

Convegno conclusivo

Progetto IFAC - INNOVAZIONE DELLA FILIERA AGRUMICOLA CALABRESE

13 Febbraio - Lamezia Terme

**APPLICAZIONE DI TECNICHE RAPIDE DI DIAGNOSI MOLECOLARE PER IL RILEVAMENTO IN AGRUMI
DI XYLELLA FASTIDIOSA, CITRUS TRISTEZA VIRUS E CANDIDATUS LIBERIBACTER SPP:
I RISULTATI DEL PROGETTO IFAC**

**Giuliana Loconsole, Maria Saponari
CNR- Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, sede di Bari**



**Consiglio Nazionale
delle Ricerche**

**Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante
Sede Secondaria Bari**





AZ. 4 Qualificazione e certificazione fitosanitaria

OBIETTIVO:

**Validare e trasferire alle OP protocolli diagnostici per
Citrus Tristeza Virus (CTV) - Huanglongbing o Greening (HLB) , Xylella fastidiosa (Xf)
Rapidi e da applicare direttamente in campo/azienda, anche con il supporto del personale tecnico**

VANTAGGI:

- 1. Velocizzare i test di screening da effettuare direttamente presso i point- of-care (POC): vivai, campo, punti di ingresso del materiale vegetale da paesi terzi.**
- 2. Non spostare materiale vegetale infetto da focolai/aree delimitate a laboratori ubicati in aree indenni (abbattendo il rischio di introduzione del patogeno).**
- 3. Possibilità di effettuare alcune fasi del test diagnostico anche con il supporto del personale tecnico delle aziende, con abbattimento dei costi del saggio diagnostico.**

Gli agrumi nel nuovo regime fitosanitario europeo: I ANNO

- Regolamento (UE) 2016/2031 relativo alle misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante
- Lista di 'priority pests' (2019)

Xylella fastidiosa

- REGOLAMENTO (EU) 2020/1201
- programmi di monitoraggio obbligatori in tutti i paesi membri

CONTROLLI:

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

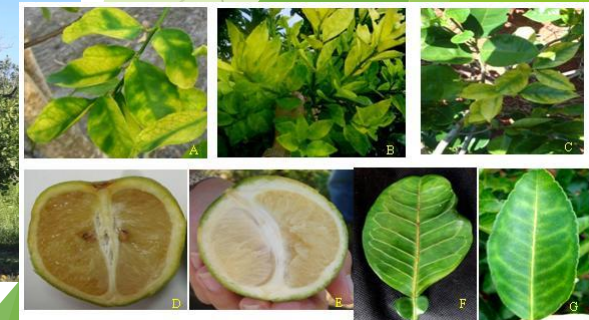
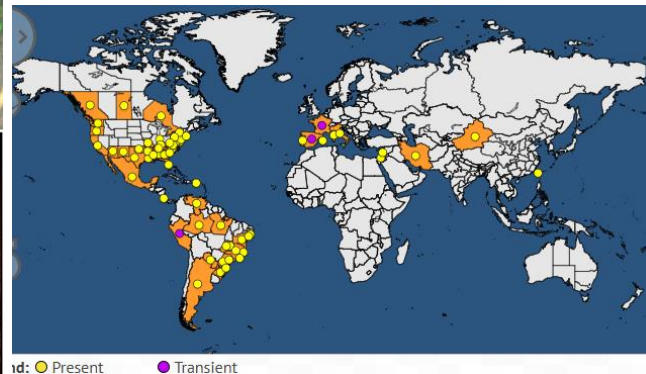
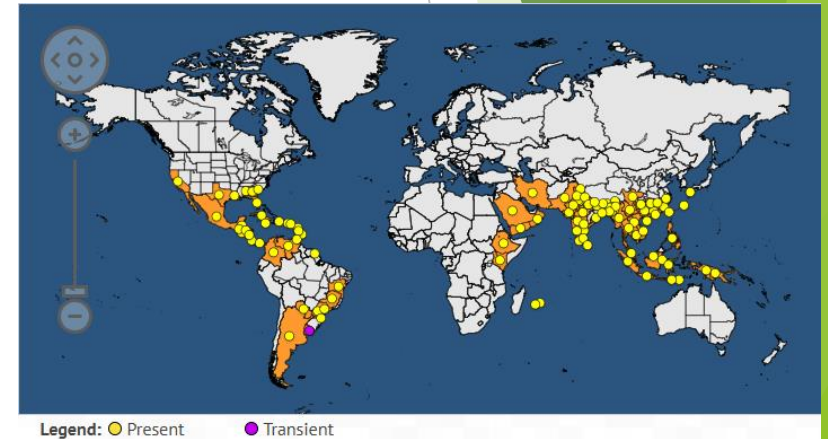
Diagnosi:

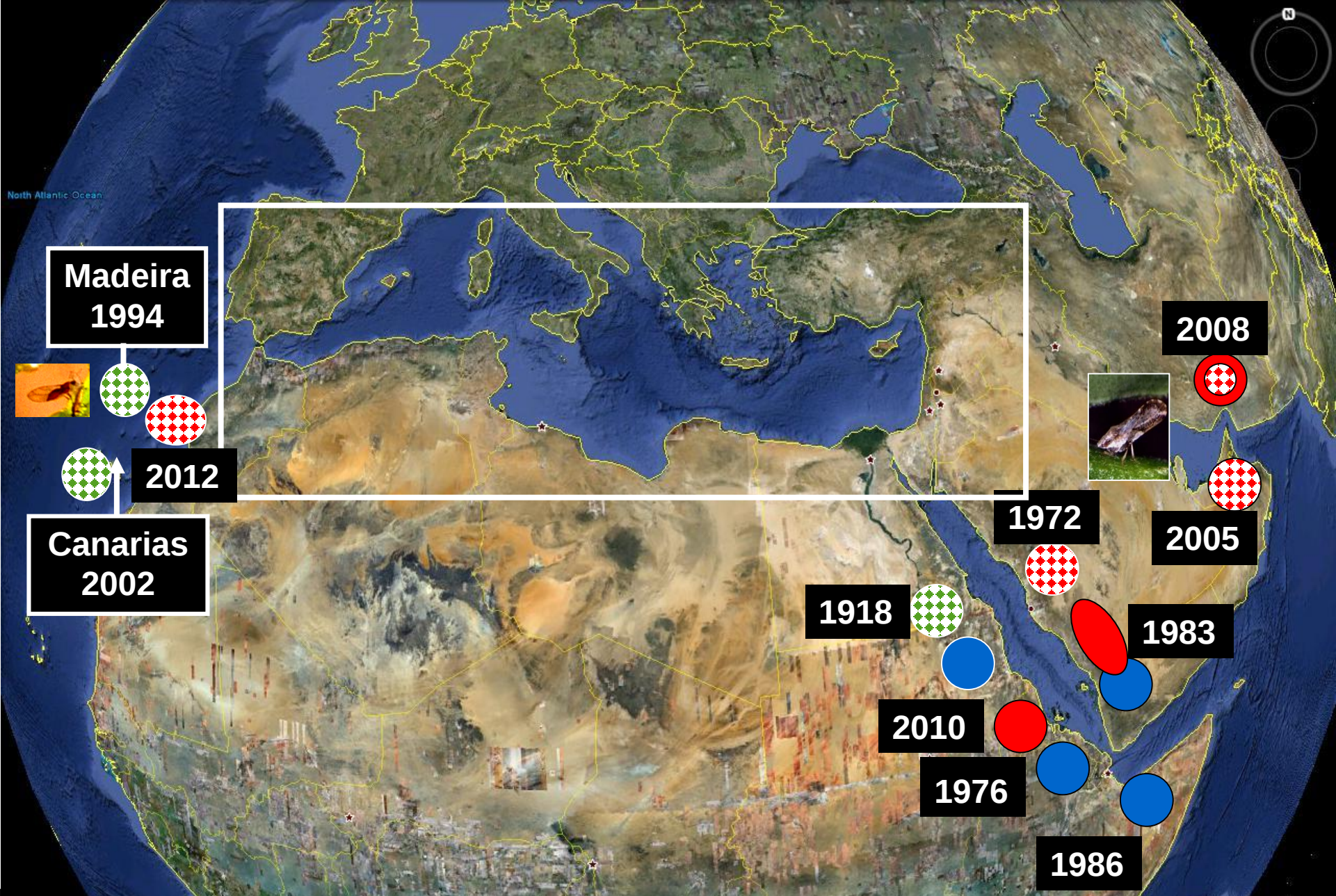
- EPPO PM 7/24 (5) 2023
- Allegato IV regolamento EU 2020/1201-2024/2507

Candidatus Liberibacter spp.

Diagnosi

- EPPO PM 7/21 (2)





 *D. citri*

 Asian HLB

 *T. erythrae*

 African HLB

Citrus tristeza virus

EFSA:

- 'Opinion on the pest categorisation of Citrus tristeza virus (2014);
- Pest categorisation of Citrus tristeza virus (non-European isolates), 2017;
- Pest survey card on non-European isolates of citrus tristeza virus, 2019



- REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2019/2072 DELLA COMMISSIONE del 28 novembre 2019

- CTV isolati non UE, organismi nocivi da quarantena di cui non è nota la presenza nel territorio dell'Unione
- CTV isolati UE, sono considerati organismi nocivi regolamentati non da quarantena (ORNQ) rilevanti per l'Unione.



- isolati di CTV in grado di causare sintomi di butteratura del legno (stem pitting - SP) su arancio dolce in campo, anche in combinazione d'innesto con portinnesti tolleranti o resistenti;
- gli isolati di CTV in grado di superare la resistenza del Poncirus trifoliata e dei suoi ibridi (isolati resistance breaking - RB).



DIAGNOSI

- EPPO Standard PM 7/31(2);
- SFN - Gruppo di lavoro: DOCUMENTO TECNICO UFFICIALE
Indicazioni applicative per le modalità di campionamento, la diagnosi e l'identificazione di isolati di CTV non europei ed europei

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 28

CONTROLLI NEI VIVAI E NELLE FONTI DI APPROVVIGIONAMENTO DEI MATERIALI DI PROPAGAZIONE

► 0 % la soglia di tolleranza degli isolati UE di CTV per:

- i materiali di moltiplicazione di piante ornamentali e di altre piante da impianto destinate a scopi ornamentali
 - i materiali di moltiplicazione delle piante da frutto e le piante da frutto destinate alla produzione di frutti
- tutti i campioni positivi o, almeno, un numero rappresentativo di questi dovrà essere sottoposto a identificazione dell'isolato infettante per escludere l'eventuale presenza di CTV isolati-non UE.

INDAGINI NEGLI AGRUMETI COMMERCIALI

- La presenza di CTV non-EU in Italia non è nota: territorio nazionale zona indenne per gli isolati di CTV non-EU.
- Ricerca isolati non-EU in programmi di monitoraggio.
- ispezioni visive, campionamento e analisi di campioni prelevati da piante con sintomi riferibili a CTV (in particolare, sintomi di butteratura del legno su piante di arancio dolce e pompelmo, soprattutto in impianti realizzati con portinnesti tolleranti o resistenti a CTV) o sospetti tali.
- ricerca di isolati di tipo RB (no sintomi in campo): il prelievo di almeno 20 campioni per agrumeto omogeneo asintomatico.

Ceppi noti a livello internazionale		Presenza in EU	Presenza in IT
Genotipo	Comportamento biologico		
T30	Variabile: da blando a sintomi di deperimento in combinazioni di innesto con arancio amaro/portainnesti suscettibili	Presenti	Segnalati nelle principali regioni agrumicole
T36	Ceppi molto rari a livello internazionale che inducono per lo più SY	Non segnalati.	Non segnalati
VT, T3	Alcuni in grado di dare SP in arancio dolce in campo;	Genotipi di CTV strettamente correlati agli isolati trovati in altre parti del mondo associati a gravi sintomi di SP, sono stati riportati in Sicilia, Spagna, Creta, Grecia, Croazia e Montenegro. (EFSA 2017)	Isolati che hanno prodotto sintomi di SY nel saggio biologico segnalati in alcune regioni agrumicole.
	Nel saggio biologico determinano sintomi severi su diversi indicatori		
T68	In grado di produrre SP su pompelmo ma con diverso grado di severità in funzione degli isolati	Non segnalati	Non segnalati
RB	Blandi o severi a seconda delle segnalazioni; in grado di replicarsi in <i>Poncirus trifoliata</i> e portainnesti resistenti	Segnalati in Grecia; in corso di eradicazione	Non segnalati
HA16-5, S1	Blandi	Non segnalati.	Non segnalati

diagnosi generica di CTV:

- ELISA, DTBIA, Lateral-flow
- (RT-PCR, Real-time RT-PCR, RT-LAMP)

1) RT-PCR basata sul protocollo descritto in Olmos et al. (1999);

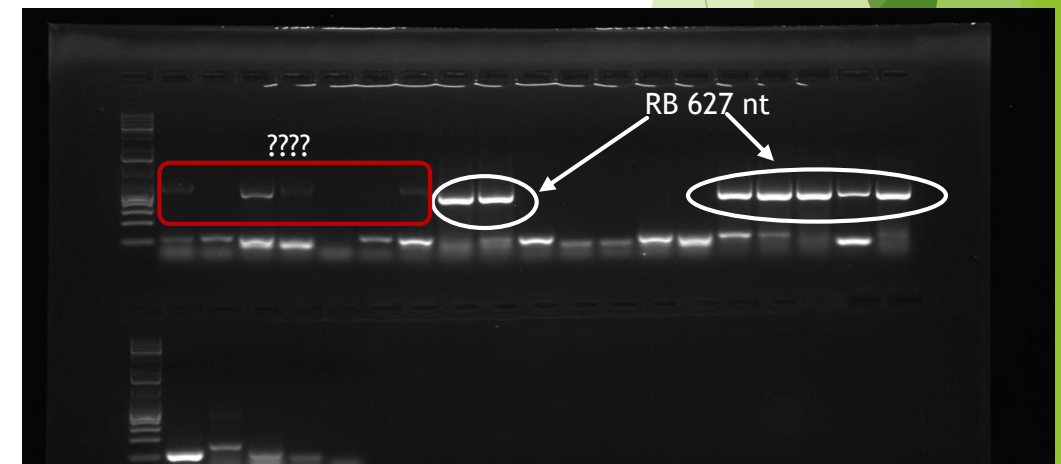
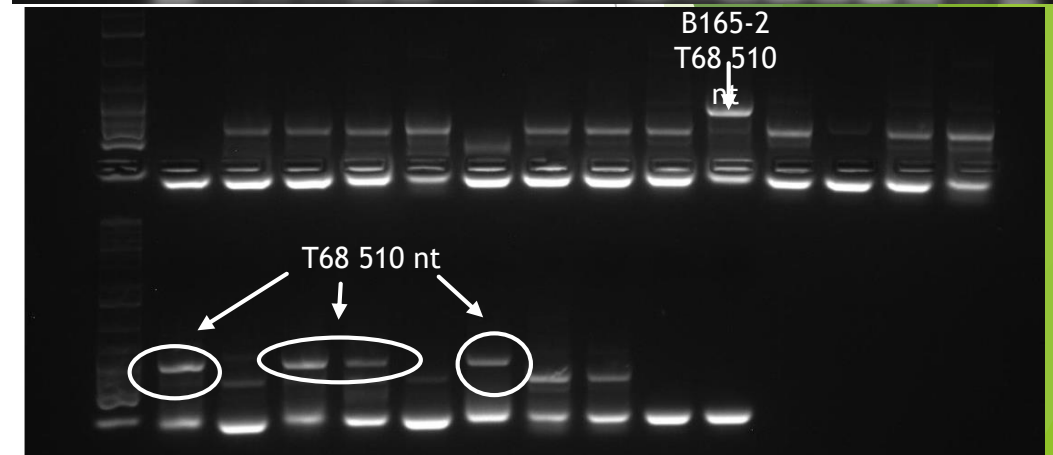
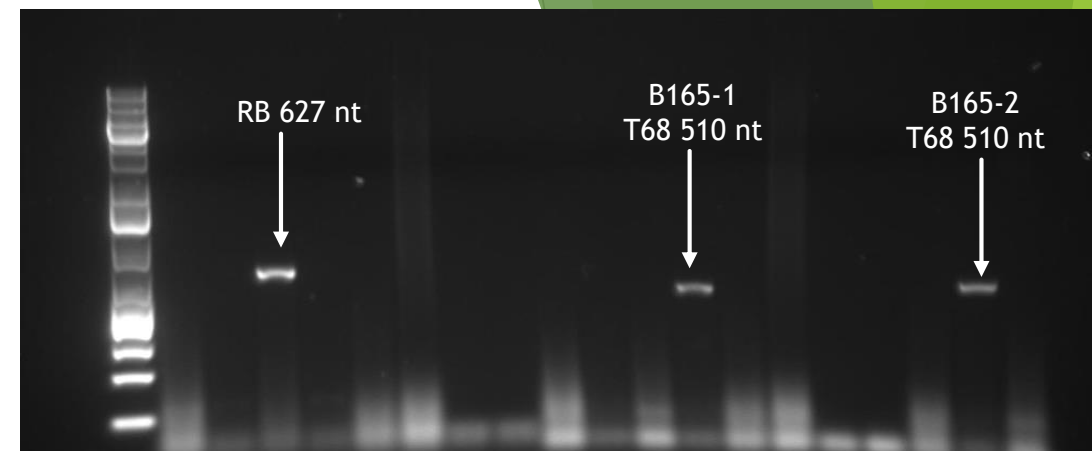
2) Real-time RT-PCR, con l'impiego di kit commerciali 'ready-to-use' o basata su protocolli quali quelli descritti in Saponari et al. (2008) o Bertolini et al. (2008);

3) RT-LAMP basata sul protocollo descritto in Wang et al. (2013).

Prove preliminari: Protocolli ufficiali/primer
Controlli pos per i ceppi Non EU???????

I-ANNO ATTIVITA' PRELIMINARI

Isolato	qPCR						PCR	
	genotype defined by Yokomi papers	probe CP25	probe VT3	Probe T36-NS	Probe T36	T36pol MMM (Hilf 2005)	RB (primers Roy et al., 2013) size 627 nt	T68 (primers Roy et al., 2010) size 510 nt
S1	T36NS	+	-	+	-		neg	neg
B185	VT/T3 e NS	+	+	+	-		neg	neg
B26	?	+	-	+	-		neg	neg
B199	VT/T3	+	+	-	-		neg	neg
B248	VT/T3	+	+	-	-		neg	neg
B384	VT/T3	+	+	+	-		neg	neg
B119	VT/T3	+	+	+	-		pos	pos
RB26	Resistant breaking	+	-	+	-		pos	neg
B77	VT/T3 e T36NS	+	-	+	-		pos	neg
B270	VT/T3 e NS	+	+	+	+		pos	pos
B158	VT/T3 e NS	+	-	+	-		dubbio (banda leggera che sembra più alta)	neg
B371	VT/T3 e NS	+	-	+	-	?	pos	neg
B271	T36	+	-	-	+	pos	dubbio (banda leggera che sembra più alta)	neg
B343	VT/T3 e T36	+	+	-	+	pos	dubbio (banda leggera che sembra più alta)	neg
B32	T30	+	-	-	-		neg	neg
B305	T30	+	-	-	-		neg	neg
B314	T30	+	-	-	-		neg	neg
B391	T30	+	-	-	-		neg	neg
B165	T68 (Roy)	+	+	-	-		neg	pos



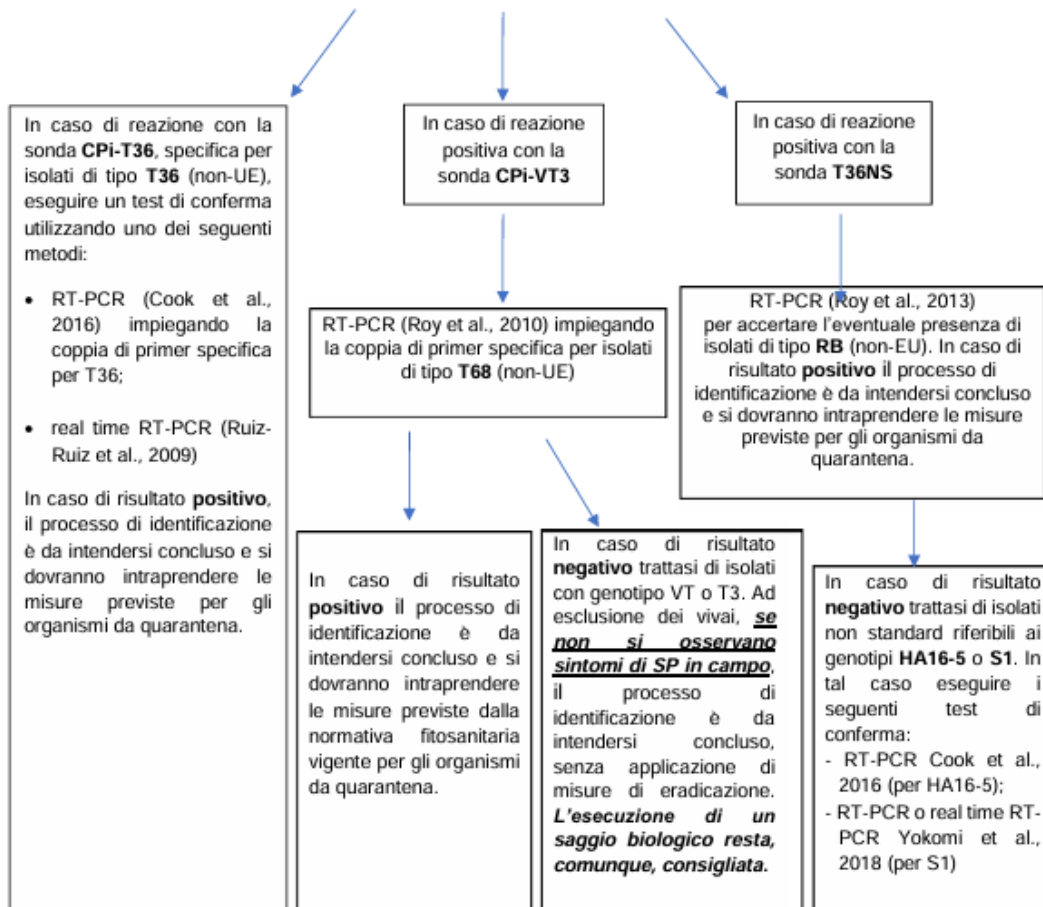
8. PROCEDURE PER L'IDENTIFICAZIONE DEGLI ISOLATI DI CTV

Procedura 1

Prevede l'esecuzione preliminare del test di Multiplex Real time RT-PCR descritto in Yokomi et al. (2010) basato sull'impiego simultaneo, in un'unica reazione, di quattro sonde (CP25-CY5, CPI-T36, CPI-VT3, T36NS) che consentono la discriminazione di isolati con genotipo riferibile ai tipi T30, T36, T3-VT e di isolati non standard (NS) fra cui ricadono gli isolati RB, S1 e HA16-5.

Nota: la sonda **CP25-CY5** è universale e, pertanto, reagisce con tutti gli isolati di CTV, indipendentemente dal genotipo di appartenenza; solo nel caso di reazione unica con questa sonda (e non con le altre tre) l'isolato è da ritenersi di tipo T30.

Multiplex real time RT-PCR (Yokomi et al., 2010)



Diagnosi di isolati di CTV non-EU: 4 procedure operative alternative, da adottare in funzione delle competenze interne al laboratorio e della dotazione di specifiche strumentazioni

Procedura 4

Prevede il sequenziamento completo del genoma virale mediante tecnologia HTS (*High-Throughput sequencing*). A questo test si dovrebbe far sempre seguire un'analisi filogenetica che includa le sequenze genomiche complete rappresentative dei gruppi filogenetici di CTV ad oggi noti (T30, T3, VT, T36, T68, RB, H16-5 e S1), al fine di una corretta attribuzione della sequenza ottenuta ad uno dei suddetti gruppi.

- A. In funzione dell'esito dell'analisi filogenetica, eseguire uno dei test richiamati nelle procedure 1, 2 e 3 per confermare il risultato ottenuto. In particolare, nel caso di isolati di CTV attribuiti sulla base del sequenziamento ai gruppi filogenetici VT e T3 eseguire un test di conferma utilizzando uno dei seguenti metodi di real time PCR: Ruiz-Ruiz et al., 2009 oppure Yokomi et al., 2010 con sonda VT3. Ad esclusione dei vivai, **in assenza di sintomi di SP in campo**, il processo di identificazione è da intendersi concluso, senza applicazione di misure di eradicazione. **L'esecuzione di un saggio biologico resta, comunque, consigliata.**

'Saggio diagnostico molecolare in laboratorio' (3h)

Prevede 4 passaggi:

- 1) Consegna del materiale vegetale da analizzare in laboratorio (con o senza sintomi)
- 2) Preparazione dei campioni (omogeneizzazione tessuto vegetale)
- 3) Estrazione e purificazione degli acidi nucleici
- 4) Analisi molecolare:
 - Real time PCR, PCR



Strumentazione sofisticata e personale altamente specializzato

TEST DIAGNOSTICI VALIDATI

- LAMP COLORIMETRICA per *Xylella fastidiosa*
- Preparazione di 'spot' di succo vegetale su carta Whatman 3MM da sottoporre a test molecolari per la diagnosi di CTV, *X. fastidiosa* e *Candidatus liberibacter spp* (HLB)

NO strumentazione sofisticata, NO procedura di estrazione e purificazione acido nucleico del patogeno, NO personale altamente specializzato

1-LAMP COLORIMETRICA per *Xyllella*: approccio già validato su matrice olivo nel progetto “FREE@POC”

1. Preparazione campione: piccioli fogliari o pezzetti di rametto lignificato



0.3-0.5 gr= 4 piccioli/8 piccioli a seconda della tipologia di foglie



0.5 gr= 8-10 pezzetti di rametti lignificati (raccolti da almeno 4 diversi rametti)

Extraction buffer: (NaOH, DIECA , PVP-25K, Triton)

- Treatment with HCl 0.4M
- Dilution 1:10 in sterile water
- 1ul in 25 LAMP mix

1- LAMP

L'amplificazione isotermica mediata da loop (LAMP) è una tecnica diagnostica molecolare applicabile direttamente in campo, a costo contenuto che permette l'amplificazione isotermica in breve tempo (30 min) degli acidi nucleici.

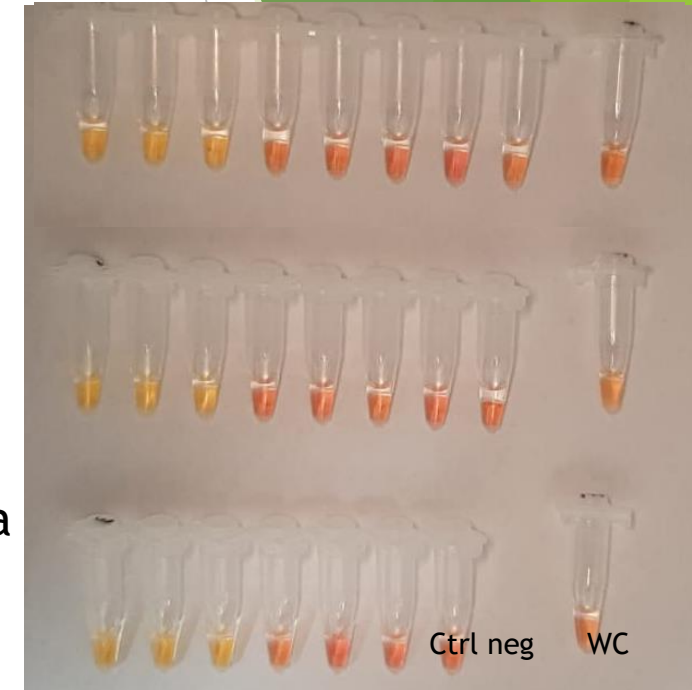
- L'efficienza di amplificazione elevate
- Costi ridotti perchè non sono richieste strumentazioni sofisticate
- Amplificazione su DNA o RNA (stampo) aggiungendo l'enzima "reverse transcriptase (RT-LAMP)"
- I reagenti possono essere conservati anche a RT
- Rilevamento: fluorescenza/reazione colorimetrica/torbidità

LAMP- *Xylella fastidiosa*
(primer Harper et al., 2010 -
Annex 4 Reg. (UE)
2020/1201)



device portatile
amplificazione a 65 °C

→
Reazione
colorimetrica



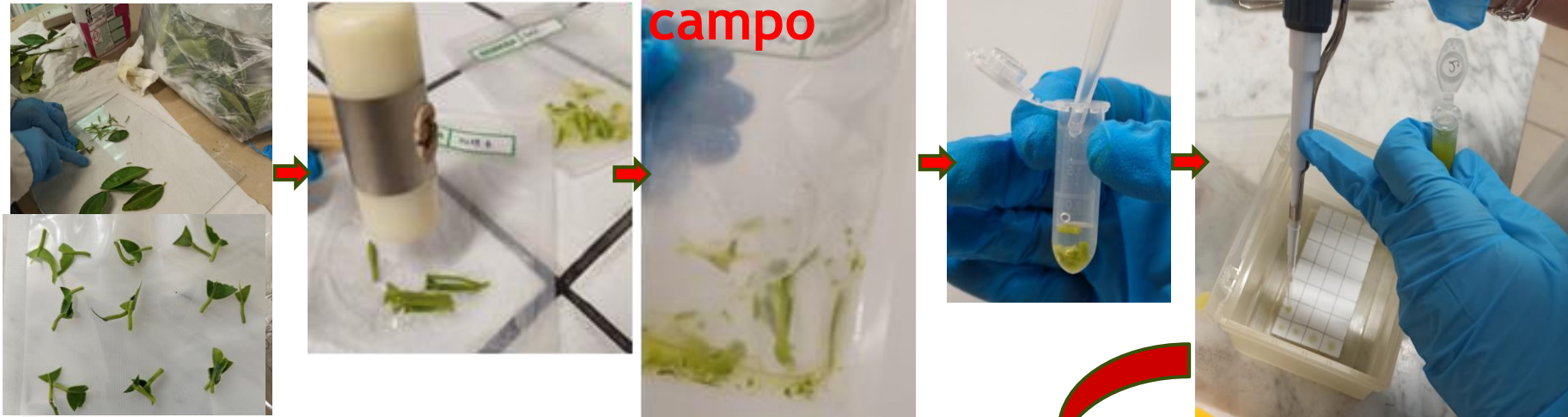
Diluzioni scalari ottenute con
contaminazioni artificiale
sospensione batterica

Sensibilità: 10^4 cell forming units (CFU)

Validato su diverse specie di Citrus

2- Spot su Carta Whatman - da effettuare in VIVAIO o in

campo



- ❖ Succo grezzo depositato in 1 cm² su carta Whatman (2-3 repliche/campione)
- ❖ tutto ciò che è presente nel succo grezzo, incluso gli acidi nucleici, viene adsorbito e immobilizzato sulla carta.
- ❖ CARDS conservate a 4 °C anche per 1 mese

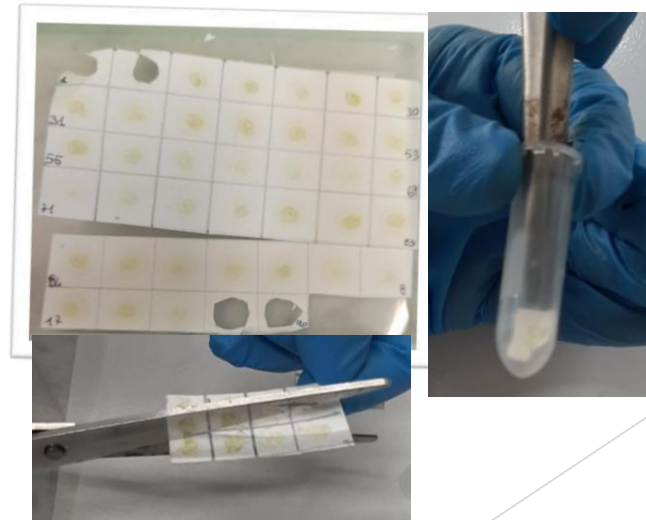
➤ Patogeni target:

- CTV (floematica) (pianta infetta)
- X. fastidiosa (xylema)
- HLB (floema)

utilizzate preparazioni di succo grezzo contaminate artificialmente con DNA dei 2 patogeni

- Materiale vegetale da prelevare: Piccioli fogliari
- Omogeneizzazione: in tampone PBS+0.2%DIECA

**‘CARDS’ da portare/spedire in laboratorio
RNA/DNA stabile fino ad 1 mese**

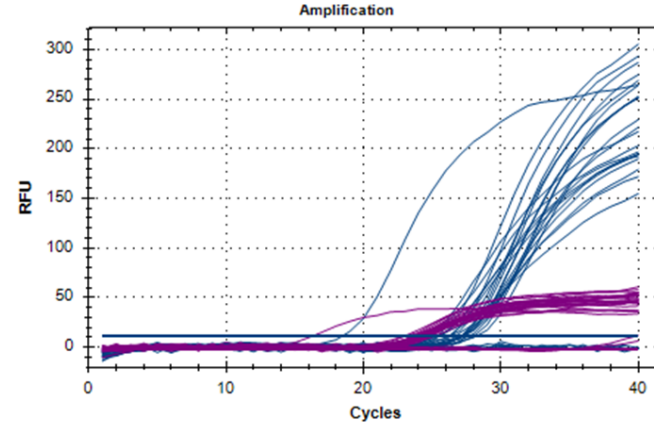


Eluizione RNA/DNA in tampone di estrazione con glicina (Bertolini et al., 2008)

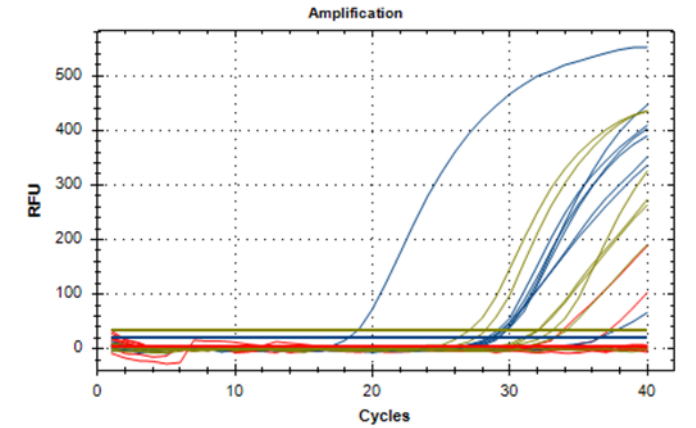
95 °C x 10 min
(dischetti conservati a -20 °C)

- Real time in laboratorio
- LAMP in lab ma anche direttamente in campo/vivaio

A. RT-real time PCR (in lab) 1h

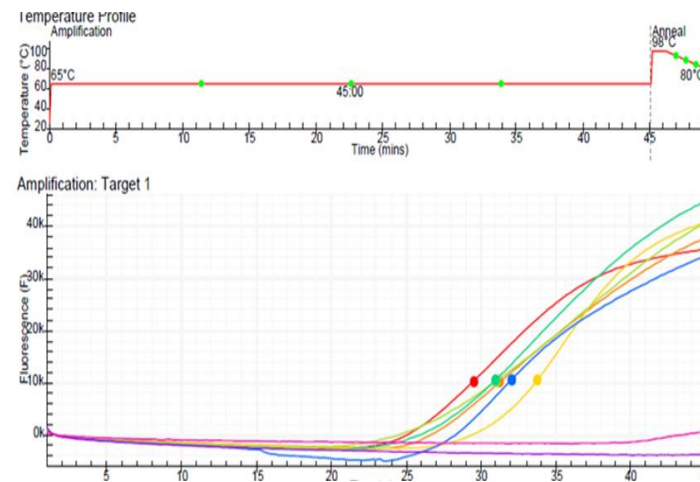


RT-qPCR:
Multiplex CTV-gene COX
(diagnosi CTV/Ceppi non UE)



RT-qPCR:
Multiplex CTV-HLB-X. fastidiosa

B. RT-LAMP fluorescente per CTV(in lab/campo/vivaio) 45 min



CTV					
	Name	Result	Values		
1		Positive	29:30	86.09°C	
2		Positive	31:15	86.31°C	
3		Positive	33:45	86.25°C	
4		Positive	31:00	87.02°C	
5		Positive	31:00	86.18°C	
6		Positive	32:00	86.22°C	
7		Negative			
8		Negative			

Wang et al., 2013

Sei qui: Home » Attualità » Attualità » Lamezia, giornata tecnica su approcci diagnostici molecolari per il rilevamento di patogeni negli agrumi

Lamezia, giornata tecnica su approcci diagnostici molecolari per il rilevamento di patogeni negli agrumi

Venerdì, 04 Ottobre 2024 13:34



Lamezia Terme - Si è registrata una buona partecipazione di tecnici, vivaisti, ispettori fitosanitari e agricoltori alla giornata tecnica dal titolo "Approcci diagnostici molecolari per il rilevamento rapido in campo e in vivaio di Xylella fastidiosa, Citrus tristeza virus e Candidatus liberibacter spp. in piante di agrumi", tenutasi il 2 ottobre presso il Centro Sperimentale Dimostrativo dell'ARSAC a Lamezia Terme, in località Prato. Questo evento ha evidenziato l'interesse crescente per i metodi diagnostici e le nuove tecnologie applicate alla prevenzione delle principali malattie degli agrumi, tematiche di fondamentale importanza per garantire un'agricoltura sostenibile e di

Post di ARSAC Azienda Regionale per lo Sviluppo dell'Agricoltura Calabrese



ARSAC Azienda Regionale per lo Sviluppo dell'Agricoltura Calabrese

3 ottobre 2024 · 🌐

Alcuni scatti della giornata tecnica "Approcci diagnostici molecolari per il rilevamento rapido in campo e in vivaio di Xylella fastidiosa, Citrus tristeza virus e Candidatus liberibacter spp. in piante di agrumi" che si è svolta Mercoledì 2 ottobre a Lamezia Terme, presso il Centro Sperimentale Dimostrativo dell'ARSAC di San Pietro Lametino

#arsacweb con Luigia Iuliano



VANTAGGI

- Facile da eseguire, non richiedono strumentazione sofisticata
- Tempo di esecuzione breve (meno di 2 ore)
- Costo minore rispetto alla procedura che prevede l'estrazione e purificazione del DNA/RNA
- Possibilità di conservarle a 4°C fino ad un mese prima del test
- Spedizione in laboratorio a temperatura ambiente
- Nessuna differenza tra cards processate immediatamente e conservate
- Spot direttamente in campo/vivaio senza nessun movimento di materiale vegetale infetto, riduzione del rischio di un eventuale diffusione del batterio in aree indenni

PROF. SAVINO..... GRAZIE!



Discussione tesi dottorato in Protezione delle culture 4/04/2004