



Con il patrocinio



Webinar divulgativi Progetto INNOCI

Sviluppo di soluzioni innovative nel controllo delle emergenze fitosanitarie, piattaforme diagnostiche high throughput e strategie integrate di contenimento

1° webinar – Problematiche fitosanitarie, metodi diagnostici e aspetti legislativi

LA DIAGNOSI DEGLI ORGANISMI PATOGENI SISTEMICI DEGLI AGRUMI: I RISULTATI DEL PROGETTO INNOCI

Giuliana Loconsole, Francesco Di Serio e Maria Saponari – IPSP CNR, Bari

4 Marzo 2021



PSP

Consiglio Nazionale delle Ricerche
Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante
Sede di Bari

AZIONE 1

SVILUPPO DI SISTEMI DIAGNOSTICI AVANZATI PER APPLICAZIONI SU LARGA SCALA

OBIETTIVO generale: sviluppo di protocolli diagnostici avanzati per la corretta identificazione di agenti infettivi degli agrumi, incluso sia quelli previsti dalle normative fitosanitarie che quelli associati allo sviluppo di emergenze fitosanitarie

DA PROGETTO: 1) reazioni multiple per diagnosi simultanea di HLB, CTV, CEVd, HSVd
2) simultanea differenziazione dei ceppi severi di CTV
3) differenziazione varianti di cachessia/varianti non-cachessia

RISULTATI ATTESI

PROCEDURE DIAGNOSTICHE AVANZATE ED AUTOMATIZZATE PER LA
DIAGNOSI SIMULTANEA DEI PRINCIPALI PATOGENI DEGLI AGRUMI



Revisione obiettivi specifici:

1. **Standardizzazione di un protocollo di real time RT-PCR per CiVA CCGaV (Navarro et al., 2018 a e b)**
2. **Standardizzazione di procedura di estrazione di acidi nucleici automatizzata per identificare patogeni a DNA/RNA**
3. **Applicazione di Real time RT-PCR per diagnosi multipla di CTV, CEVd e HSVd**
4. **Standardizzazione di Real time RT-PCR per X.fastidiosa, HLB, e gene COX**

1. Standardizzazione di un protocollo di real time RT-PCR per CiVA e CCGaV (Navarro et al., 2018 a e b)

MONITORAGGIO NELL'AREA AGRUMICOLA DI RODI GARGANICO e CAGNANO VARANO (2018-2019)

Collaborazione con



DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL
SUOLO DELLA PIANTA E DEGLI
ALIMENTI - D.I.S.S.P.A.

Cvs:
Arancio Biondo del Gargano,
Arancio Duretta del Gargano
Limone Femminello del Gargano



Vecchi impianti



4 rametti di un anno con foglie, 4 punti cardinali lungo la chioma

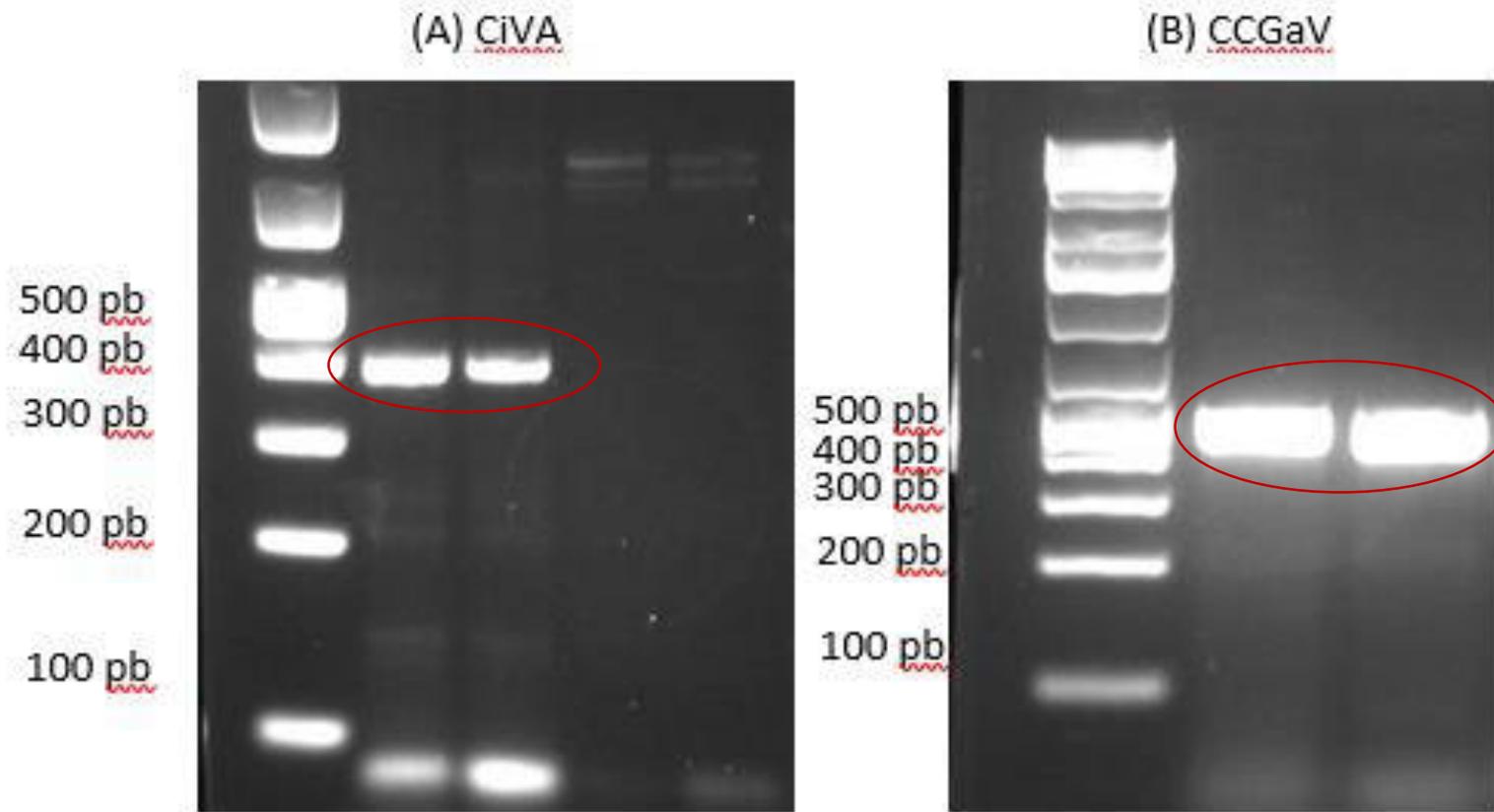
**In totale 64 campioni prelevati
saggi molecolari per l'identificazione di:**

- **RT-Real time PCR per CTV, HSVd, CEVd e CPsV- Saponari et al., (2013)**
- **RT-PCR per CiVA e CCGaV (Navarro et al., 2018a; 2018b)**

Cultivar	CTV	HSVd	CEVd	CPsV	CiVa	CCGaV
Bionda del Gargano (32 piante)	0	84%	97%	62%	0,64% (1 pianta)	0,64% (1 pianta)
Duretta del Gargano (12 piante)	0	100%	100%	58%	1,24% (2 piante)	1.24% (2 piante)
Femminello del Gargano (18 piante)	0	100%	94%	67%	0	0

prima volta in piante di agrumi in areali del Gargano:

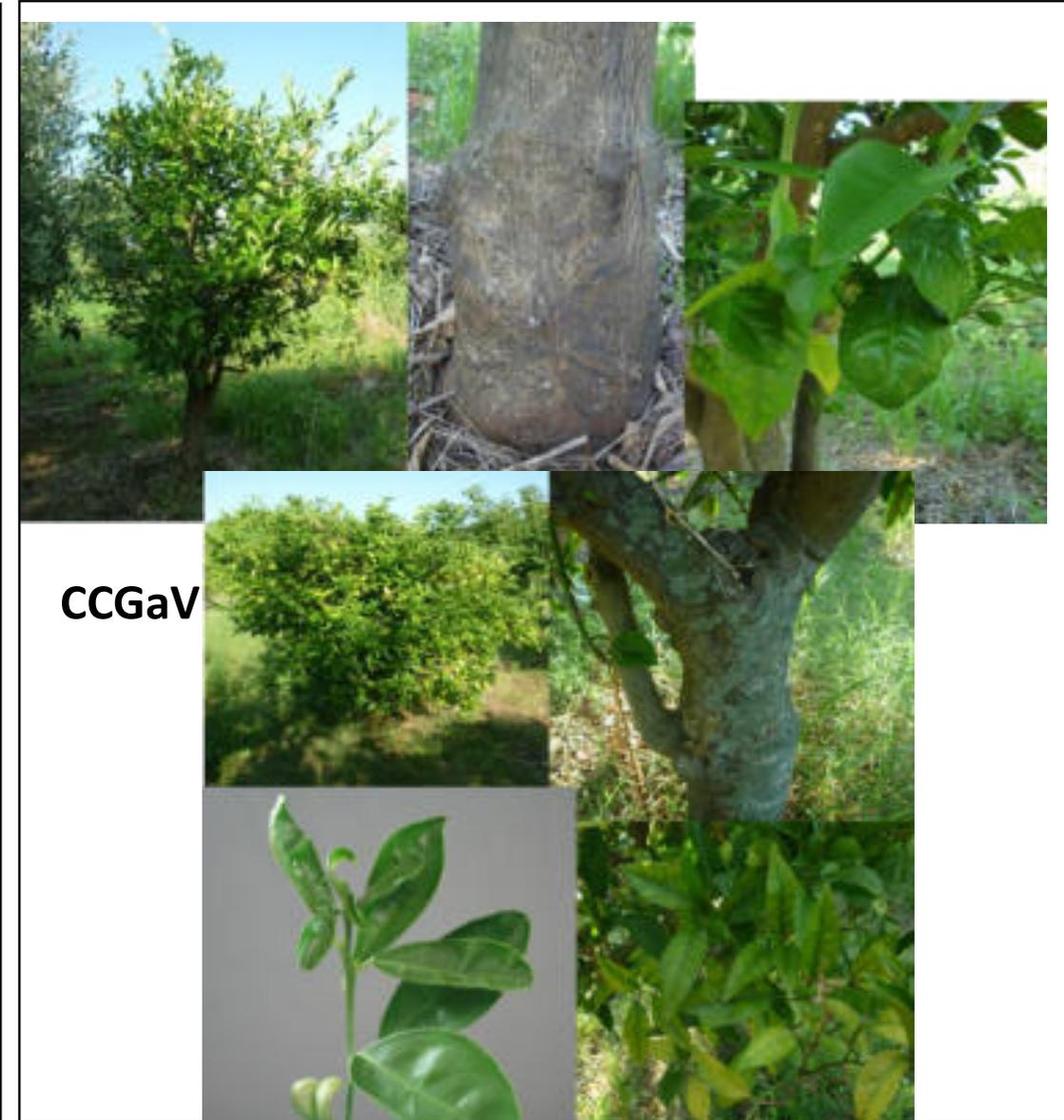
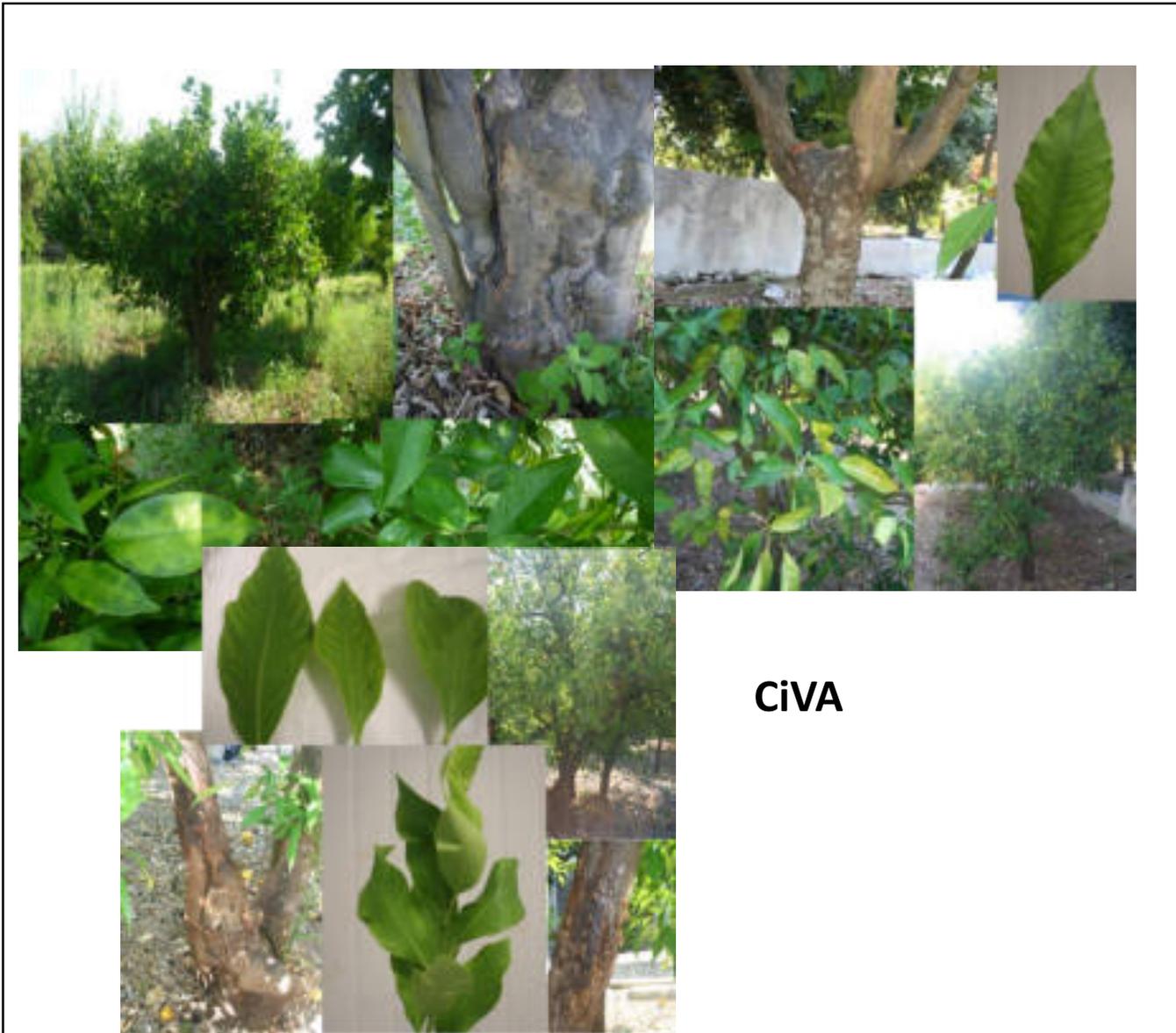
**3 piante con infezioni di CiAV
3 piante con CCGaV**



Sequenziamento + analisi in Genbank

99% di omologia con le sequenze genomiche di entrambi i virus

RILIEVI SINTOMI LUGLIO 2019



non è stato possibile al momento osservare su tali piante alcun sintomo specifico da associare alla presenza dei due virus

STANDARDIZZAZIONE SAGGIO di Real time PCR per CiVA e CCGaV: disegno coppie di primer sulle sequenze genomiche in banca dati

Virus	Primers/probe	RNA
CCGaV	SET 1 1Fw 5'- TTGCATTTCCACAGACTCATCAC-3' 1Rev 5'- TCACCTTTCCTCCCTGATGAA- 3	RNA 1
	SET 2 2Fw 5'- CCCTTGCAATATTCAGAGTTATCTTG-3' 2Rev 5'-AAAAGGTGGAACTGTCATTGGATT-3' Probe2 5'- TACAAGATGTTCTAGGGATGC-3'	RNA 2
CiAV	SET 1 1fw 5'- GAGGCAGTGGTAGGAGTGAACCT-3' 1rev 5'- CCAGGGAATGTTGCACCAAT-3'	RNA 2
	SET 2 2Fw 5'-GAAATTATGGCAAGAGCAAGTAAGG-3' 2Rev 5- CTCCTCCACTTCTAAAATCAATTCCT-3' Probe2 5' TET-ATGGGCATACCAGACCT-MGB 3'	RNA1
	SET 3 CiVA-FW_193 5'- AGGAGTGAACCTGCTAATGTTG -3' CiVA-Rev_292 5'- TCCTAGAACTAGCTTTGTTTTCCAC -3' CiVA-Probe 221_248 5'-TCTCTAGAATTGGTGCAACATTCCCTGG-3'	RNA2

STANDARDIZZAZIONE SAGGIO di Real time PCR per CiVA e CCGaV:

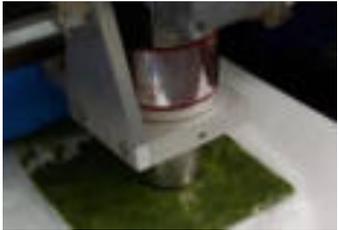
Sviluppo del saggio diagnostico: sui campioni positivi del monitoraggio e controlli positivi di riferimento



Estrazione acidi nucleici totali da foglie: protocollo CTAB

Saggio di real time mediante
sybr/sonde Taqman

su cDNA o direttamente su preparati di acidi nucleici (TNA)



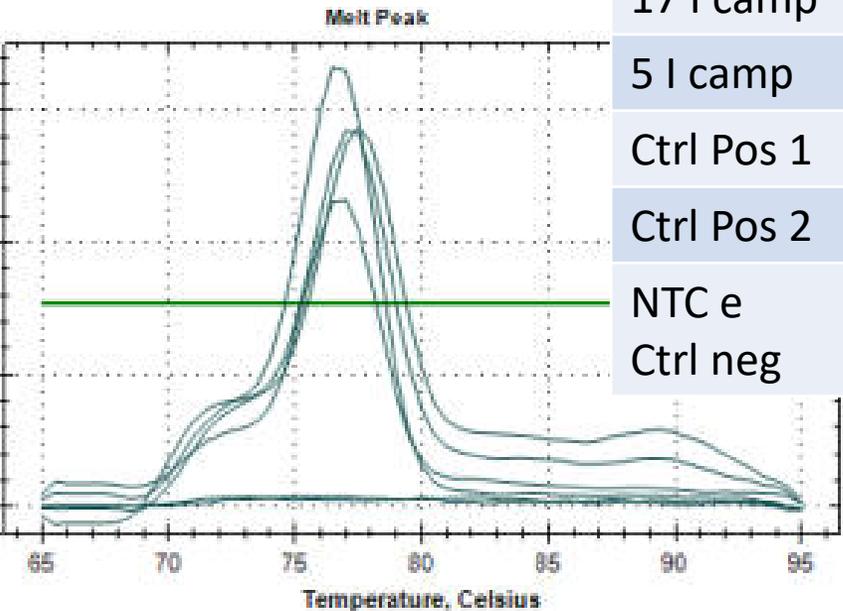
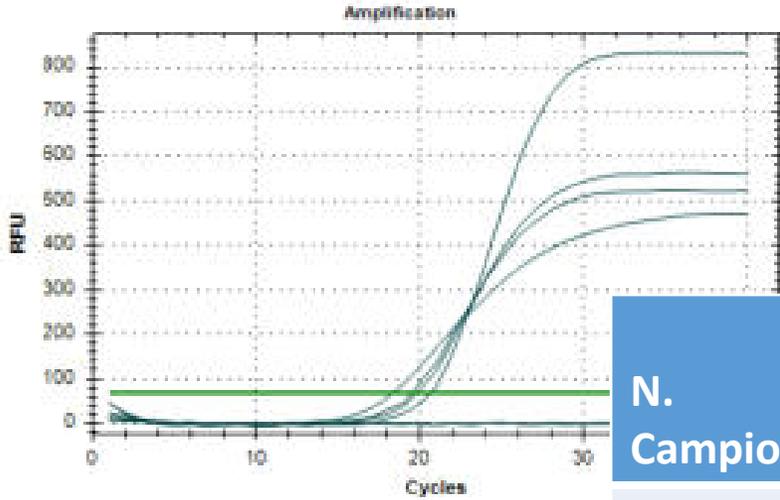
RISULTATI: SAGGIO DIRETTAMENTE SU TNA (Real time RT-PCR)

per CiVA: **RISULTATI INCONCLUDENTI** con tutte le coppie di primer/sonde selezionate

per CCGaV: **RISULTATI** soddisfacenti con una coppia di primer +sonda

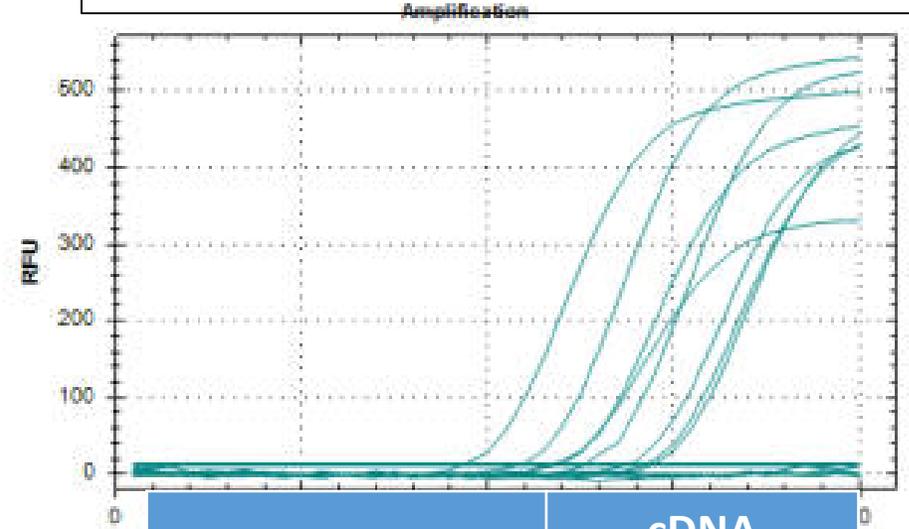
Real time SYBR set primer N. 2 **CiVA**

su cDNA



N. Campioni	cDNA	
	Cq	Melt peak
17 I camp	19.51	77.00
5 I camp	19.81	76.50
Ctrl Pos 1	21.81	77.00
Ctrl Pos 2	18.87	77.50
NTC e Ctrl neg	neg	

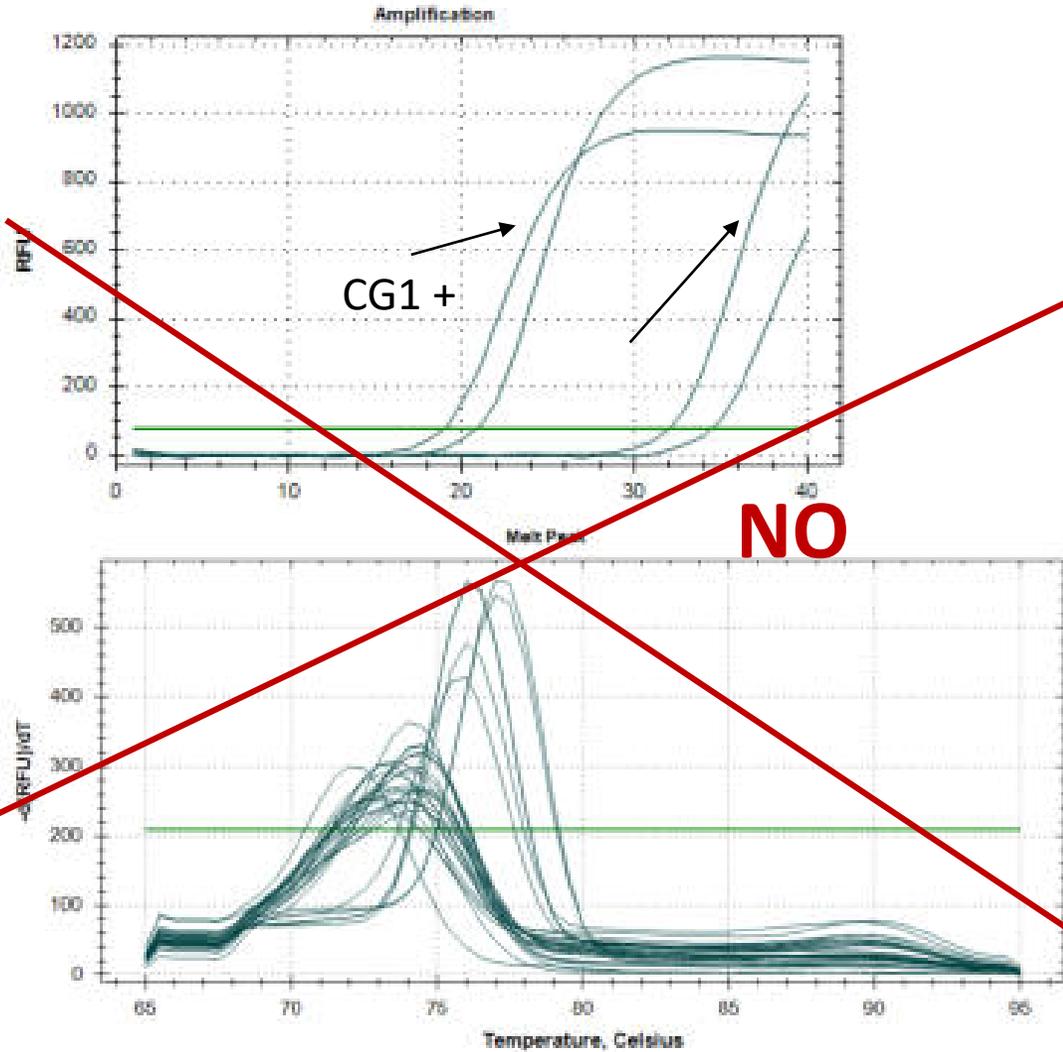
set N. 2 primer+Taqman probe



N. Campioni	cDNA
	Cq
34 I camp	27.57
52 I camp	24.03
5 I camp	23.46
34 II camp	28.83
52 II camp	25.24
5 II camp	neg
Ctrl Pos 1	21.81
Ctrl Pos 2	18.87
NTC e Ctrl neg	neg

CCGaV

CCGaV SYBR: Cq alti con tutte e 3 le coppie di primer o aspecificità



CCGaV

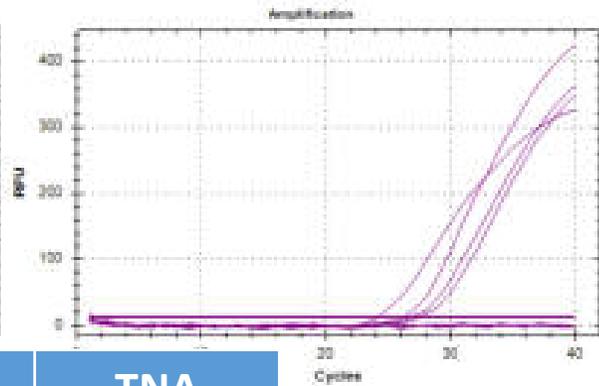
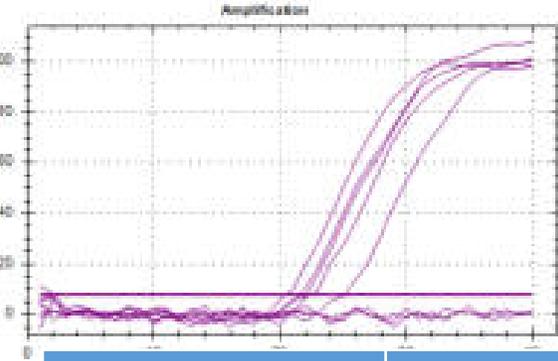
Saggio di real time PCR mediante sonde Taqman

I campionamento 2018

set N. 2 primer/probe

cDNA

TNA (RT-real timePCR)



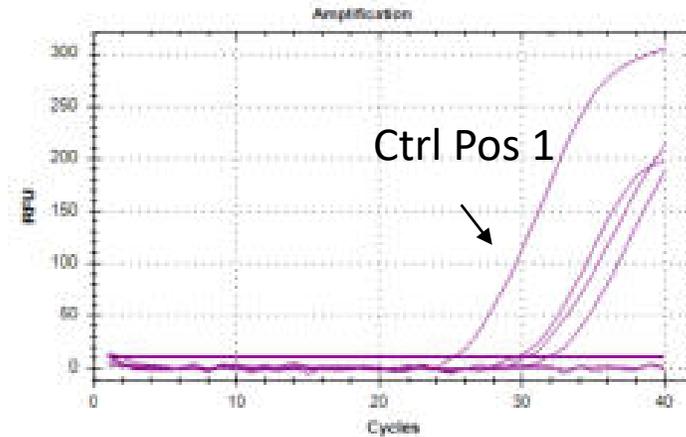
N. Campioni	cDNA	TNA
	Cq	Cq
25	22.50	26.75
17	20.56	24.12
10	25.15	27.39
41, 36, 60	neg	
Ctrl neg	neg	
Ctrl Pos 1	21.57	26.25
Ctrl Pos 2	22.11	-
NTC	neg	neg



Tra pos cDNA e TNA
 ΔCq 2-4

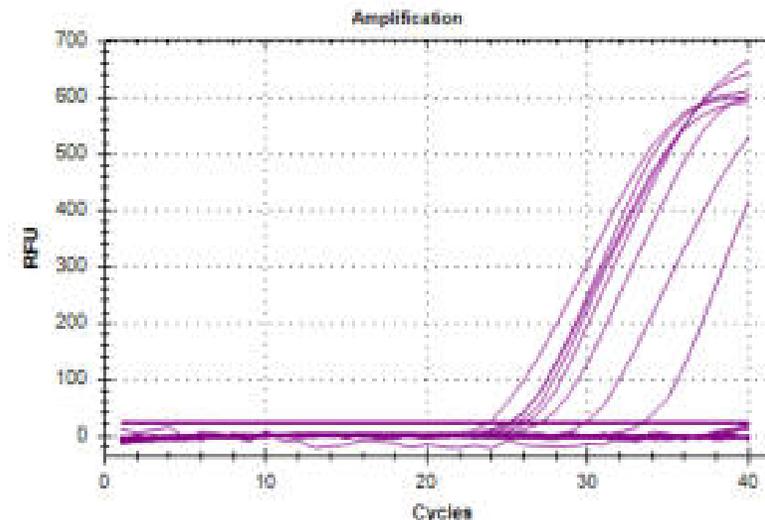
Il campionamento su alcune piante nel 2019

RT-real time PCR



Ctrl Pos 1 Cq= 25.11
25 = 30.17
17 = 29.50
10 = 28.61

Saggio su piante indexate in serra



Cq	ELISA
26.94	pos
23.13	pos
29.69	neg
25.02	pos
25.00	pos
25.41	pos
33.29	neg
26.05	pos

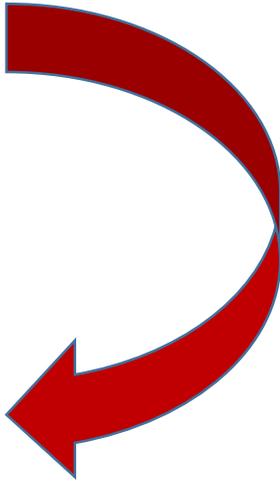
RISULTATI OTTENUTI

CiVA:
standardizzazione protocollo Real time PCR su CDNA con SYBR/Taqman probe

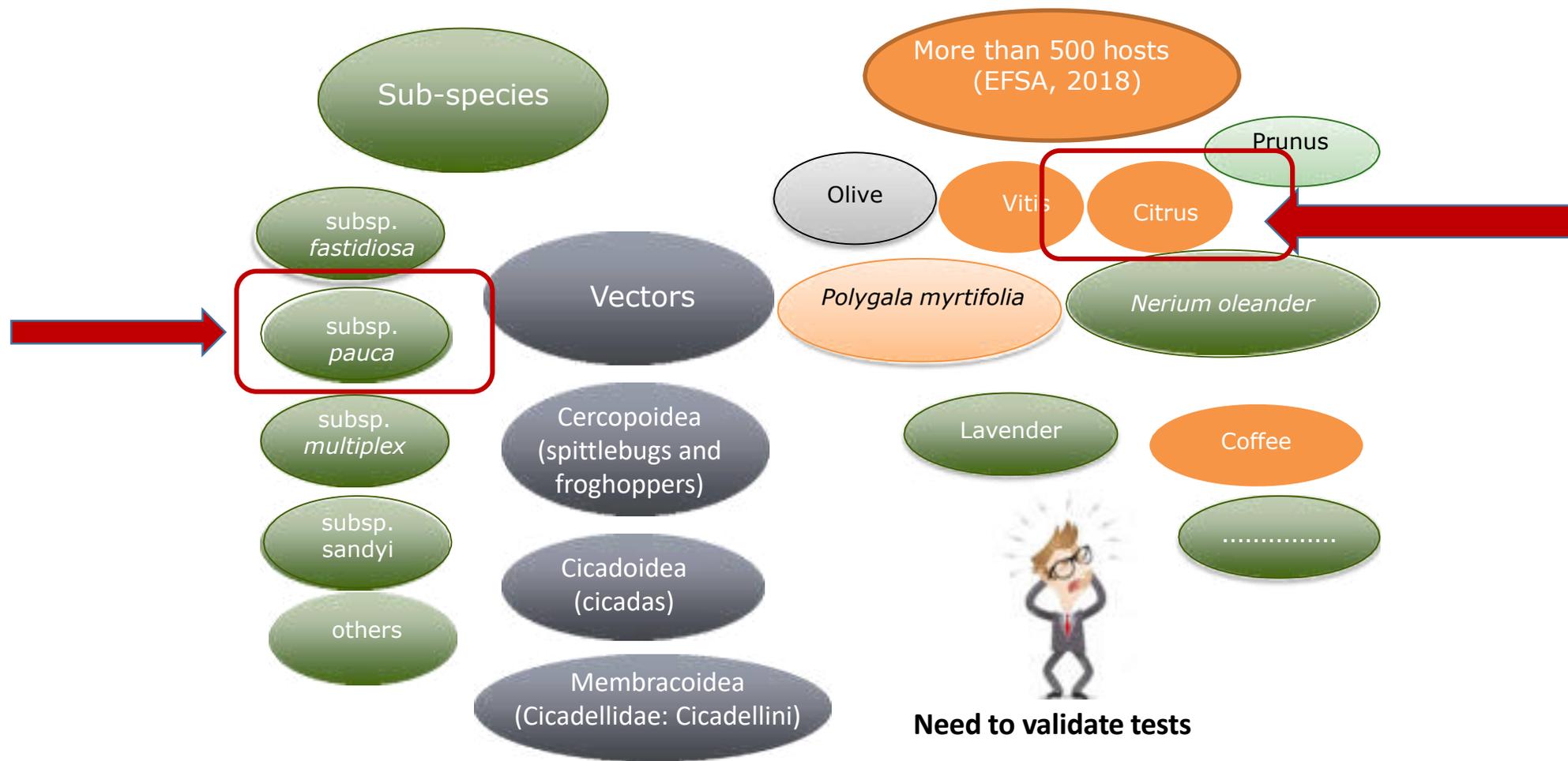
CCGaV:
standardizzazione di protocollo Real time PCR su cDNA e direttamente su TNA

OBIETTIVI

2. Standardizzazione di procedura di estrazione di **acidi nucleici automatizzata** per identificare patogeni a DNA/RNA
3. Applicazione di Real time RT-PCR per diagnosi multipla di CTV, CEVd e HSVd
4. Standardizzazione di Real time RT-PCR per X.fastidiosa, HLB, e gene COX



Xylella fastidiosa: PATOGENO COMPLESSO



CVC – clorosi variegata degli agrumi (sud – America)



I sintomi fogliari sono molto simili a quelli causati da carenze o da altri patogeni; per questo la diagnosi solo su base visiva, va integrata con saggi specifici.



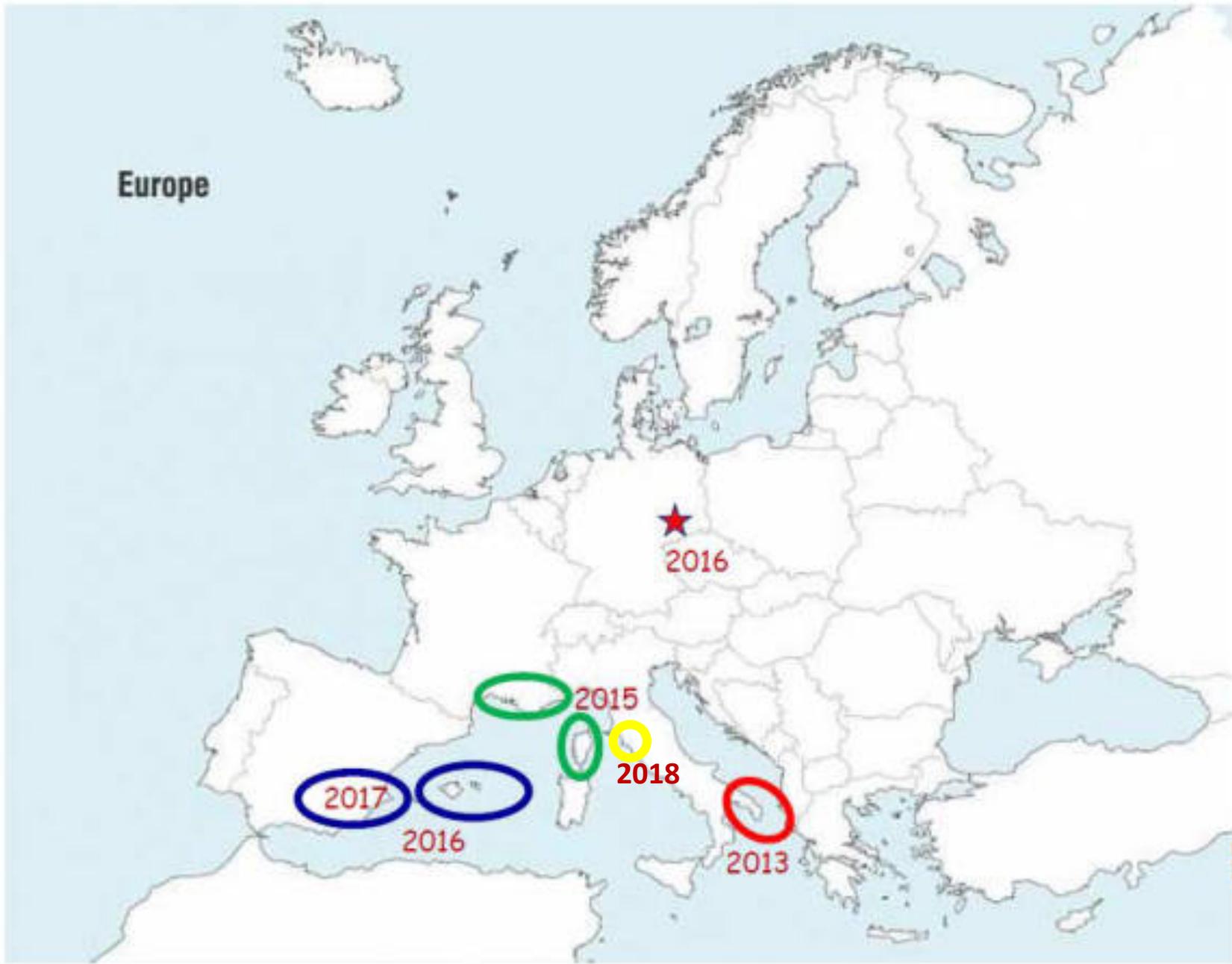
Brasile

1987 – pochi alberi

1992 – 2mln alberi

2010 - 120 mln





Misure fitosanitarie su territorio UE

• Regolamentato come un patogeno da quarantena in EU

• Decision (EU) 2015/789

Sostituita

REGOLAMENTO (EU) 2020/1201

new

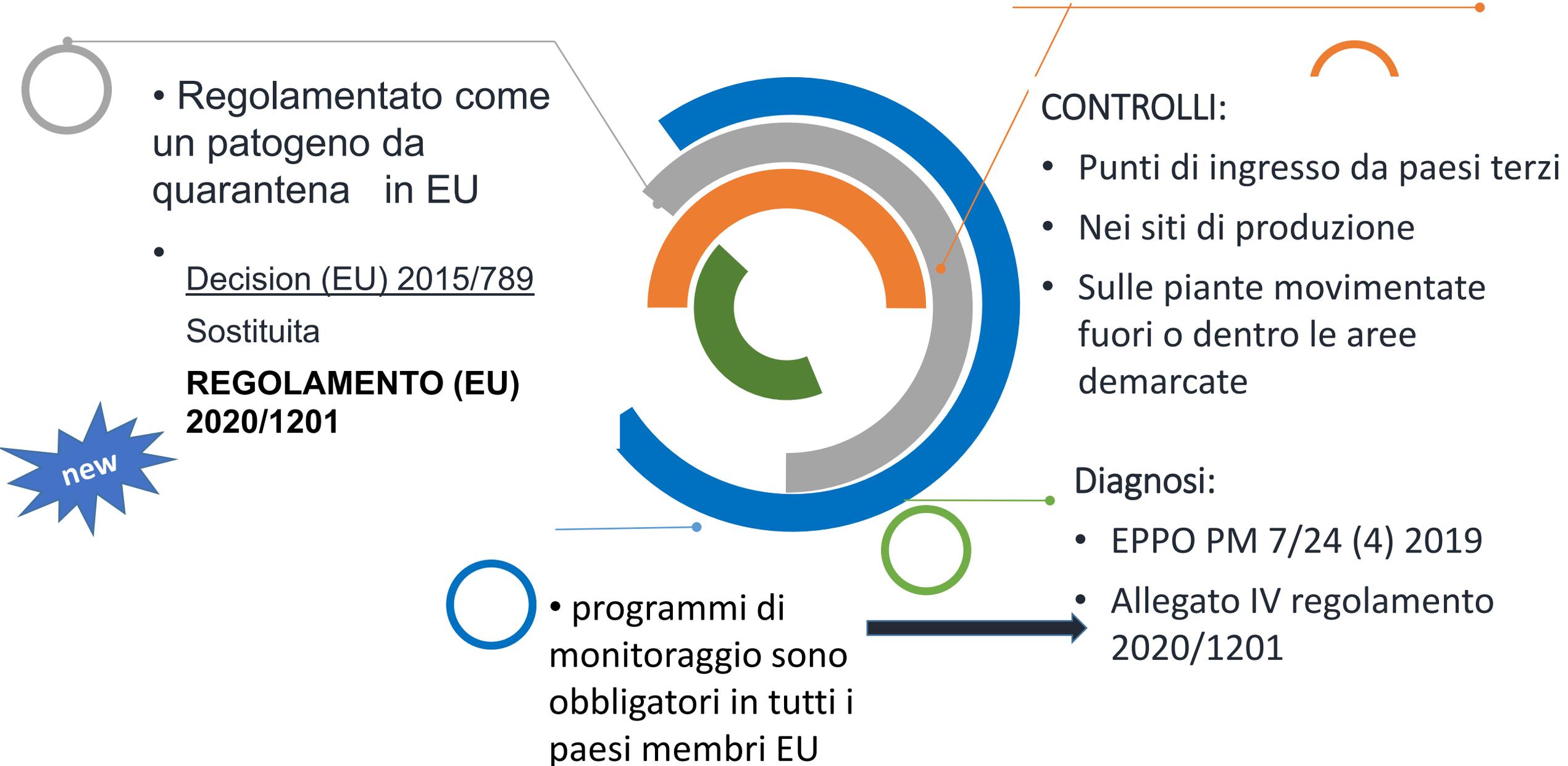
• programmi di monitoraggio sono obbligatori in tutti i paesi membri EU

CONTROLLI:

- Punti di ingresso da paesi terzi
- Nei siti di produzione
- Sulle piante movimentate fuori o dentro le aree demarcate

Diagnosi:

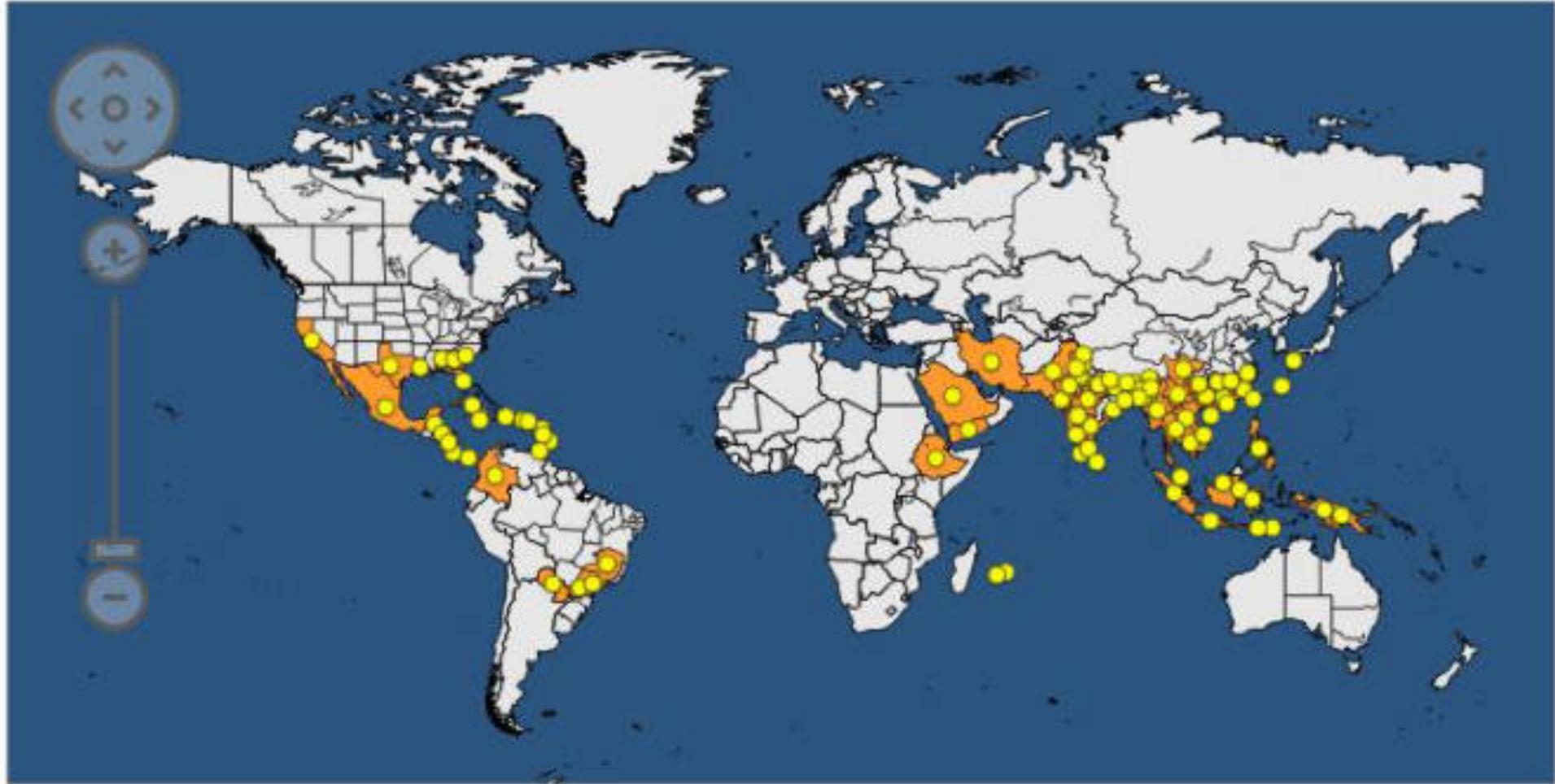
- EPPO PM 7/24 (4) 2019
- Allegato IV regolamento 2020/1201

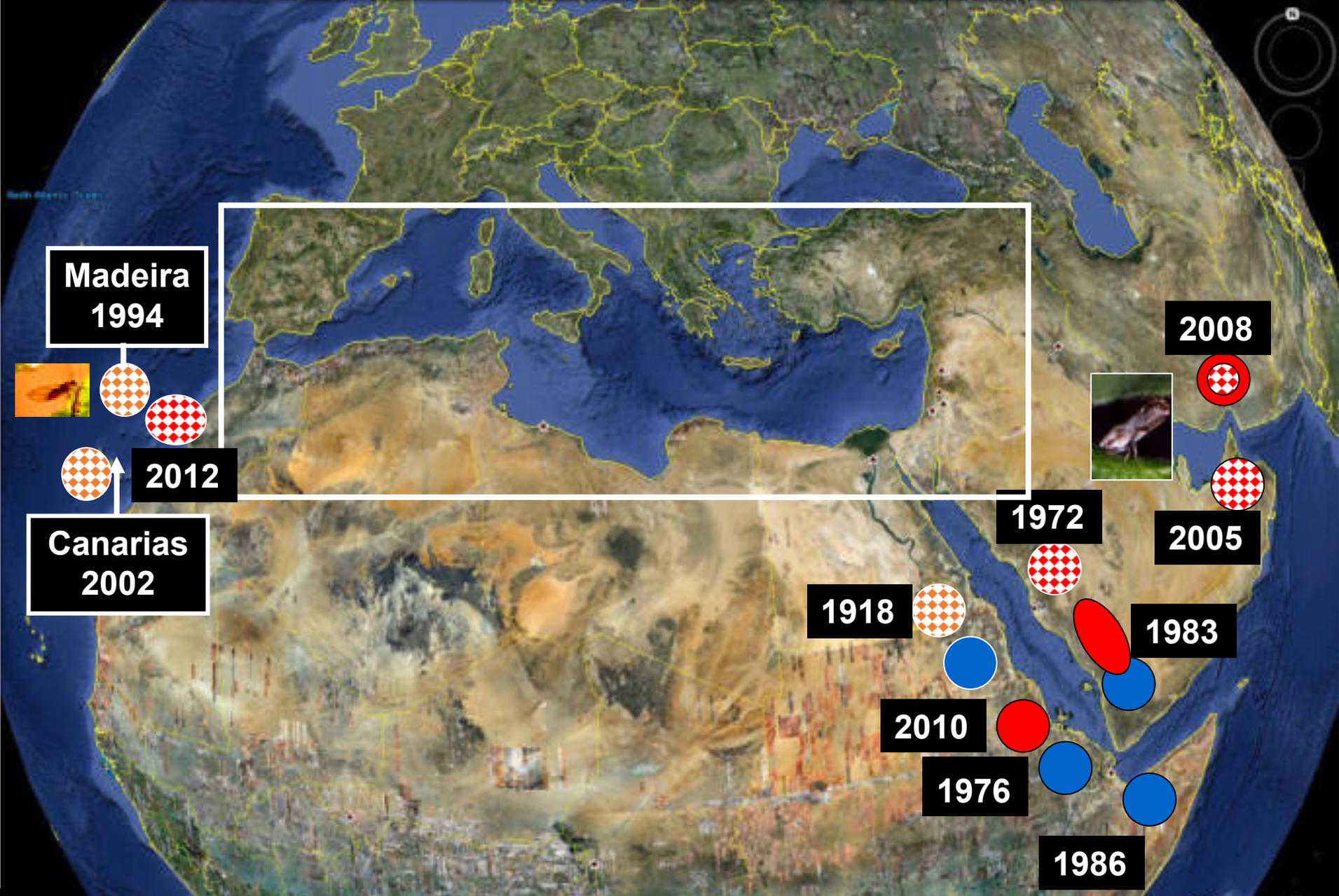


Huanglongbing o Greening
(*Liberibacter*)

(HLB)

Distribuzione:





 *D. citri*

 Asian HLB

 *T. erytraea*

 African HLB

October 1999

HLB in Cina

January 2005



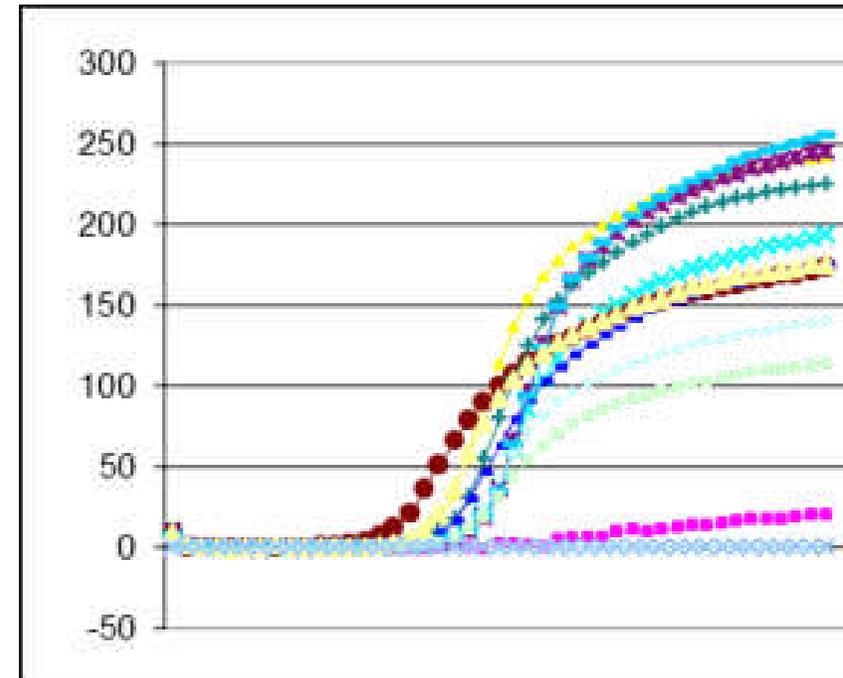
South-African « GREENING »



Il frutto non e' buono nemmeno per l'industria dei succhi



Diagnosi di Laboratorio: tessuto prelevato da foglie sintomatiche (nervatura centrale) – se non si trovano campioni sintomatici, il campione deve essere rappresentativo delle pianta (lo stesso usato per CTV)



Saggio molecolare di real-time PCR

Protocolli EPPO

PM 7/121 (1) 'Candidatus Liberibacter africanus', 'Candidatus Liberibacter americanus' and 'Candidatus Liberibacter asiaticus'

INNOCI: OBIETTIVO 1st STEP

Ottimizzare una procedura comune di estrazione degli acidi nucleici per ottenere preparazioni di acidi nucleici idonee per la diagnosi simultanea di patogeni a genoma RNA/DNA: estrazione su agrumi infetti da CTV

Manuale

(0,5 gr di tessuto floematico)

- CTAB (metodo basato sull'uso di cloroformio)

Automatizzato per processare 48 campioni

(0,5 gr di tessuto floematico)

piattaforma PROMEGA (cloroformio-free)

CTAB – magnetic beads

1. Maxwell[®] RSC PureFood GMO and Authentication Kit per DNA
2. Maxwell[®] RSC for RNA extraction from strawberry leaves
(anche con guandina isotiocianato)



2nd STEP

Valutazione preparazioni di acidi nucleici in **singleplex qPCR**

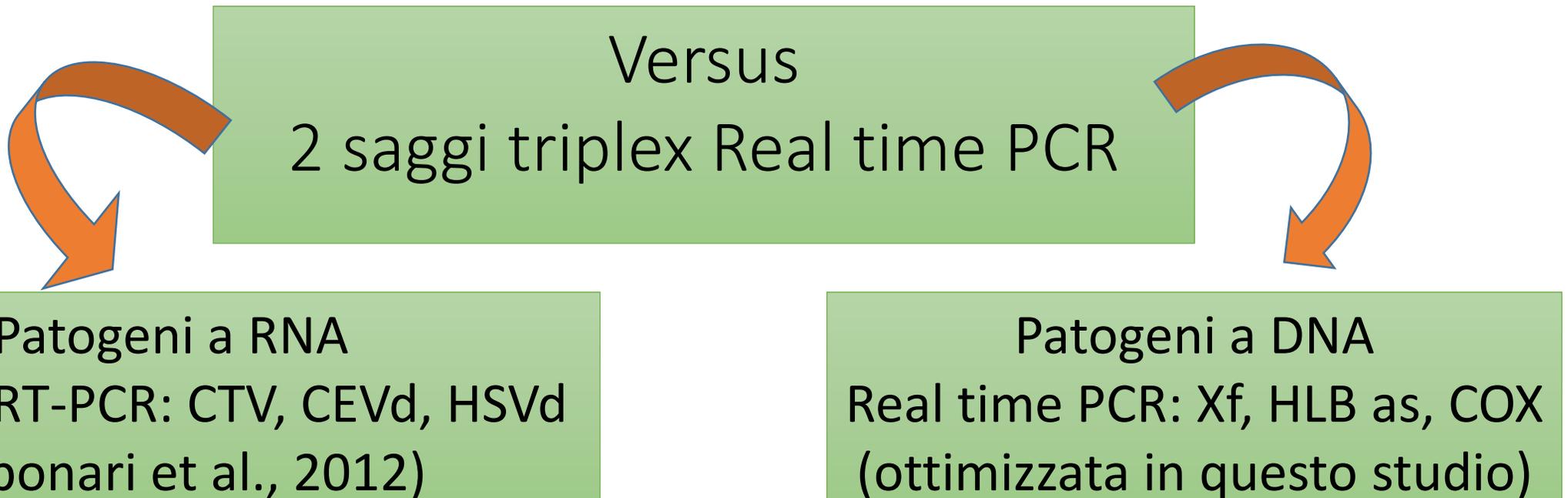
per ogni patogeno protocolli già pubblicati

CTV- HSV-CEVd (Saponari et al., 2008 e 2012)

X. Fastidiosa (Harper et al. 2010)

HLB (Li et al., 2006)

COX (Li et al., 2006) (gene endogeno della pianta, controllo interno)



Versus

2 saggi triplex Real time PCR

Patogeni a RNA

Real time RT-PCR: CTV, CEVd, HSVd
(Saponari et al., 2012)

Patogeni a DNA

Real time PCR: Xf, HLB as, COX
(ottimizzata in questo studio)

SINGLEPLEX qPCR TEST

N. Campioni saggiati 20	METODO DI ESTRAZIONE e Cq medi				
	CTAB	PROMEGA-DNA	PROMEGA-RNA		
<i>Citrus tristeza virus</i>					
20 pos	29.51 (25.09-33.04)	27.83 (25.06-32.78)	25.48 (22.65-31.32)	<i>Cq più bassi</i>	
<i>Hop stunt virus</i>					
20 pos	26.64 (21.92-30.01)	28.81 (22.96-32.22)	27.09 (22.96-32.12)	<i>ΔCq bassi</i>	
<i>Citrus exocortis virus</i>					
9 pos	30.43 (27.08-34.72)	31.62 (29.45-33.59)	31.93 (29.20-32.69)		
<i>X. fastidiosa*</i> succo contaminato con coltura batterica					
10- 10 ⁶ cfu/ml	21.94 (20.42-23.43)	22.60 (22.72-24.17)	22.38 (21.35-23.44)	<i>Cq bassi</i>	
10- 10 ⁴ cfu/ml	30.48 (30.08-32.88)	29.81 (28.75-31.16)	29.63 (28.47-30.60)		
COX					
20	15.40 (13.68-17.12)	17.75 (16.12-18.75)	19.35 (17.65-19.78)	<i>Cq bassi</i>	
<i>HLB asiaticus**</i> succo contaminato con TNA pos					
1 pos	29.36	27.70	32.12	<i>Cq più basso</i>	

1st TRIPLEX RT-qPCR: patogeni a RNA

		METODO DI ESTRAZIONE e Cq medi		
		CTAB	PROMEGA-DNA	PROMEGA-RNA
6 campioni pos		<i>Citrus tristeza virus (cq media)</i>		
sx		28.67	28.02	26.07
mx		26.53 (22.71-29.37)	29.18 (24.58-32.67)	27.12 (22.56-30.71)
6 campioni pos		Hop stunt virus		
sx		26.64	28.81	27.09
mx		26.24 (23.92-28-79)	29.11 (27.18-30.27)	28.83 (26.11-31-01)
6 campioni pos		Citrus exocortis virus		
sx		30.46	31.51	31.50
mx		28.64 (26.26-30-07)	30.68 (29.44-32.65)	31.00 (30.03-32-45)

CTV: *ΔCq basso tra CTAB e Promega RNA*

CEVd: *Cq CTAB < Cq Promega RNA ΔCq 2.59*

HSVd: *Cq CTAB < Cq Promega RNA-DNA $\Delta Cq \sim 2$*

Migliore performance in mx:

1. CTAB

2. Promega RNA

2nd TRIPLEX qPCR: patogeni a DNA+controllo interno

		METODO DI ESTRAZIONE e Cq medi			
		CTAB	PROMEGA-DNA	PROMEGA-RNA	
6 campioni pos		Xylella fastidiosa			
sx 10 ⁶		21.68	23.68	22.84	
mx 10 ⁶		21.17	24.12	25.03	$\Delta Cq \sim 1$
sx 10 ⁴		30.70	30.43	29.80	
nx10 ⁴		28.13	30.85	30.83	ΔCq trascurabile
6 campioni pos		COX			
sx		15.42	18.02	19.05	
mx		14.54	16.28	18.62	ΔCq 2.34
1 campione pos		HLB asiaticus			
sx		29.36	27.70	32.12	
mx		26.91	28.16	31.14	ΔCq 2.98

Migliore performance in mx:

1. CTAB Cq più bassi

2. Promega DNA

RISULTATI OTTENUTI

2 - Triplex Real-time One step RT-PCR

Tutti i patogeni sono stati rilevati correttamente in mx su estratti ottenuti con CTAB, Promega DNA/RNA kit, ma.....



Con 2 multiplex RT-qPCR, ogni campione è saggiato per 5 patogeni e un controllo interno

PATOGENI A DNA
ESTRAZIONE ACIDI NUCLEICI
- CTAB
- Promega DNA AS1600

PATOGENI A RNA
ESTRAZIONE ACIDI NUCLEICI
- CTAB
- Promega RNA AS1500

