** rilasciato da ogni nucleotide prima di essere aggiunto alla catena.

Nella replicazione del DNA intervengono diversi enzimi

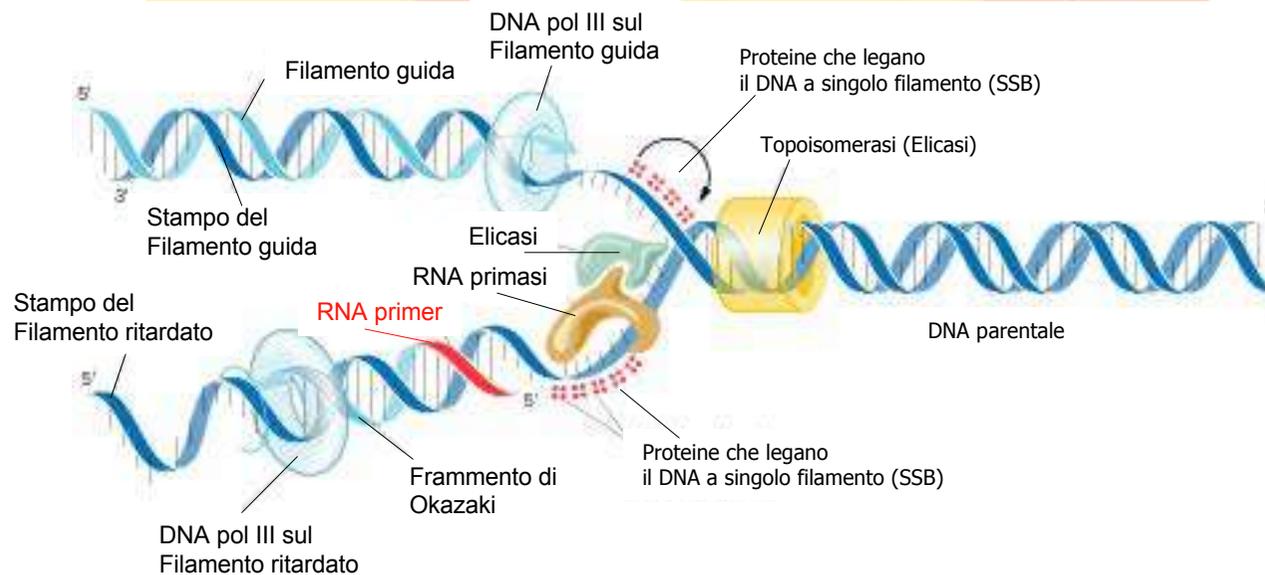
La doppia elica si svolge, generando stampi di DNA a singolo filamento **Elicasi e proteine che legano il singolo filamento**

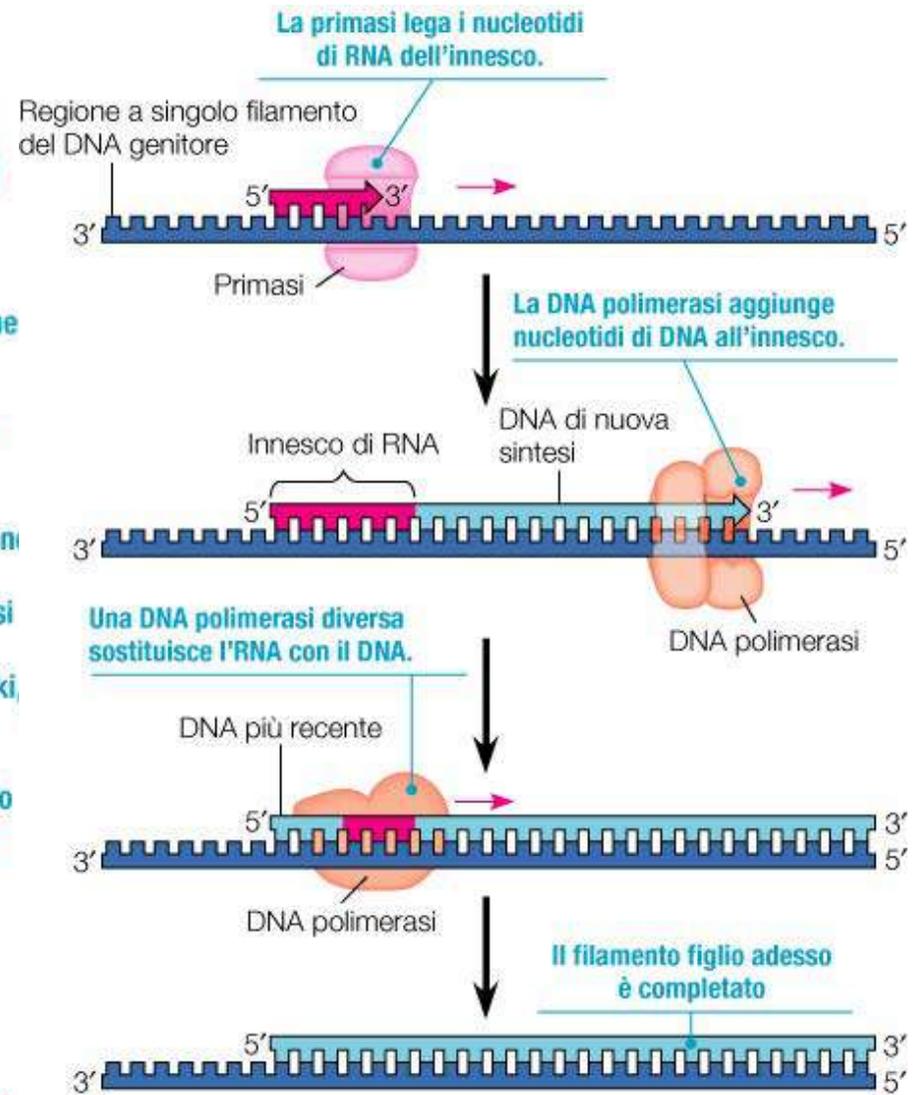
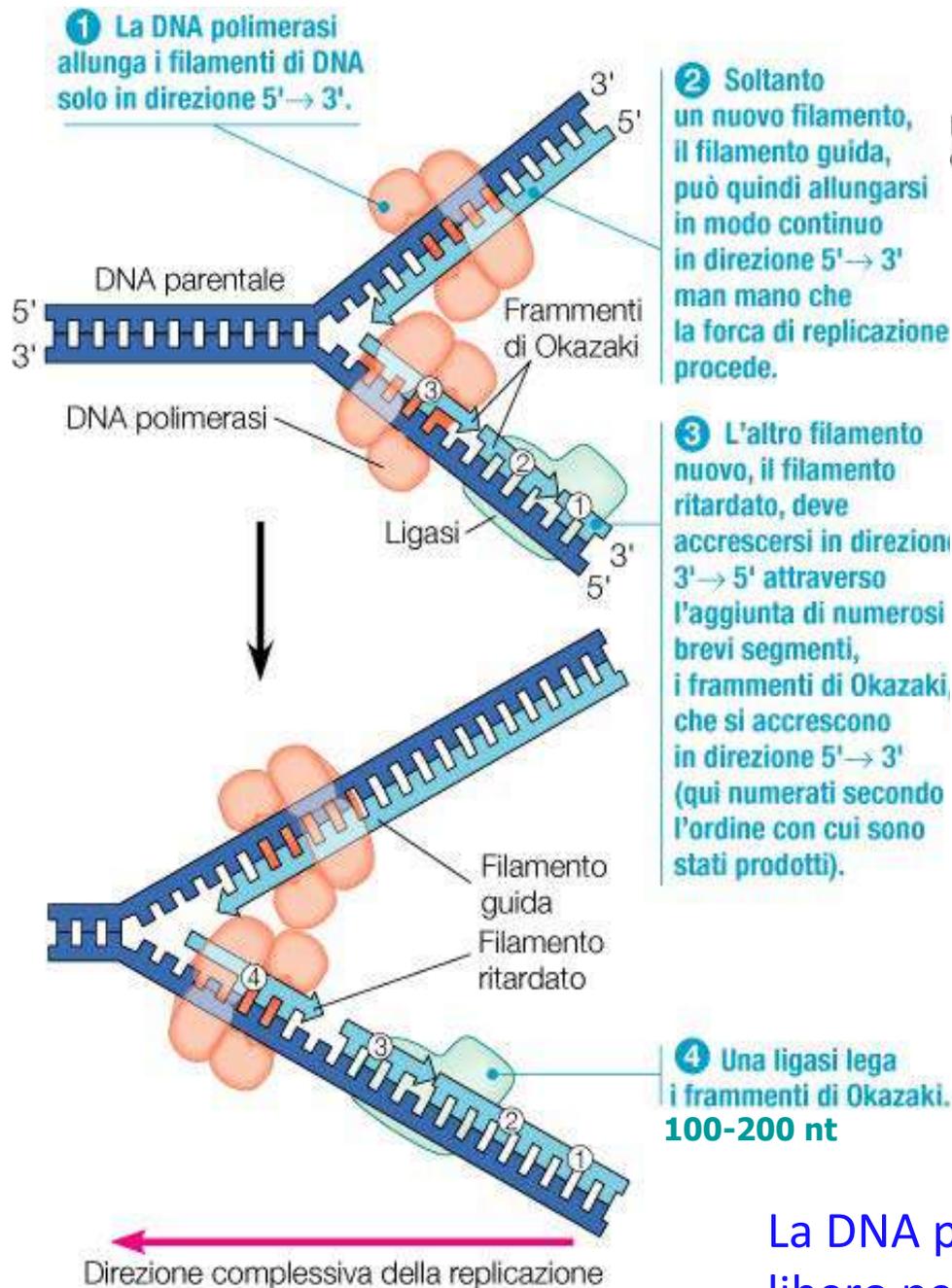
Sintesi del filamento guida

Sintesi del filamento ritardato

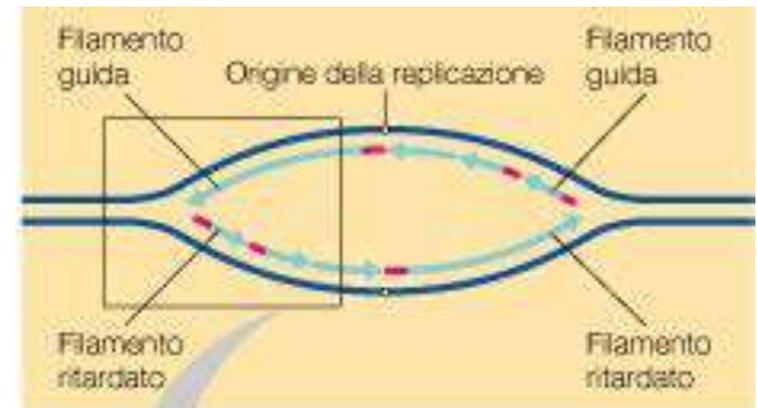
Innesco	Primasi	Innesco per i frammenti di Okazaki	Primasi
Allungamento	DNA polimerasi	Allungamento dei frammenti	DNA polimerasi
Sostituzione dell'innesco di RNA con DNA	DNA polimerasi	Sostituzione dell'innesco di RNA con DNA	DNA polimerasi
		Unione dei frammenti	Ligasi

Innesco = primer





La DNA polimerasi ha bisogno di un 3' libero per iniziare la sintesi

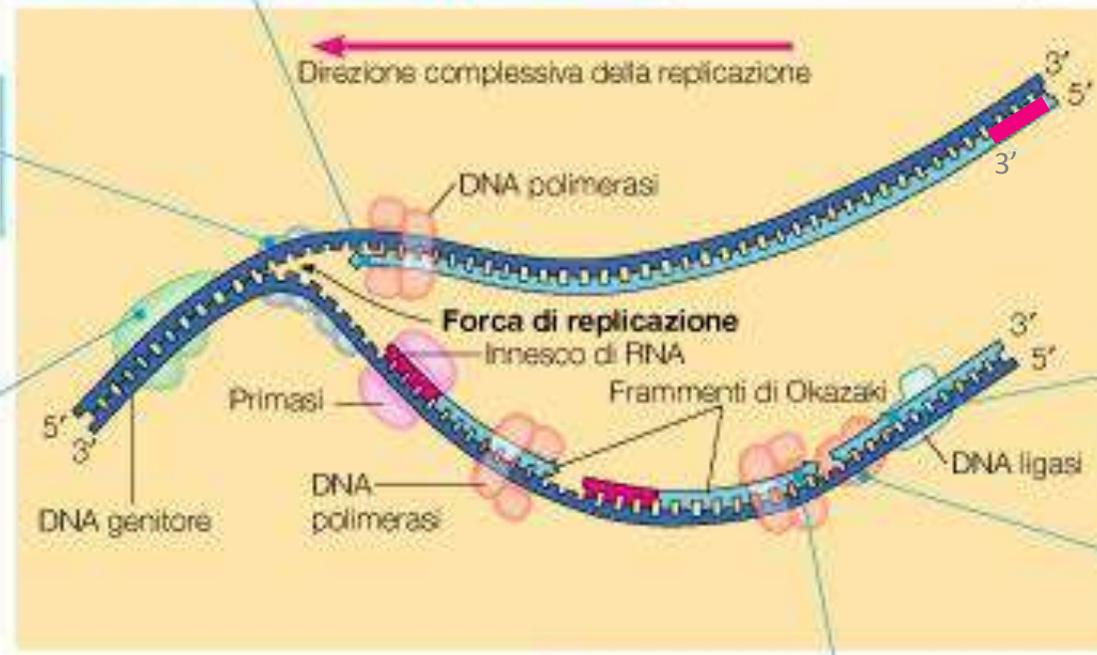


SCHEMA RIASSUNTIVO

3 Il filamento guida è sintetizzato in modo continuo in direzione 5'-3' dalla DNA polimerasi.

2 Le proteine che legano il singolo filamento stabilizzano la porzione svolta del DNA parentale.

1 L'elicasi svolge la doppia elica parentale.



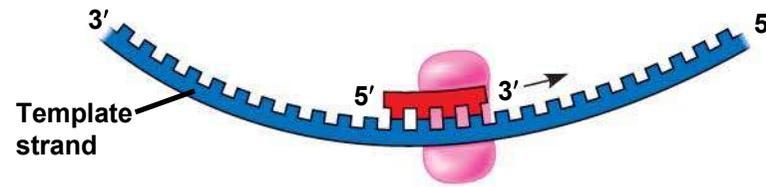
6 La DNA ligasi unisce i frammenti di Okazaki del filamento in accrescimento.

5 Un'altra DNA polimerasi sostituisce l'innescio di RNA con DNA.

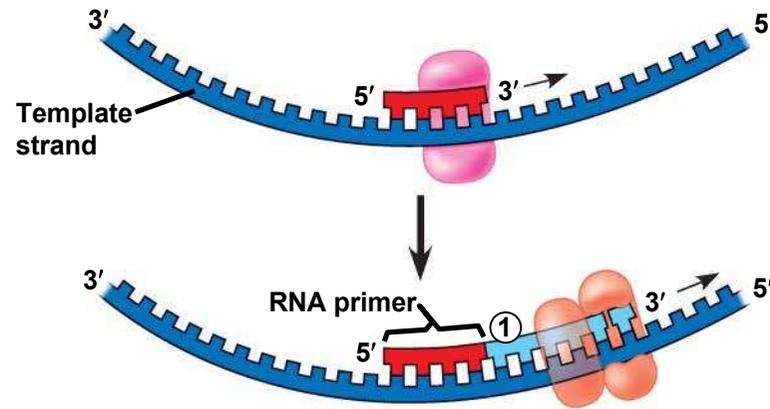
4 Il filamento ritardato è sintetizzato in modo discontinuo. La primasi sintetizza un breve innescio di RNA che è allungato dalla DNA polimerasi per formare un frammento di Okazaki.



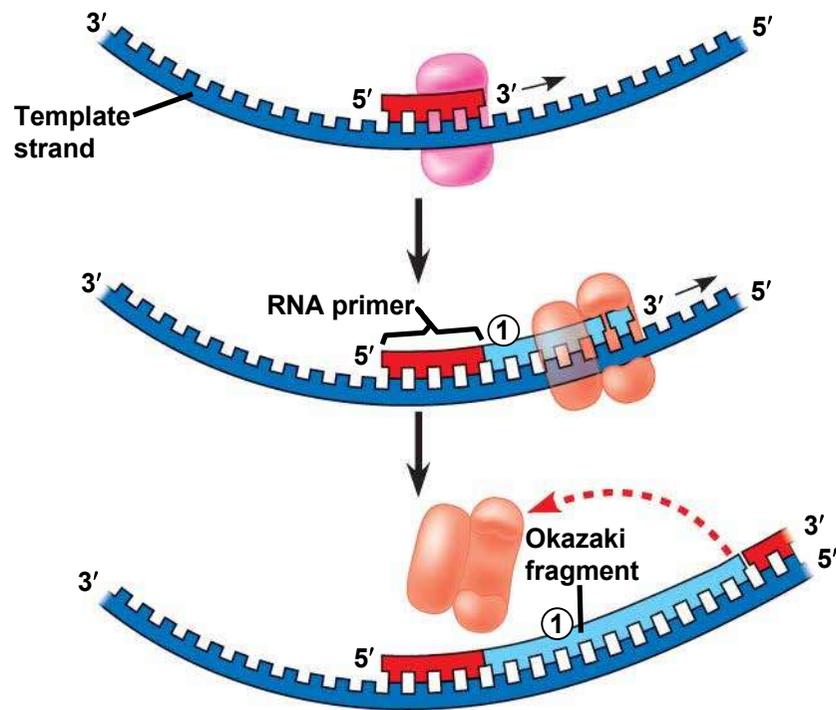
La sintesi del filamento ritardato avviene mediante l'uso di diversi primer di RNA che forniscono un 3' libero alla DNA polimerasi



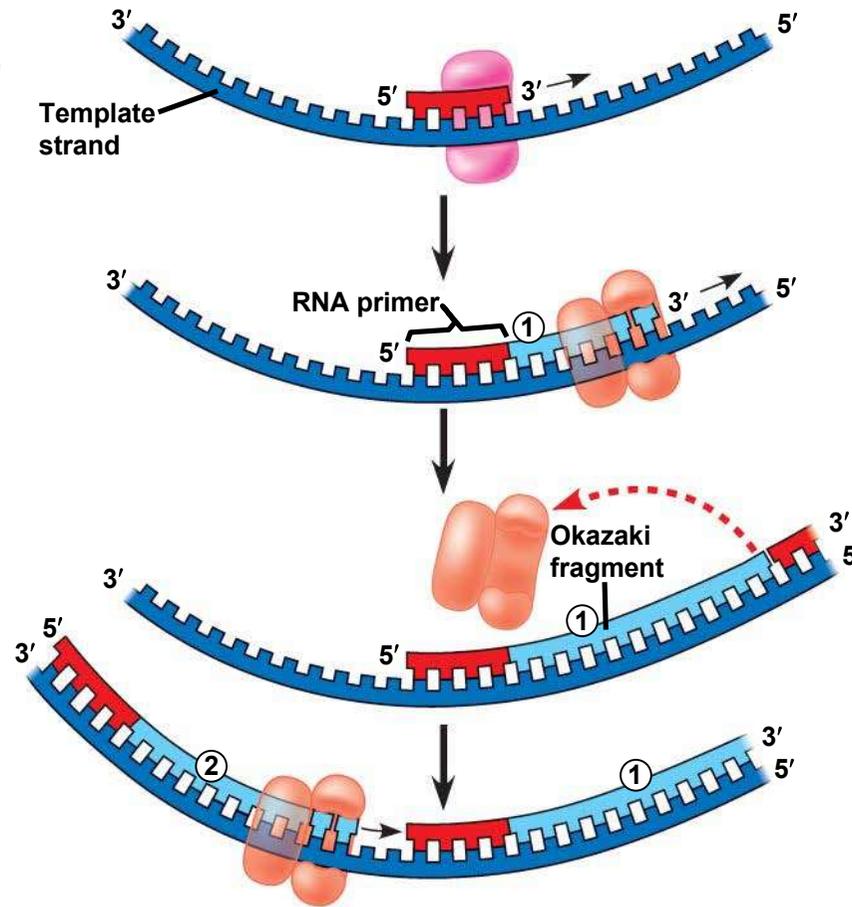
La sintesi del filamento ritardato avviene mediante l'uso di diversi primer di RNA che forniscono un 3' libero alla DNA polimerasi



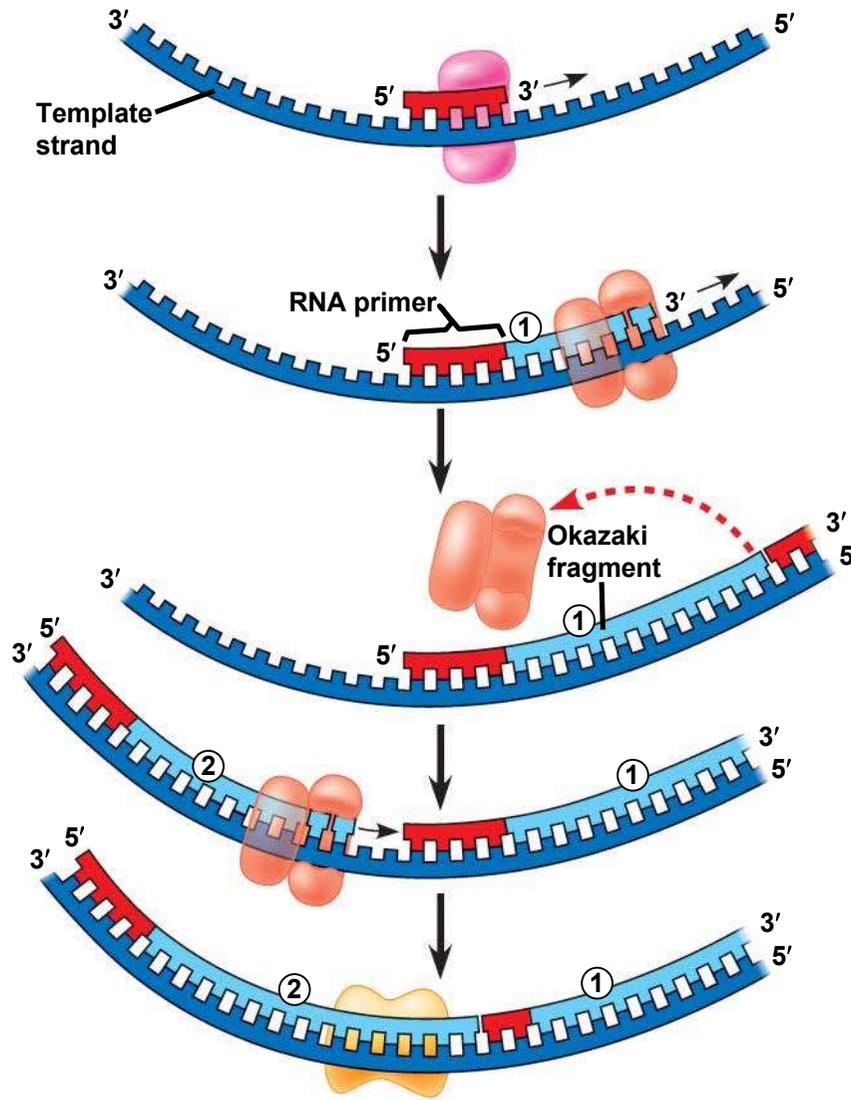
La sintesi del filamento ritardato avviene mediante l'uso di diversi primer di RNA che forniscono un 3' libero alla DNA polimerasi



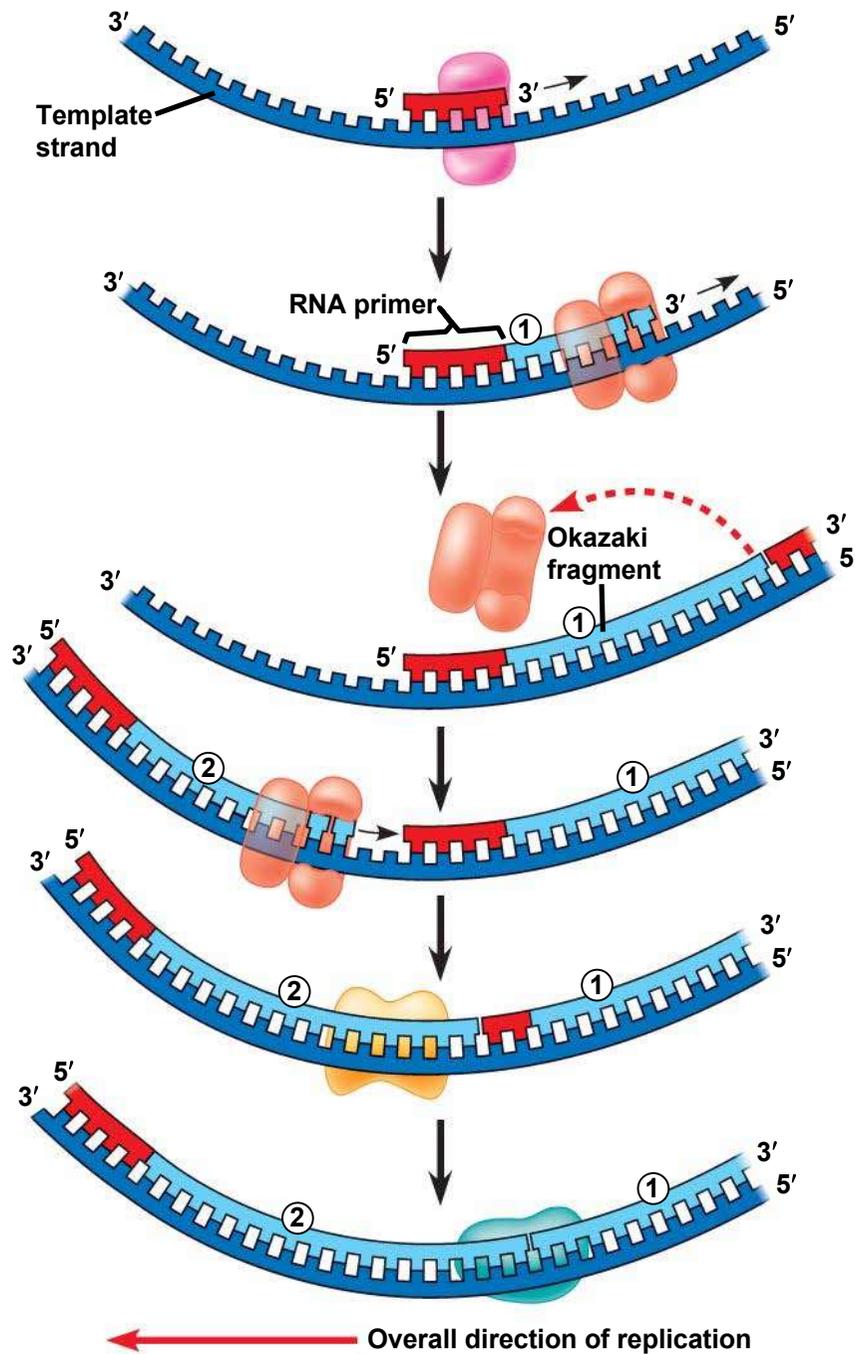
La sintesi del filamento ritardato avviene mediante l'uso di diversi primer di RNA che forniscono un 3' libero alla DNA polimerasi



La sintesi del filamento ritardato avviene mediante l'uso di diversi primer di RNA che forniscono un 3' libero alla DNA polimerasi



La sintesi del filamento ritardato avviene mediante l'uso di diversi primer di RNA che forniscono un 3' libero alla DNA polimerasi



Parte terza

Il sequenziamento del DNA

Il sequenziamento del DNA determina la struttura primaria di un frammento di DNA, cioè l'ordine secondo il quale i nucleotidi sono allineati lungo il filamento di DNA

5'-ACCGTAATTCTGGCTAAACCGTTACCCCAA-3'

Il sequenziamento del DNA può essere effettuato secondo due modalità:

- Attraverso i terminatori di catena
- Attraverso le piattaforme HTS

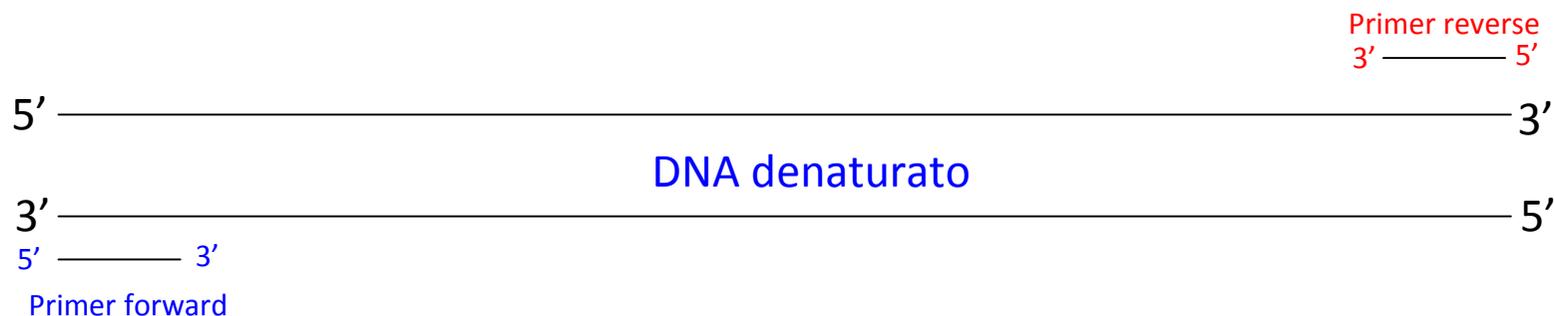


La reazione di sequenziamento avviene con le stesse modalità di quella della replicazione del DNA, con alcune differenze:

- 1) Non si forma il filamento ritardato
- 2) Non si formano i frammenti di Okazaki
- 3) Non intervengono le proteine SSB e la ligasi (la ligasi è usata in un tipo di sequenziamento HTS)

Sono, invece necessari:

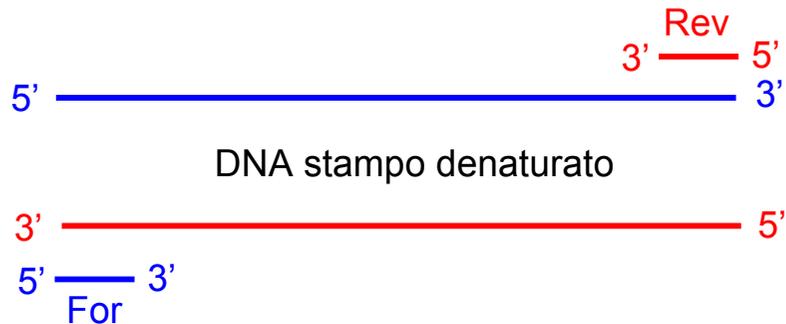
- 1) La denaturazione del DNA per separare i due filamenti
- 2) Una coppia di primer denominati forward e reverse specifici per ciascun filamento
- 3) La DNA polimerasi
- 4) I deossinucleosidi trifosfati (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), legati da una molecola che emette fluorescenza (fluoroforo)
- 5) In alcune reazioni i dideoxinucleosidi trifosfati (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) legati da una molecola che emette fluorescenza (fluoroforo)



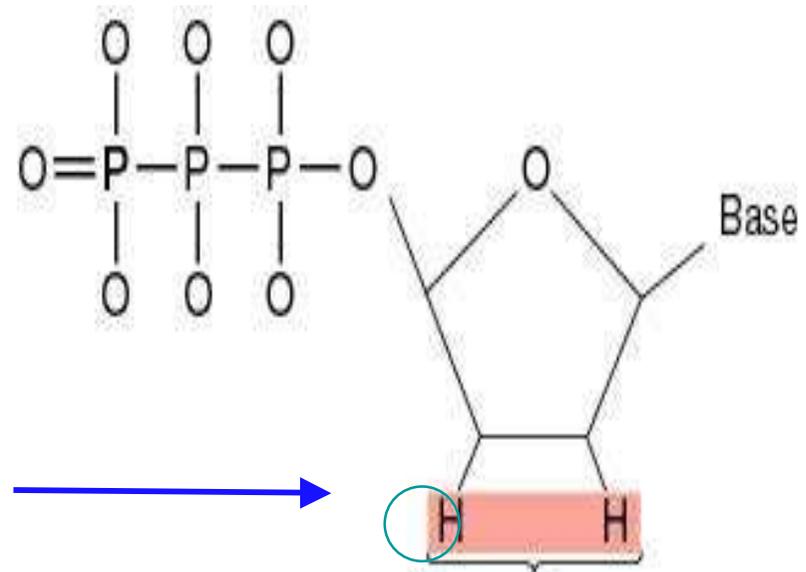
Sequenziamento mediante i terminatori di catena (chain-termination method)

Determinazione della sequenza nucleotidica:

Il metodo dei terminatori di catena o di Sanger usa i dideoxynucleotidi, una coppia di primer (*Forward* e *Reverse*) per determinare la sequenza su entrambi i filamenti e la DNA polimerasi



Nei dideoxynucleotidi manca il gruppo ossidrilico in 3'

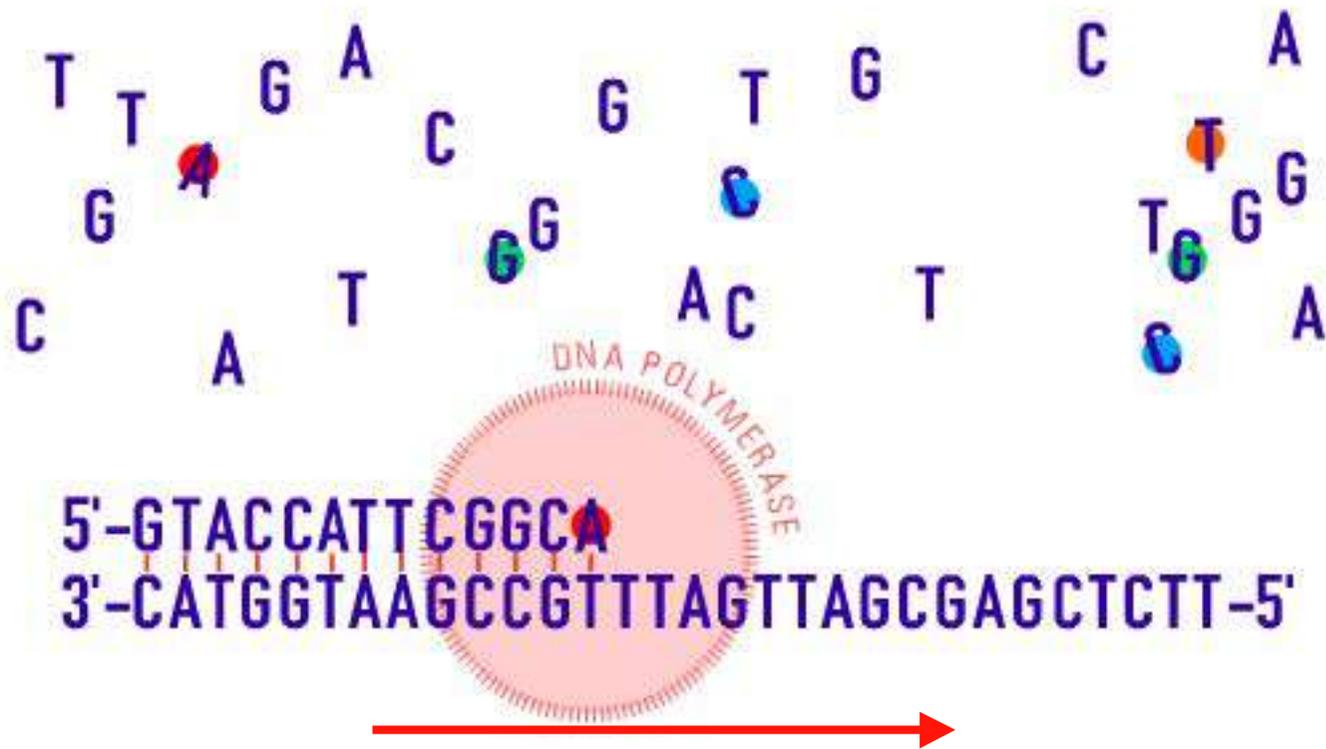
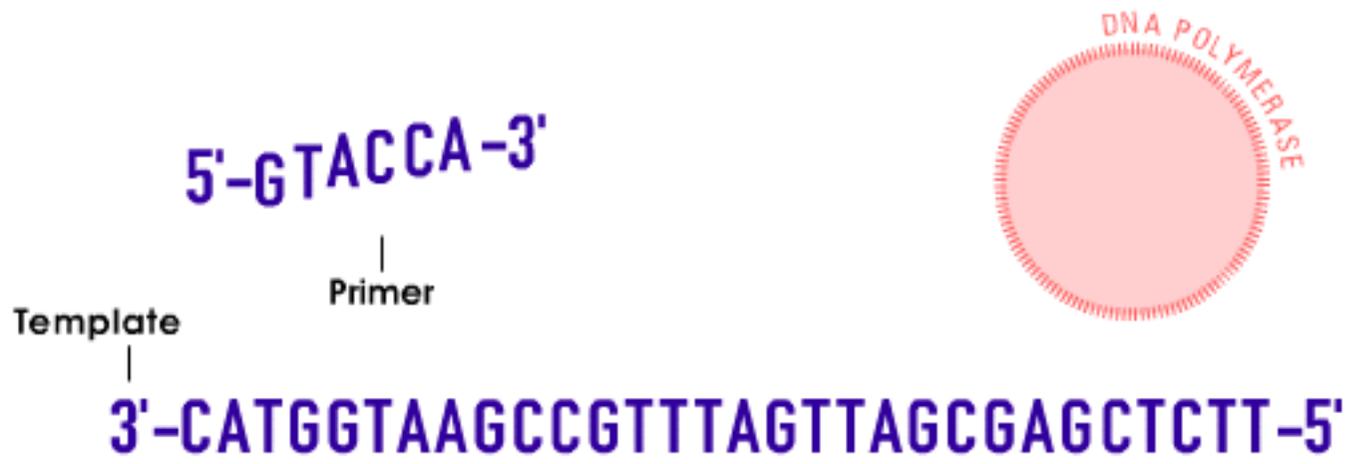


Non può formare un legame fosfodiesterico con il successivo dNTP in entrata



il DNA a doppio filamento viene estratto dalle cellule e denaturato per ottenere singoli filamenti

A questo punto il DNA è pronto per essere sequenziato



Dideossinucleotidi



5'-GTACCATTTCG

5'-GTACCATTTCGG

5'-GTACCATTTCGGC

5'-GTACCATTTCGGCA

5'-GTACCATTTCGGCAA

5'-GTACCATTTCGGCAAA

5'-GTACCATTTCGGCAAAT

3'-CATGGTAAGCCGTTTAGTTAGCGAGCTCTT-5'

5-GTACCATTCC
5-GTACCATTCCG
5-GTACCATTCCGG
5-GTACCATTCCGGC
5-GTACCATTCCGGCA
5-GTACCATTCCGGCAA
5-GTACCATTCCGGCAAA

Prodotti di reazione

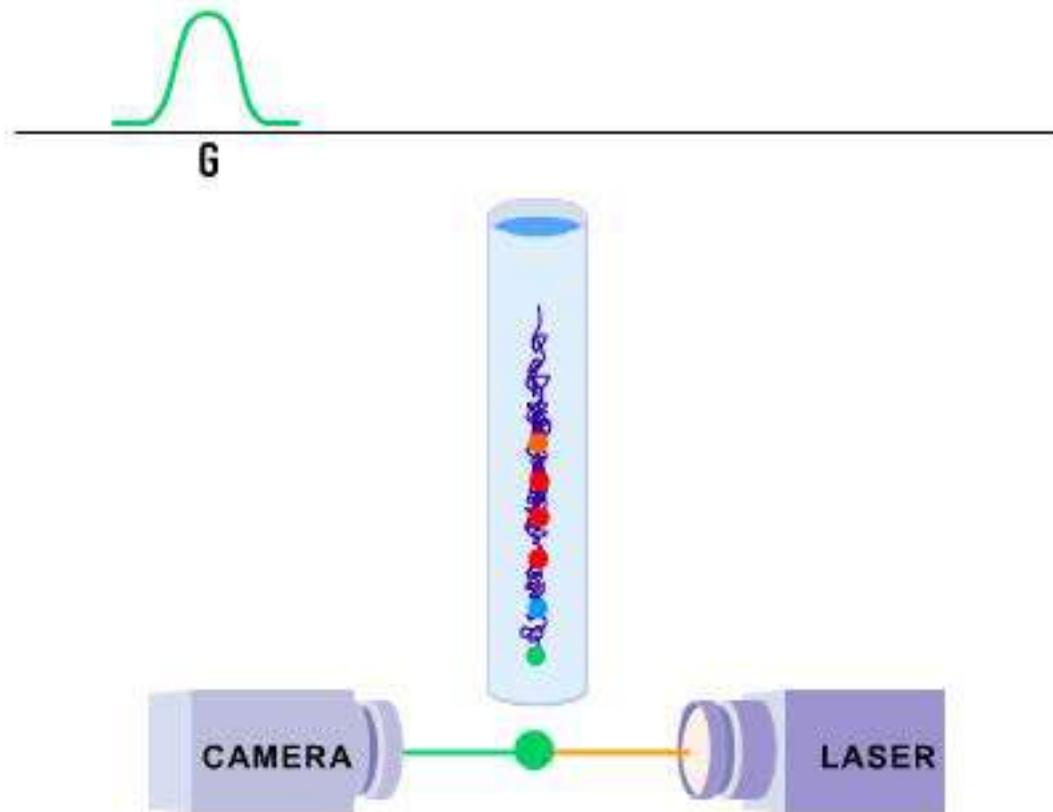
Gel capillare di poliacrilammide

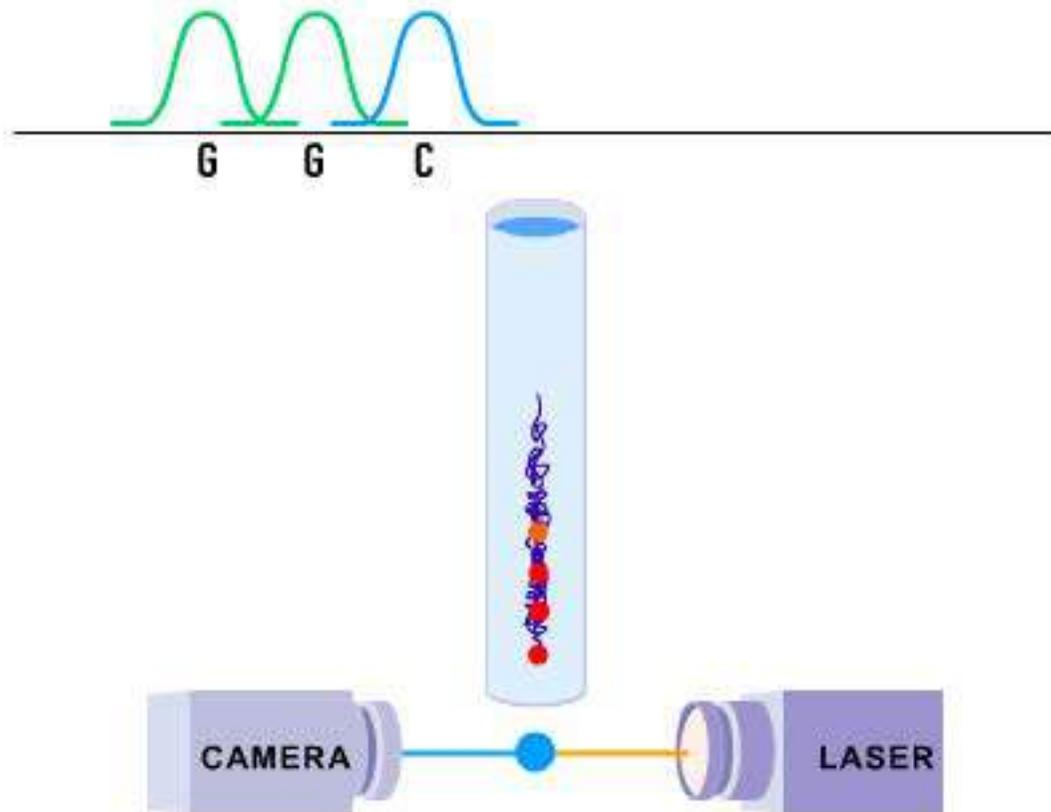


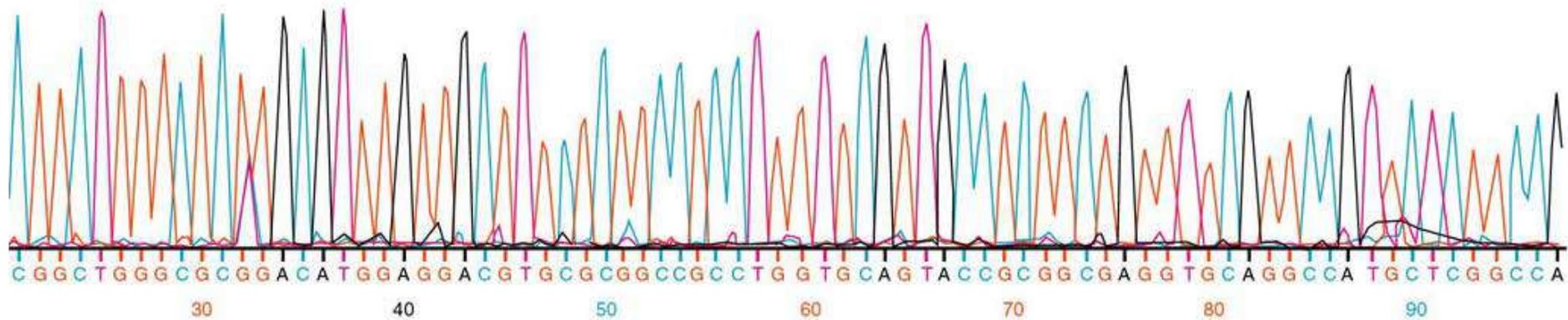
-
Le molecole si muovono
con velocità inversamente
proporzionale alla loro
dimensione

+

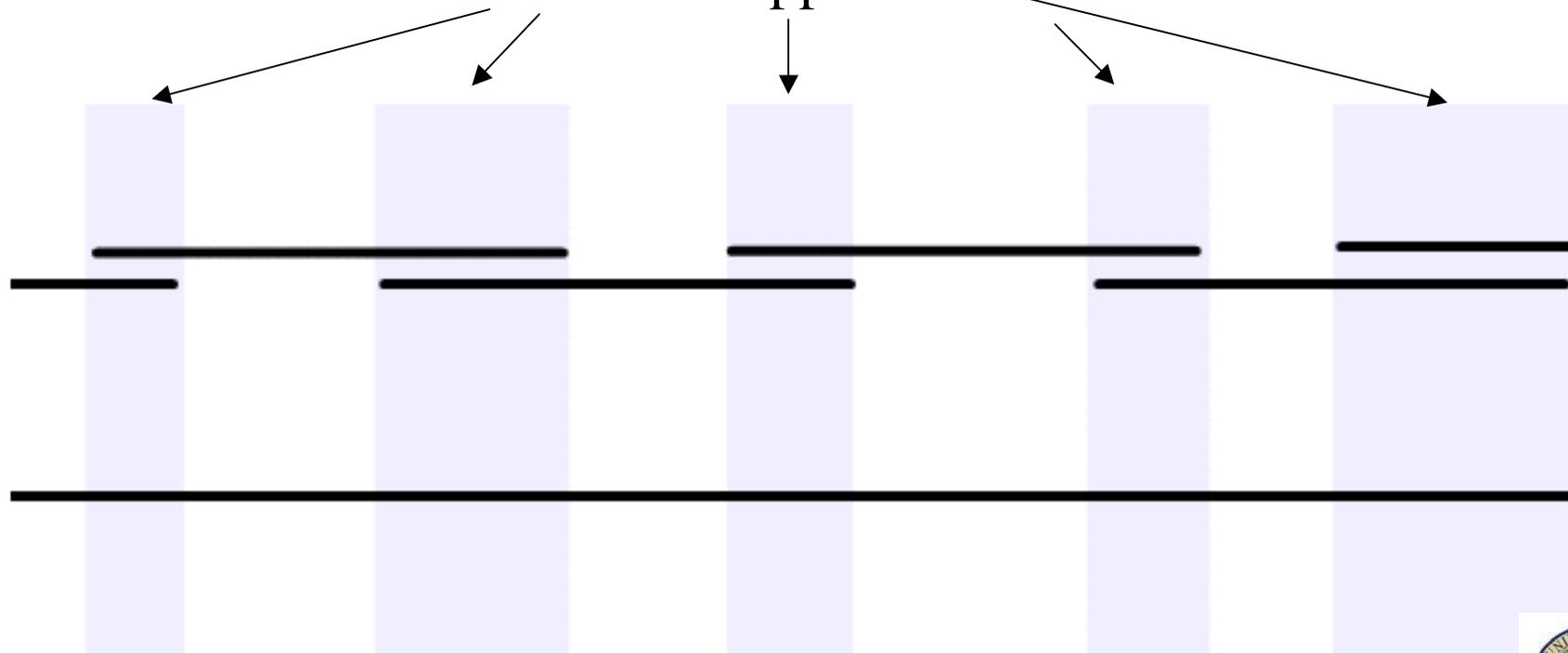








Zone di sovrapposizione



Quindi, per il sequenziamento con i terminatori di catena:

- 1) Occorre conoscere almeno in parte la sequenza nucleotidica del frammento da sequenziare per poter disegnare i primer
- 2) Il sequenziamento riguarda solo il frammento del genoma che si è scelto come bersaglio
- 3) La lunghezza del frammento sequenziato con la coppia di primer scelti è di 600-650 nt, nelle condizioni più favorevoli

Il sequenziamento HTS non dipende dalla conoscenza a priori di parte della sequenza nucleotidica per poter disegnare i primer poiché questi, denominati più correttamente adattatori, sono sintetizzati in laboratorio e semplicemente ligati alle estremità del frammento da sequenziare

I frammenti sequenziati hanno una lunghezza variabile da 15-20 nucleotidi fino a 200-300 nucleotidi

Esistono diverse piattaforme di sequenziamento, ad esempio:

- 454 o pirosequenziamento (Roche)
- Sequenziamento mediante ligasi (SOLID-Applied Biosciences)
- Sequenziamento mediante sintesi (Illumina)
- Sequenziamento di singole molecole (SMART-PacBio)
- Ion Torrent (thermo Scientific)

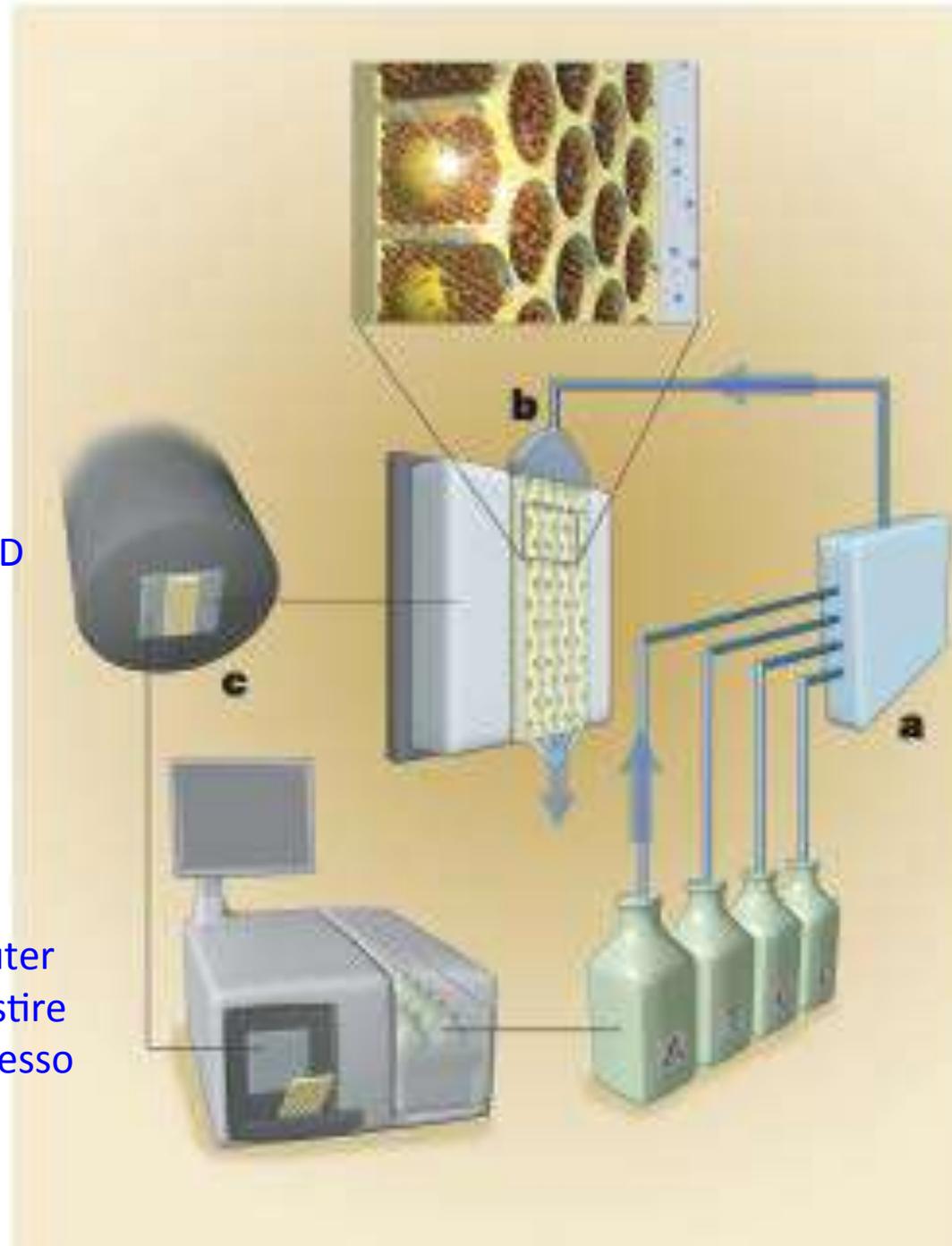
I componenti base
del sequenziamento
HTS

Camera CCD

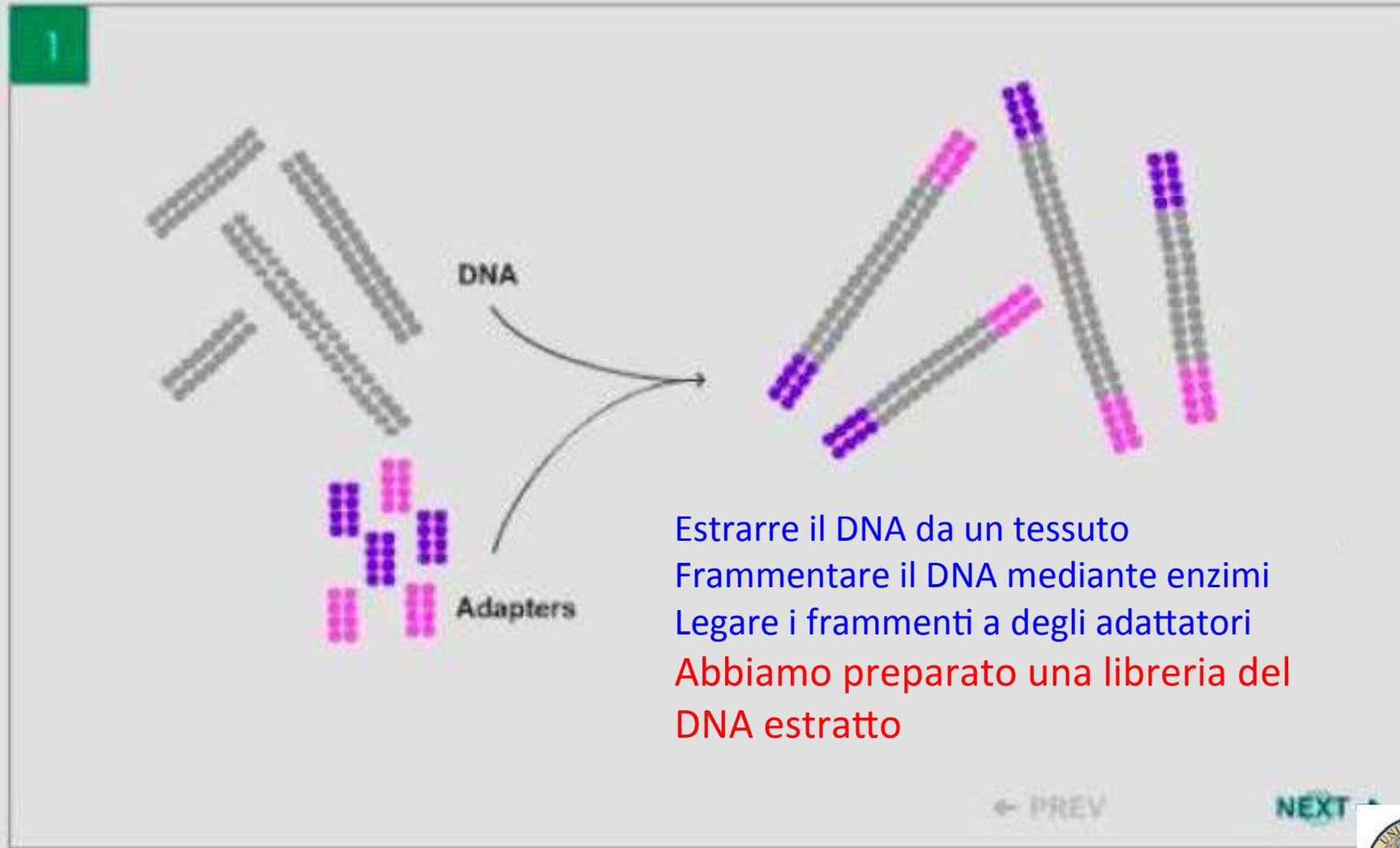
Computer
per gestire
il processo

Celle
di reazione

Circuito
microfluidico



Sequenziamento mediante sintesi (metodo Illumina)



Estrarre il DNA da un tessuto
Frammentare il DNA mediante enzimi
Legare i frammenti a degli adattatori
Abbiamo preparato una libreria del
DNA estratto

← PREV

NEXT →



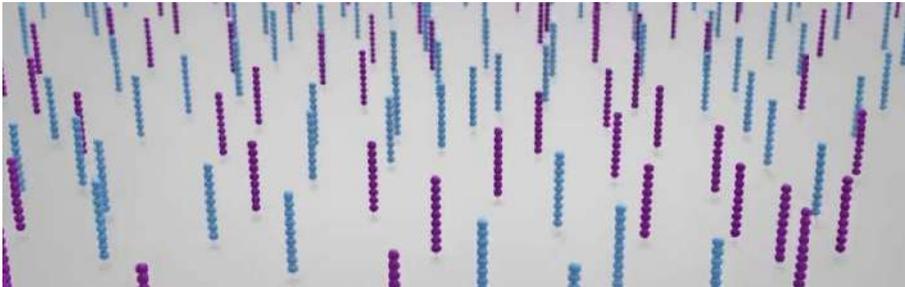
Sequenziamento mediante sintesi (metodo Illumina)



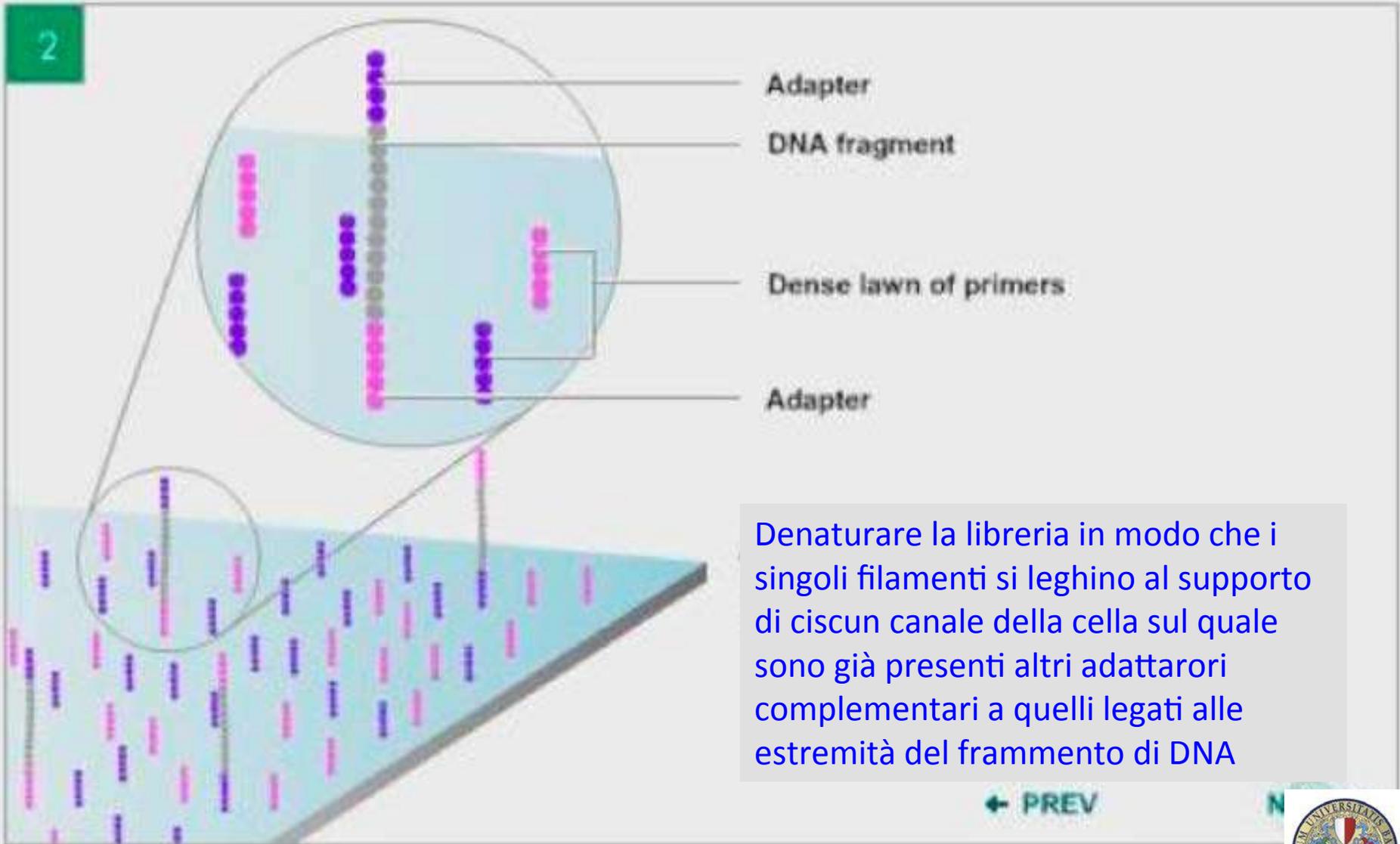
Cella microfluidica in cui sono presenti 8 canali



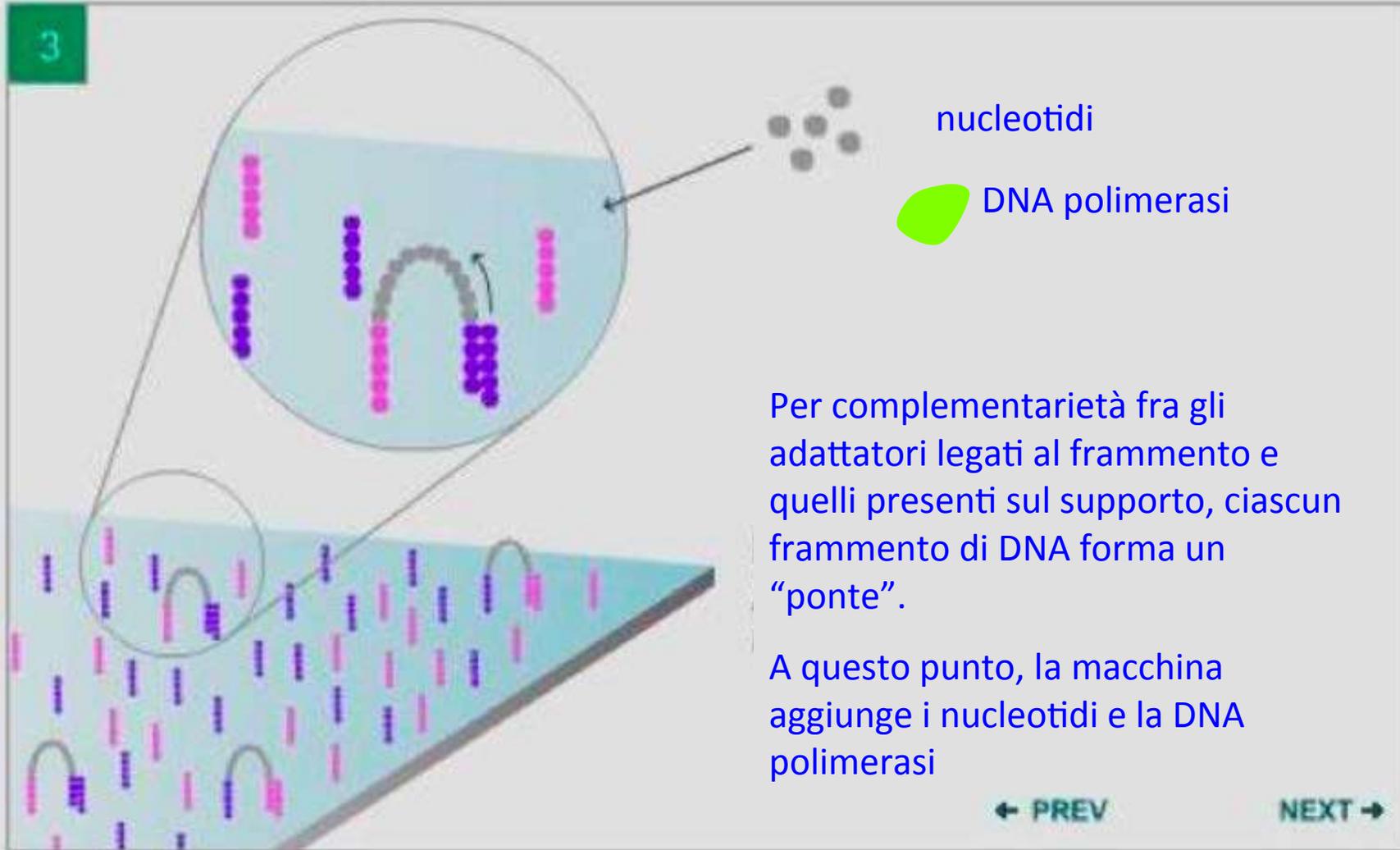
Ciascun canale è ricoperto da oligonucleotidi complementari agli adattatori legati alle estremità dei frammenti di DNA da sequenziare



Sequenziamento mediante sintesi (metodo Illumina)



Sequenziamento mediante sintesi (metodo Illumina)



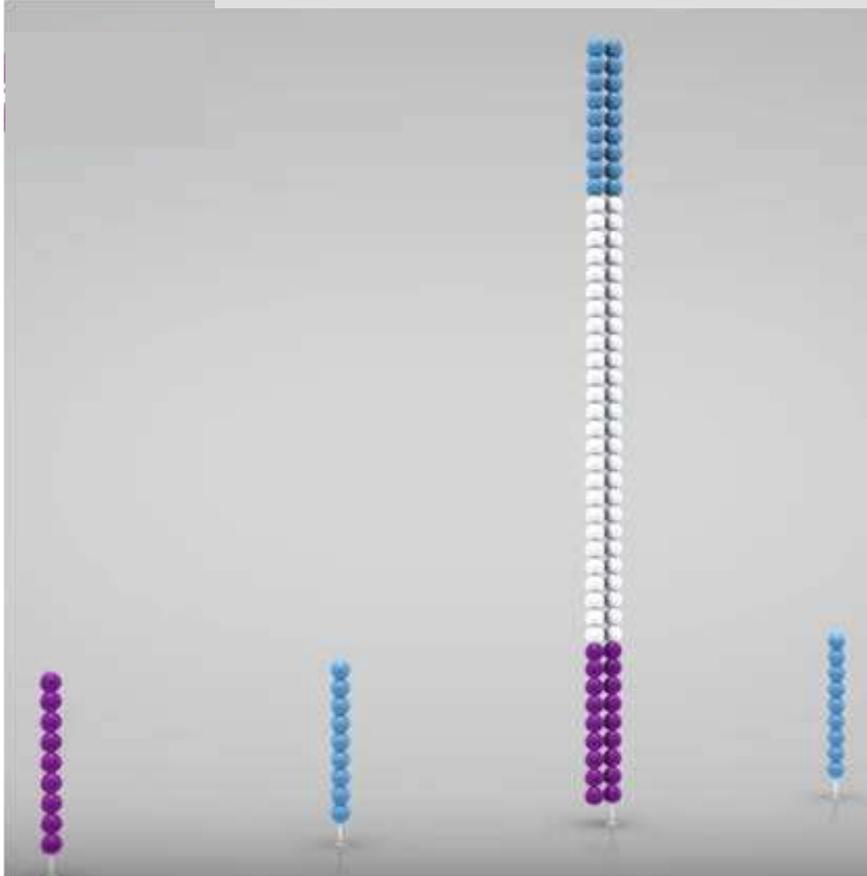
Sequenziamento mediante sintesi (metodo Illumina)

Formazione di gruppi (cluster)
di frammenti molto densi

L'adattatore legato al supporto
funziona come un primer con un 3' libero,
quindi la DNA polimerasi sintetizza il
filamento complementare utilizzando i
nucleotidi che la macchina ha aggiunto
alla reazione

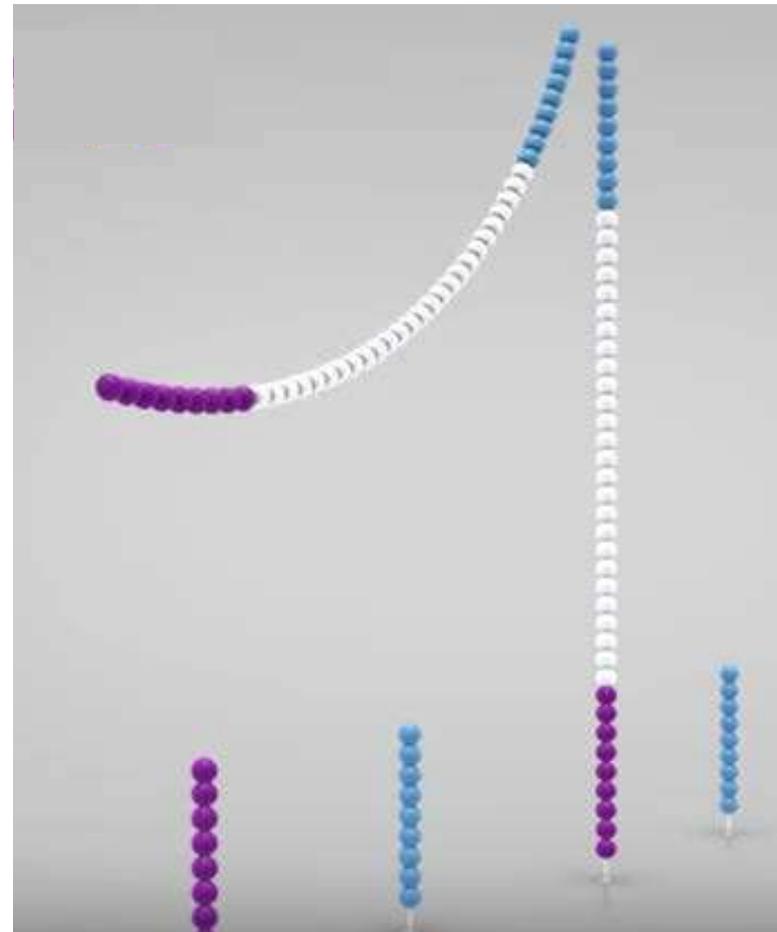


Sequenziamento mediante sintesi (metodo Illumina)



Il DNA viene denaturato e ciascun filamento può formare dei “ponti” per complementarità con altri adattatori ancorati al supporto

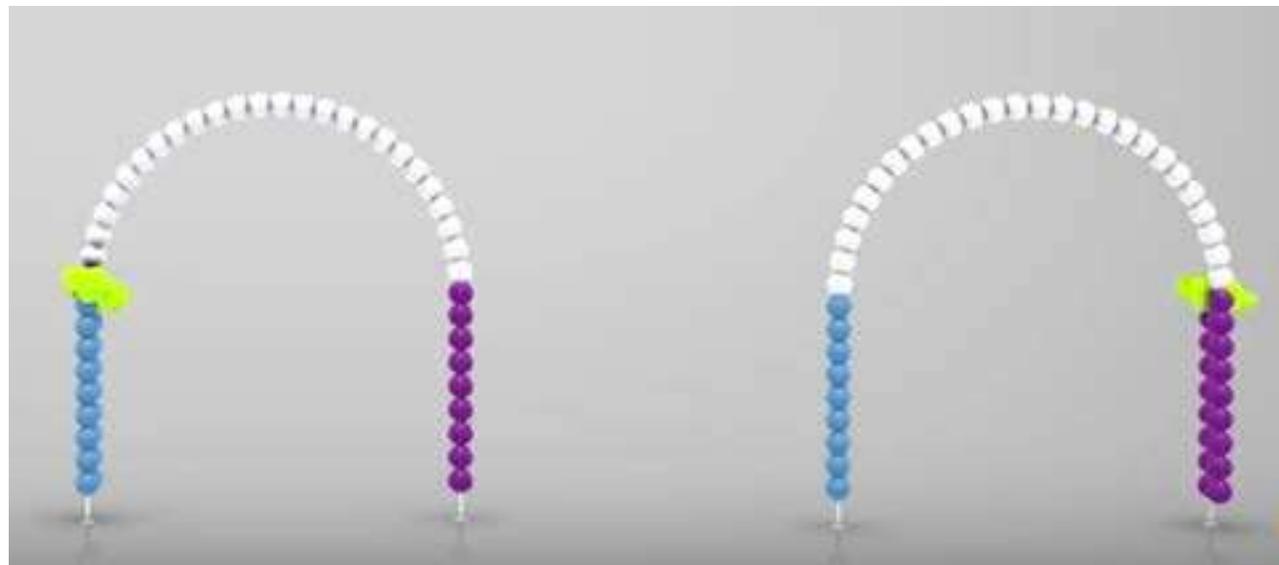
Formazione di gruppi (cluster) di frammenti molto densi



Sequenziamento mediante sintesi (metodo Illumina)

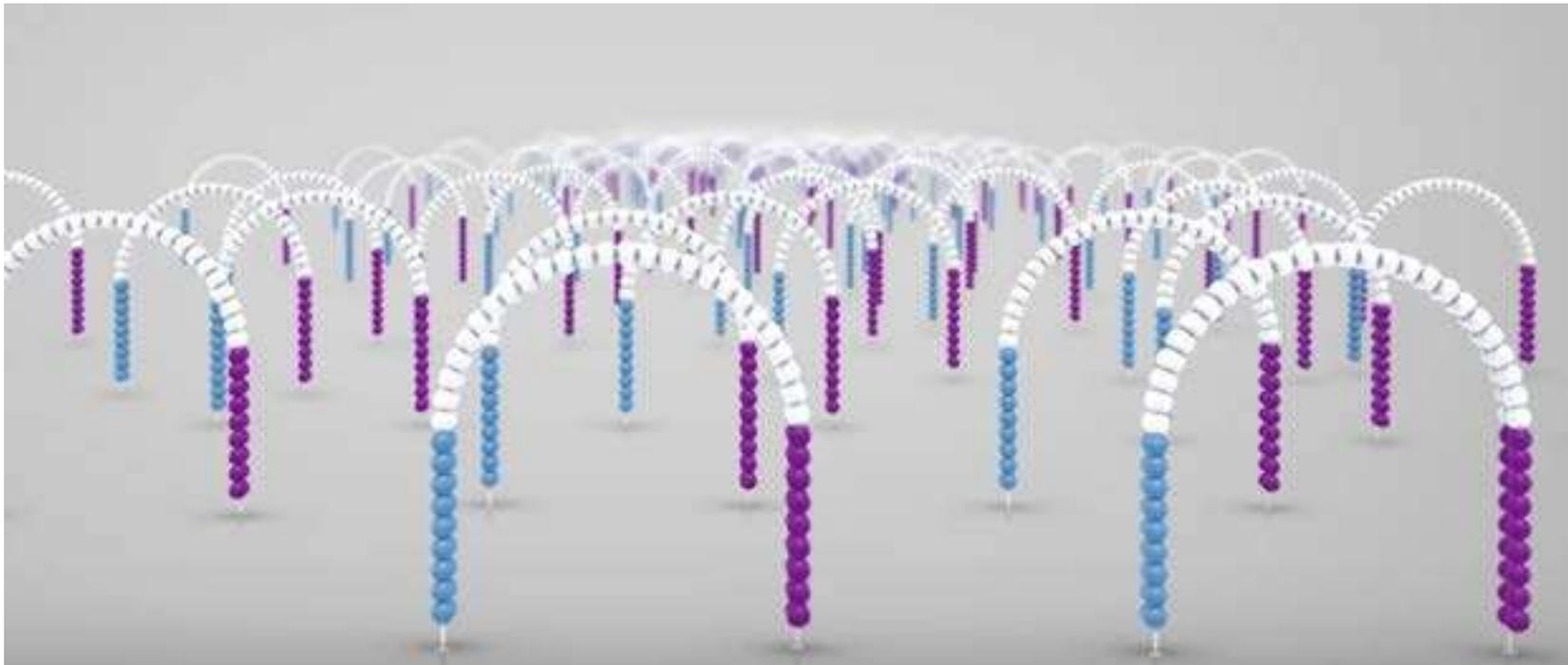


Formazione di gruppi (cluster)
di frammenti molto densi

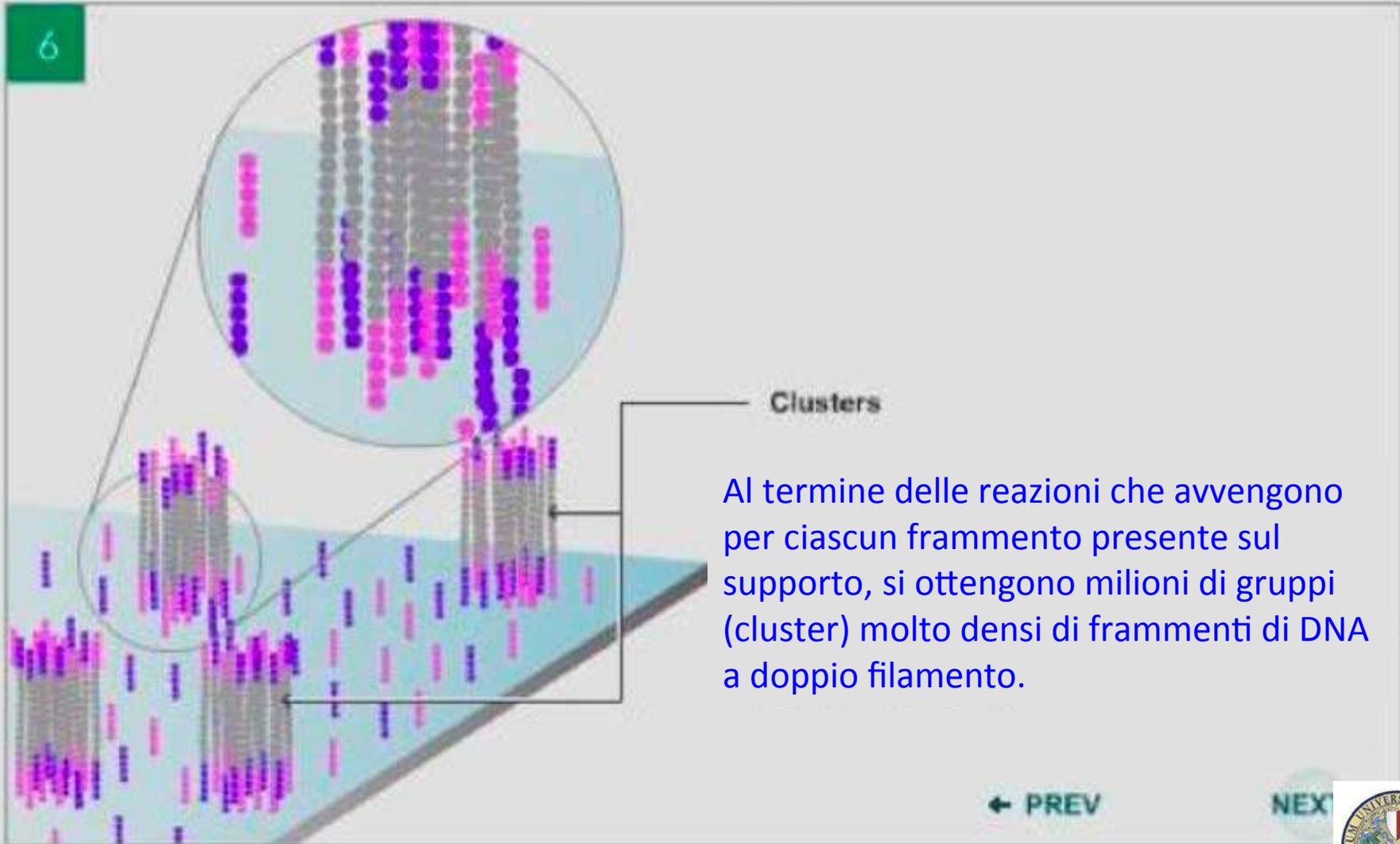


Sequenziamento mediante sintesi (metodo Illumina)

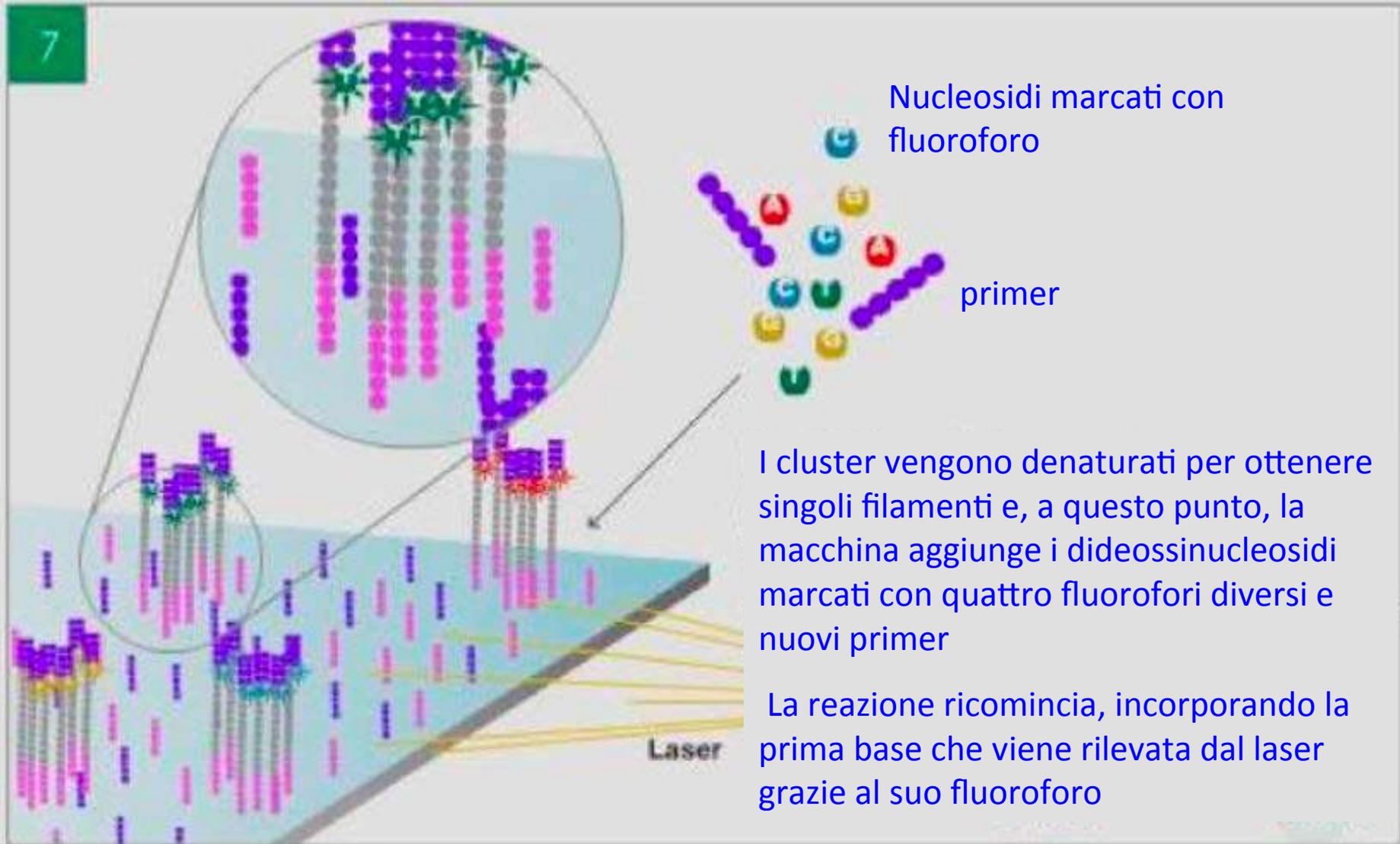
Formazione di gruppi (cluster)
di frammenti molto densi



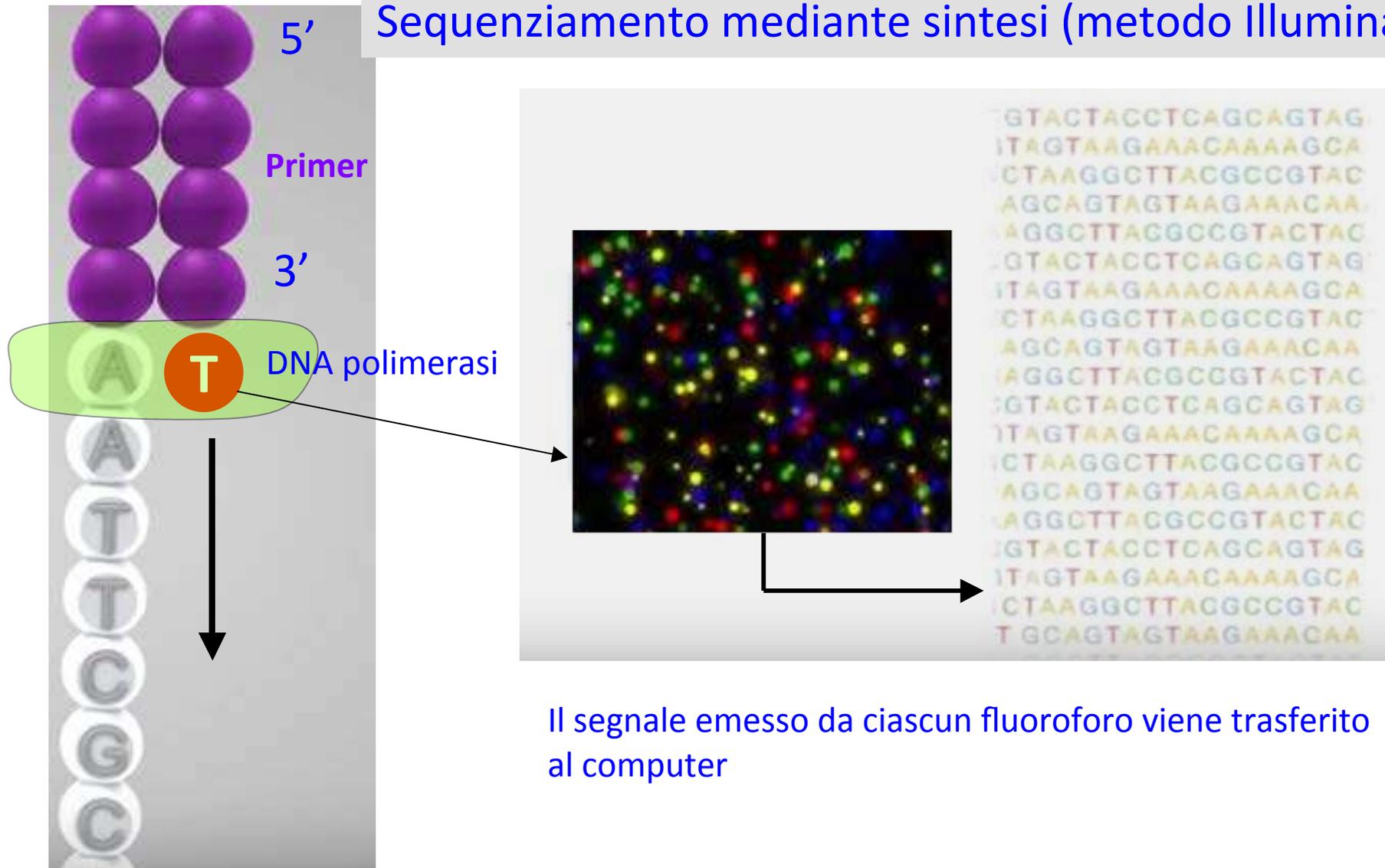
Sequenziamento mediante sintesi (metodo Illumina)



Sequenziamento mediante sintesi (metodo Illumina)

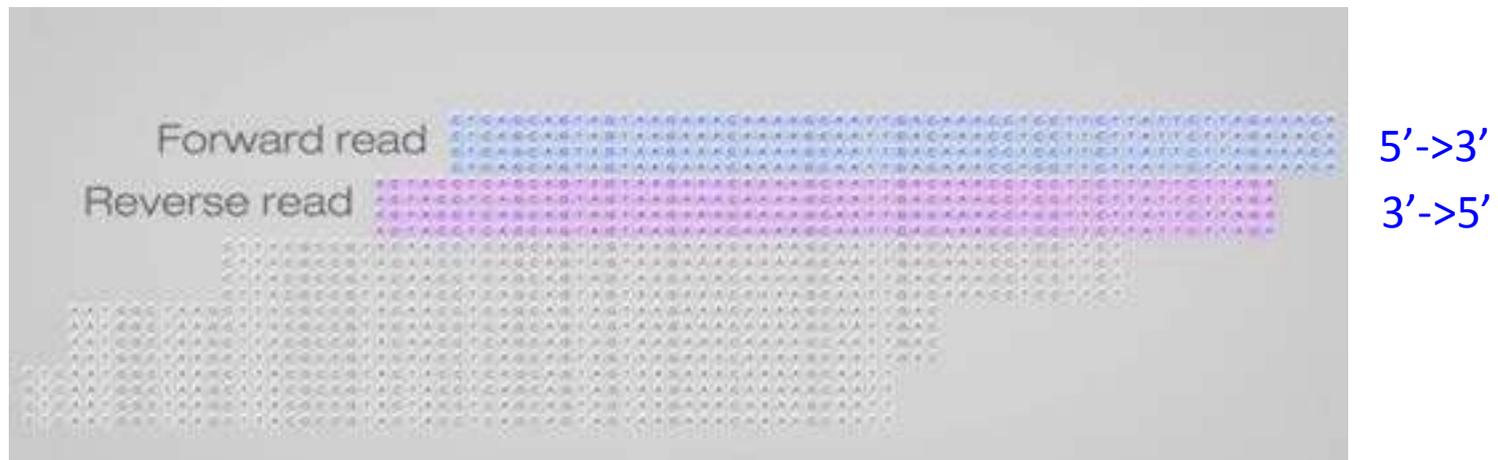


Sequenziamento mediante sintesi (metodo Illumina)



Il segnale emesso da ciascun fluoroforo viene trasferito al computer

La DNA polimerasi sintetizza un nuovo filamento per ciascuno dei frammenti legati al supporto, utilizzando i primer ed nucleotidi legati ai fluorofori



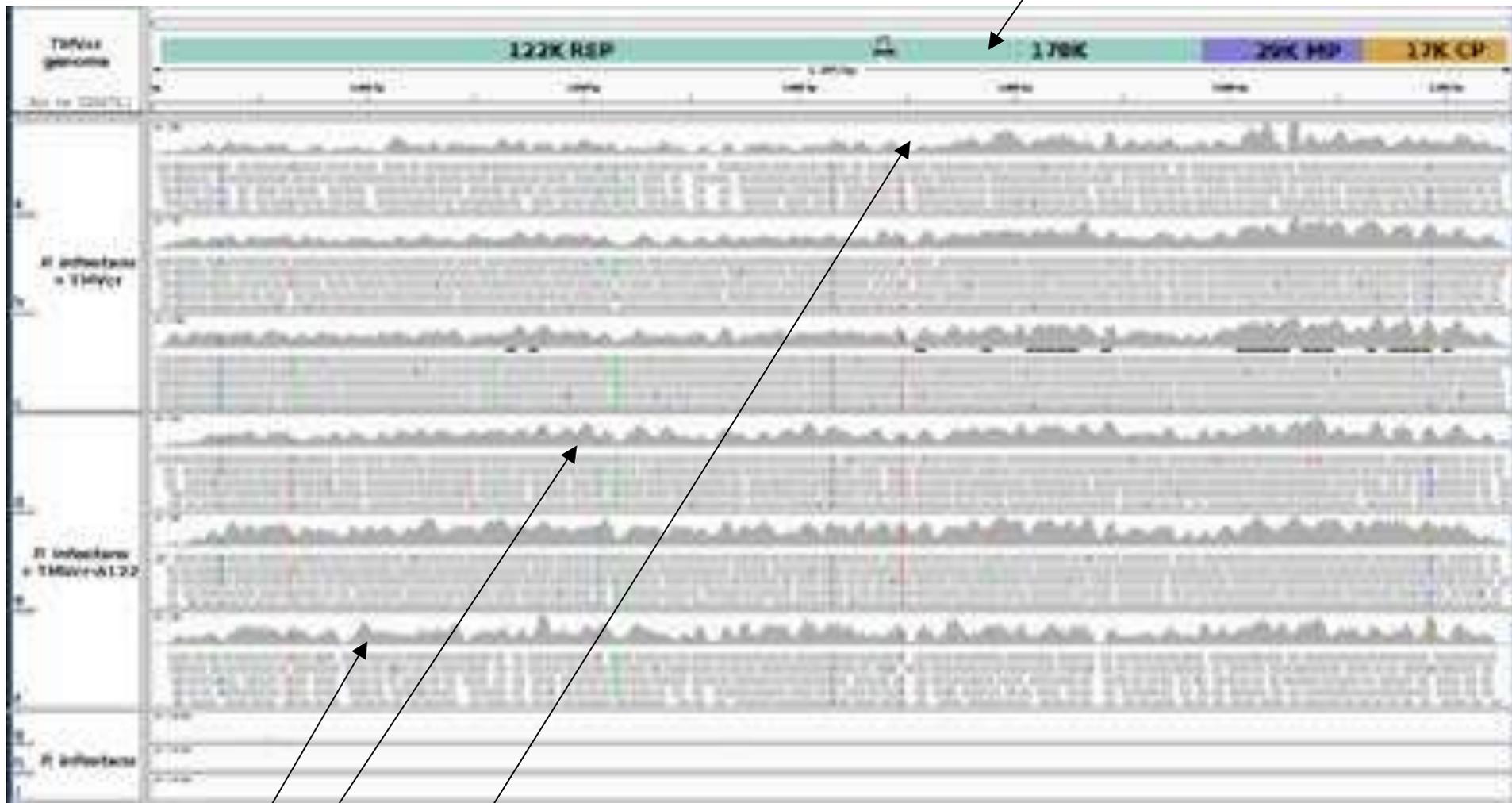
Al termine del sequenziamento avremo milioni di frammenti sequenziati in entrambe le direzioni (5'→3' e 3'→5') denominati **reads** che devono essere utilizzati per generare frammenti più lunghi denominati **contigs**, necessari per ricostruire la sequenza

Si utilizzano due modalità per assemblare i contigs e ricostruire la sequenza:

- **De novo assembly** (sequenze non disponibili in rete ricostruite mediante appositi algoritmi)
- **Assembly by similarity** (sequenze ricostruite mediante confronto con sequenze disponibili in rete)

Assemblaggio per similarità

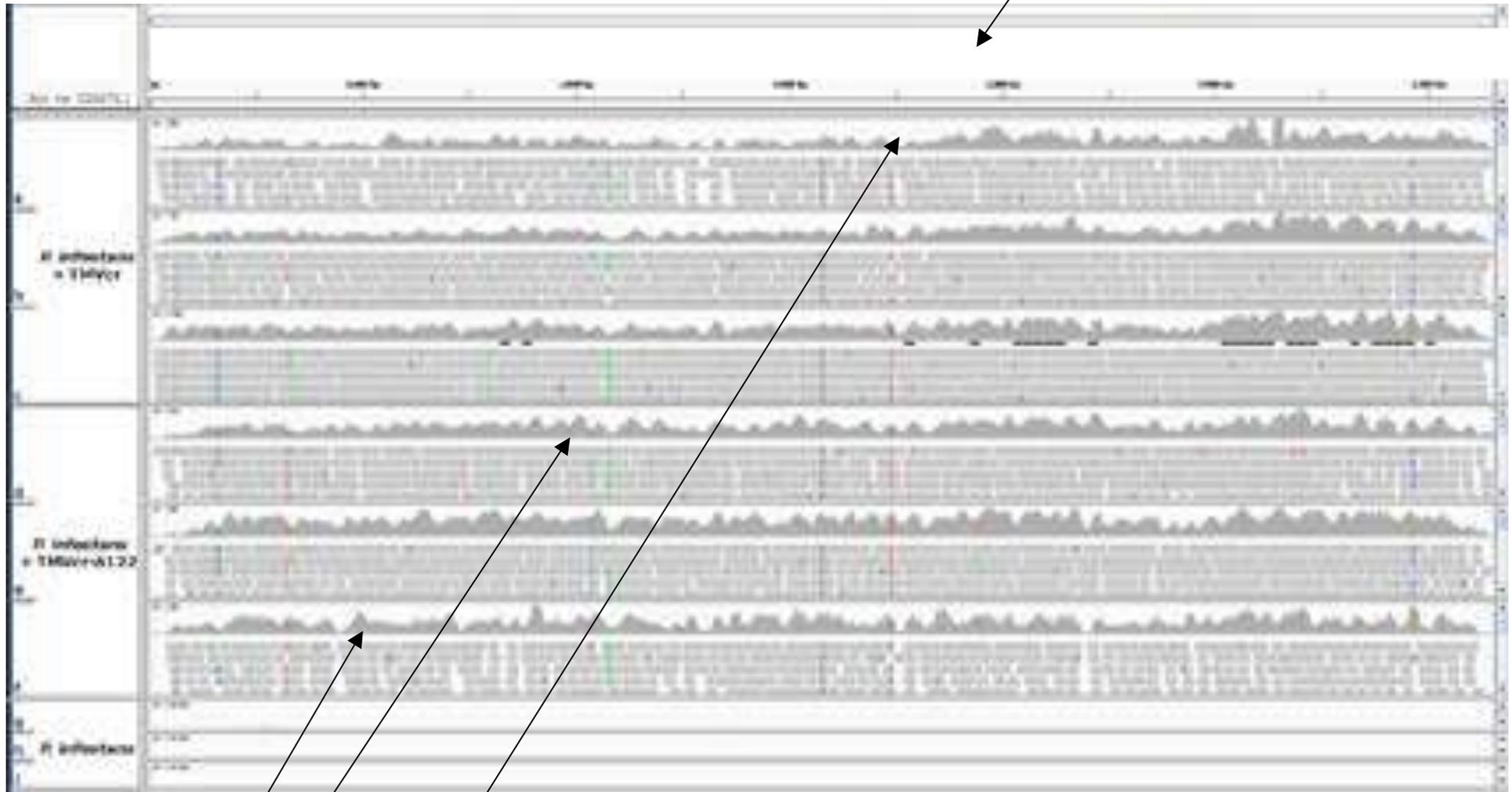
Sequenza disponibile in rete



Ricostruzione della sequenza assemblando le reads

Assemblaggio de novo

Nessuna sequenza disponibile in rete



Ricostruzione della sequenza assemblando le reads

Assemblaggio de novo

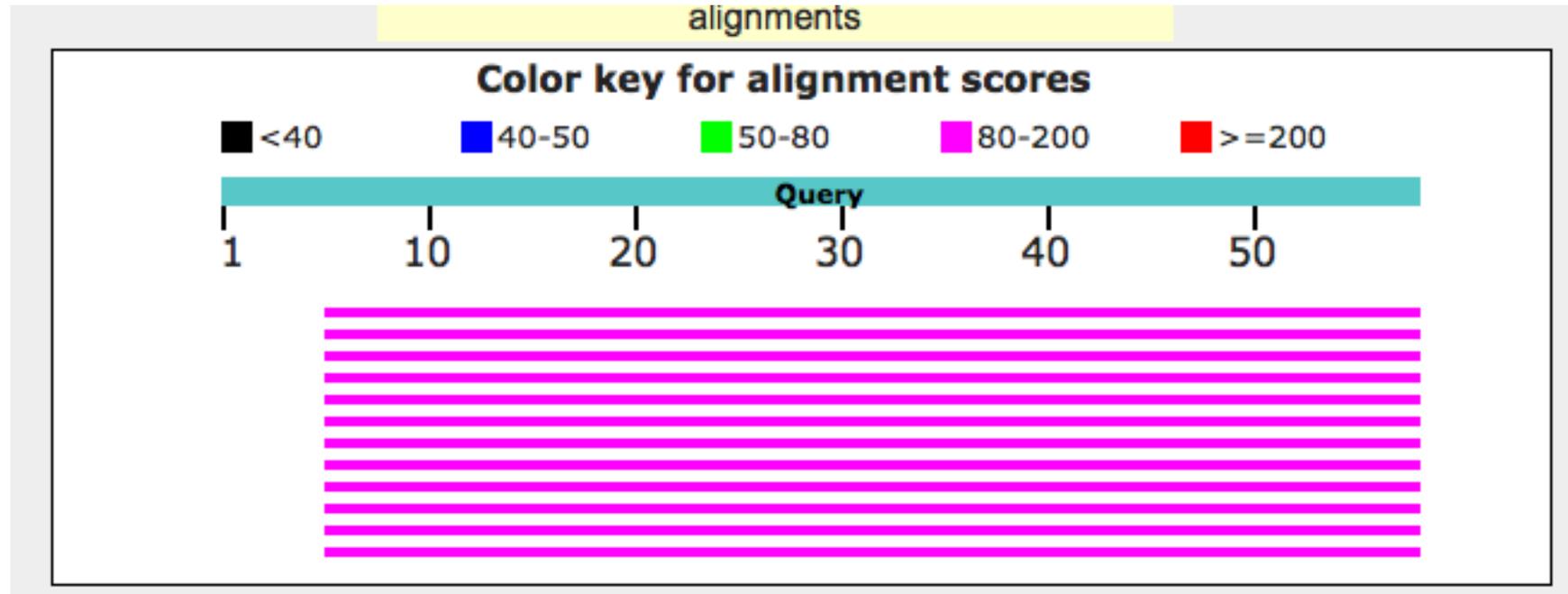
Sequenza ricostruita



Ricostruzione della sequenza assemblando le reads

Per capire a quale microrganismo può appartenere la sequenza ricostruita, devo, comunque, ricorrere alle risorse di rete

Basic Local Alignment Search Tool (**BLAST**) disponibile sul sito **NCBI** (National Center for Biotechnology Information)



Download v [GenBank](#) [Graphics](#)

Plant transient expression vector pMW391, complete sequence

Sequence ID: [JX971629.1](#) Length: 13207 Number of Matches: 1

Range 1: 9501 to 9553 [GenBank](#) [Graphics](#)

v Next Match ^ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
99.0 bits(53)	9e-18	53/53(100%)	0/53(0%)	Plus/Plus

Query	6	CCCGGATGTGTTTCCGGGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACCTGGCTGCAG	58
Sbjct	9501	CCCGGATGTGTTTCCGGGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACCTGGCTGCAG	9553



Utilizzazione dei dati di sequenziamento

Ogni “**entry**” di una banca dati deve essere identificata in modo univoco da un codice di riconoscimento invariabile, chiamato “accession number” da GenBank e “Identifier” da EMBL.

EMBL

Identifier (ID) Caratterizza in modo invariabile ogni entry EMBL. Viene citato in rapporti EMBL o in stringhe descrittive delle sequenze in formato FASTA.

Per es. in un documento EMBL: ID **HS498999**

Nucleic acid identifier (NI) Identifica versioni differenti di una stessa sequenza.

Per es. in un documento: NI **g2562883**

GenBank

Accession Number (AC) Caratterizza in modo invariabile ogni entry GenBank. Viene citato in rapporti GenBank e anche EMBL e nelle stringhe FASTA (Nella forma: **gi½123456**).

Per es in un documento GenBank: AC **UA123456**

GenBank number (GI) Identifica la versione Per es. in un documento GenBank

Version: **UA123456.1 GI 2455554**



NCBI

```
the blood-brain barrier.
COMPLETENESS: complete on the 3' end.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..4872
                        /organism="Homo sapiens"
                        /mol_type="mRNA"
                        /db_xref="taxon:9606"
                        /chromosome="7"
                        /map="7q21.1"
     gene             1..4872
                        /gene="ABCB1"
                        /note="synonyms: MDR1, P-gp, PGY1, ABC20, CD243, GP170"
                        /db_xref="GeneID:5243"
                        /db_xref="LocusID:5243"
                        /db_xref="MIM:171050"
     CDS             419..4261
                        /gene="ABCB1"
                        /note="multidrug resistance 1; P glycoprotein 1;
                        doxorubicin resistance;
                        go_component: integral to membrane [ goid 0016021]
                        [evidence TAS] [ pmid 3768958];
                        go_component: membrane fraction [ goid 0005624] [ evidence
                        TAS] [ pmid 3022150];
                        go_function: ATP binding [ goid 0005524] [ evidence TAS]
                        [ pmid 3768958];
                        go_function: ATP-binding cassette (ABC) transporter
                        activity [ goid 0004009] [ evidence TAS] [ pmid 3022150];
                        go_function: transporter activity [ goid 0005215] [ evidence
                        TAS] [ pmid 3022150];
                        go_function: nucleotide binding [ goid 0000166] [ evidence
                        IEA];
                        go_process: drug resistance [ goid 0009315] [ evidence TAS]
                        [ pmid 3022150];
                        go_process: small molecule transport [ goid 0006832]
                        [evidence TAS] [ pmid 3022150];
                        go_process: transport [ goid 0006810] [ evidence TAS];
                        go_process: response to drug [ goid 0042493] [ evidence
                        TAS] "
                        /codon_start=1
                        /product="ATP-binding cassette sub-family B member 1"
                        /protein_id="NP_000918.2"
                        /db_xref="GI:42741659"
                        /db_xref="GeneID:5243"
                        /db_xref="LocusID:5243"
                        /db_xref="MIM:171050"
                        /translation="MDLEGDRNGGAKKKKNNFFKLNKSEKDKKPKPTVSVFSMFRYSN
                        WLDKLYMVVGTLAALIHGAGLPLMMLVFGEMTDIFANAGNLEDLMSNITNRSNDINDTG
                        FFMNLEEDMTRYAYYYSGIGAGVLAAYIQVSFWCLAAGRQIHKIRKQFFHAIMRQEI
                        GWFVDVHDVDELNTRLTDDVSKINEGIGDKIGMFFQSMATFFFTGFIVGFTRGWKLTLLVI
                        LAISPVVLGLSAAVWAKILSSFTDKELLAYAKAGAVAEVLAIRTVIAFGGQKKELE
                        YKNLEEAKRIGIRKAITANISIGAAFLLIYASYALAFWYGTTLVLSGEYSIGQVLT
                        VVLSVLIIGAFSVGOASPSIEAFANARGAAYEIFKIIDNKPSIDSYKSGHKPDNIKGNL
```

Le annotazioni

Ogni sequenza depositata in banca dati, oltre al numero di accesso e a eventuali identificatori e, ovviamente alla sequenza, è caratterizzata da una serie di informazioni, chiamate **annotazioni**, che danno preziose informazioni sul “significato” della sequenza stessa.

La quantità e qualità delle annotazioni caratterizza la qualità delle banche dati.

Il mercato globale consente la movimentazione di enormi quantità di materie prime vegetali, di prodotti di origine vegetale e, soprattutto di materiale di moltiplicazione vegetale (semi, tuberi, rizomi, talee, intere piante) con conseguente rischio di importazione di nuove specie patogene o di intossicazione

La certificazione fitosanitaria costituisce un valido strumento per fronteggiare, almeno in parte, tali rischi

Carciofo

Insetti, acari e nematodi in tutti gli stadi di sviluppo

Aleyrodidae

Aphididae

Thysanoptera

Funghi

Bremia lactucae

Leveillula taurica f. sp. cynara

Pythium spp.

Rhizoctonia solani

Sclerotium rolfsii

Sclerotinia sclerotiorum

Verticillium dahliae

Virus ed organismi virus-simili

Tutti

Le Direttive della Commissione europea 93/61 / CEE 2 luglio 1993 e n. 93/62 / CEE 5 luglio 1993: regole fisse per la presenza di parassiti e agenti patogeni nelle produzioni di vivai che sono dannosi per la qualità delle colture orticole

In particolare hanno fornito una lista di parassiti e patogeni che dovrebbero essere assenti in tali produzioni

High-Throughput Sequencing:

Un nuova sfida per la certificazione fitosanitaria delle produzioni vivaistiche

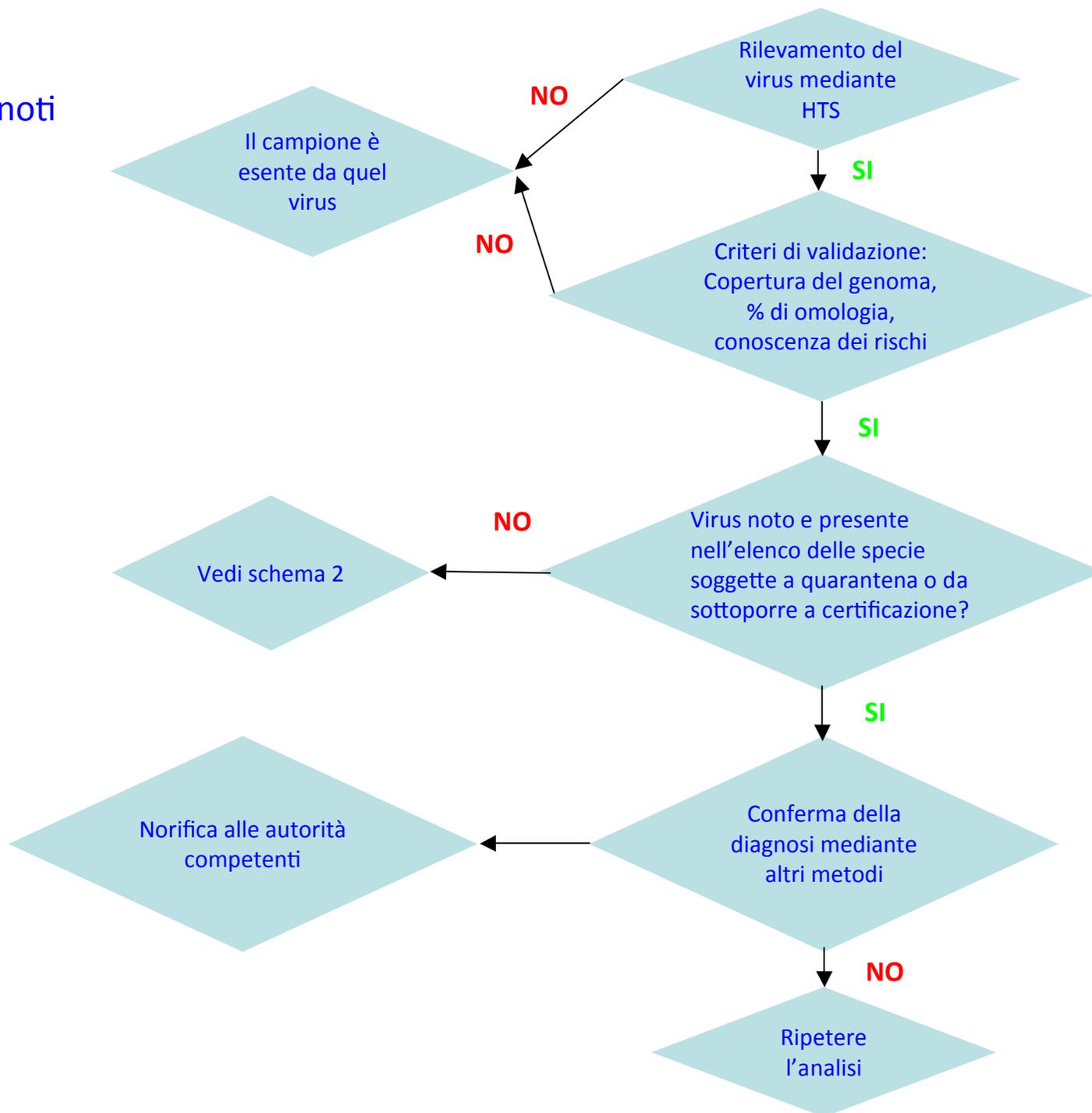
La patologia vegetale ha indubbiamente beneficiato di queste nuove metodologie, ma allo stesso tempo la caratterizzazione biologica degli agenti patogeni noti (Schema 1) o potenziali patogeni (vedi Figura 2) e l'analisi del loro impatto a la biosicurezza, i livelli commerciale, normativo e scientifico

Lo schema decisionale illustrato nella Figura 1 da applicare agli agenti patogeni noti si basa sulle normative esistenti sulla quarantena o sulla certificazione ed è simile al processo eseguito di routine con metodologie basate sui metodi di rilevamento ed identificazione descritti in precedenza. Tuttavia, l' HTS può anche rivelare ulteriore complessità (ad es. Sinergismo con altri agenti patogeni) e persino riorientare l'indagine sulla malattia per le specie conosciute

Lo schema illustrato nella Figura 2 da applicare a agenti patogeni sconosciuti può complicare il processo decisionale per i programmi di certificazione, i processi di quarantena e più in generale il commercio di materiali vegetali. In tal caso, i valutatori del rischio non possono aspettare che siano disponibili dati sufficienti e devono essere prodotte le prime conclusioni sulla base di qualsiasi informazione a portata di mano. Questo deve essere fatto con cautela, tenendo contemporaneamente conto delle incertezze associate o causate dalla mancanza di dati e rendendole chiari all' autorità che gestisce il rischio

Schema 1

Rilevamento di virus noti



Schema 2 Rilevamento di virus non noti

