QUALIVIVA

MINISTERO POLITICHE AGRICOLE ALIMENTARI E FORESTALI

D.D. 23042 del 17/11/2011

# AZIONE 4 – DIDATTICA DELLA PREVENZIONE DELLE MALATTIE

CREA-VIV – Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria. Unità di ricerca per il Vivaismo e la gestione del verde ambientale ed ornamentale.

Anita Haegi; Beatrice Nesi; Simona Pecchioli; Sara Lazzareschi

crea
Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria

**AZIONE 4 – DIDATTICA DELLA PREVENZIONE DELLE MALATTIE**

## Introduzione

La definizione di processi volti al miglioramento della qualità ed alla riduzione dei costi delle opere a verde non può prescindere dalla messa a punto di opportuni protocolli di diagnosi al fine di prevenire e controllare la diffusione di eventuali patogeni.

L'azione 4 del progetto è stata condotta dalla U.O. del CREA-VIV e ha inteso ottimizzare e validare un protocollo di diagnosi basato su un *Macroarray* di DNA per l'individuazione in multiplex degli agenti causali di malattie complesse come i marciumi radicali e del colletto in piante ornamentali.

Il metodo utilizzato, altamente innovativo, si basa sul riconoscimento del DNA, fissato su membrana, del patogeno o dei patogeni in esame con l'impiego di sequenze "sonda" (chiamate oligonucleotidi *detector*) specifiche. Tale strumento di diagnosi è estremamente versatile, in quanto di volta in volta è possibile variare sia il numero di campioni da analizzare, che il numero di patogeni da individuare, permettendone la diagnosi contemporanea quando associati allo stesso campione.

Tale tecnica può essere utilizzata anche per un'analisi immediata del terreno su cui effettuare l'impianto (parco o giardino) in modo da procedere ad eventuale risanamento dell'area nel caso in cui vengano rilevati i patogeni oggetto dell'analisi, oppure evitare la messa a dimora di specie vegetali suscettibili alle specie patogene endemiche. Tali indagini preventive potranno essere considerate al pari dell'analisi chimico-fisica del terreno su cui verrà effettuato il nuovo impianto.

In definitiva uno strumento di diagnosi di così elevata versatilità apre nuove possibilità all'applicazione di strategie fitosanitarie legate a programmi di monitoraggio e di diagnostica preventiva, nonché per certificazioni fitosanitarie o più in generale di qualità.

Allo stato attuale tramite il sistema diagnostico basato sul *Macroarray* è possibile identificare in contemporanea, con un'unica analisi, patogeni soprattutto legati ai marciumi del colletto e delle radici e tracheomicosi, quali ***Phytophthora* spp**., ***Phytophthora cactorum***, ***Phytophthora cinnamomi***, ***Phytophthora hedraiandra*, *Pythium ultimum***, ***Fusarium* spp**., ***Fusarium oxysporum***, ***Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea***, ***Sclerotinia sclerotiorum***, ***Armillaria* spp**., ***Armillaria mellea***, ***Cylindrocarpon* spp**., e ***Cylindrocarpon heteronema***.

## Lavoro effettuato

Nel corso del progetto si è lavorato alla ottimizzazione della piattaforma *Macroarray,* messa a punto precedentemente e con questa si è proceduto all'analisi di campioni prelevati in vivaio da piante con evidenti sintomi di marciumi radicali e del colletto (vedi tabella 1).

## Campionamenti in vivaio

I campionamenti sono stati eseguiti in primavera e/o autunno, nelle condizioni più favorevoli allo sviluppo delle patologie in esame, presso alcune aziende vivaistiche del pistoiese. Il campionamento è stato effettuato prelevando piante intere di 3-4 anni d'età, alcune allevate in contenitore altre in pieno campo, che manifestavano sintomi riconducibili a marciumi radicali e/o del colletto, quali placche necrotiche nella zona del colletto o evidenti disseccamenti della chioma.

Tab. 1 – Elenco delle specie arboree ed arbustive prelevate per la messa a punto del metodo diagnostico

| ***Famiglia*** | ***Genere*** | ***Specie*** | ***Denominazione volgare*** |
|---|---|---|---|
| *Mimosaceae* | *Albizzia* | *julibrissin* | Acacia di Costantinopoli Gaggia arborea |
| *Rosaceae* | *Malus* | *domestica* 'Melrose' | |
| *Bignoniaceae* | *Catalpa* | *bignonioides x bunjei* | Albero dei sigari |
| *Myrtaceae* | *Myrtus* | *ugni* 'Flambeau' | |
| *Myrtaceae* | *Eucalyptus* | *parvifolia* | |
| *Myrtaceae* | *Eucalyptus* | *stellulata* | |
| *Rosaceae* | *Prunus* | *serrulata* 'Amanogawa' | Ciliegio del Giappone |
| *Fabaceae* | *Laburnum* | *anagyroides* | Maggiociondolo o Falso ebano |
| *Fabaceae* | *Laburnum* | *x watereri 'Vossii'* | Maggiociondolo o Falso ebano |
| *Cupressaceae* | *Cupressus* | *sempervirens* | Cipresso mediterraneo |
| *Cupressaceae* | *Cryptomeria* | *japonica* | Cedro rosso del Giappone |
| *Araucariaceae* | *Araucaria* | *araucana* | |
| *Pinaceae* | *Picea* | *pungens* 'Glauca Globosa' | Abete del Colorado |
| *Cupressaceae* | *Chamaecyparis* | *obtusa* 'Nana Gracilis' | Cipresso ottuso |
| *Pinaceae* | *Picea* | *pungens* 'Iseli Foxtail' | |
| *Cupressaceae* | *Platycladus* | *orientalis* | Tuja orientale |
| *Buxaceae* | *Buxus* | *sempervirens* | Bosso |
| *Pinaceae* | *Pinus* | *mugo* | Pino mugo |
| *Taxaceae* | *Taxus* | *baccata* | Albero della morte |
| *Adoxaceae* | *Viburnum* | *tinus* | Lentaggine |

Nel campionamento, dove possibile, trattandosi di infezioni naturali e quindi del tutto casuali, si è cercato di attenersi all'elenco redatto dal Partner n°1 – DiSPAA (Università di Firenze), nell'ambito dell'Azione 2 del progetto stesso.

## Descrizione tecnica del sistema diagnostico basato sul *Macroarray*

Nel corso del Progetto il sistema diagnostico *Macroarray* è stato ottimizzato in particolare per quanto riguarda i seguenti aspetti:

- estrazione di DNA;
- amplificazione iniziale;
- *Macroarray*.

Estrazione di DNA

In laboratorio, sui campioni precedentemente prelevati in azienda, si è proceduto al prelievo di porzioni di fusto nella zona sottocorticale, in cui erano ben visibili gli effetti dei patogeni. Successivamente si è proceduto alla messa a punto del protocollo di estrazione del DNA. Inizialmente era stata effettuata l'estrazione con il metodo CTAB 3%, particolarmente indicato per l'estrazione di DNA da campioni vegetali legnosi, ma richiedendo tempi di esecuzione piuttosto lunghi, successivamente tale estrazione è stata effettuata mediante appositi Kit commerciali.
Il DNA estratto mediante il kit *Invisorb Spin Plant Mini Kit* (Invitek) è stato quantificato e ne è stata valutata la qualità ed idoneità per le successive fasi di analisi.

Per la messa a punto della metodica sono state anche condotte estrazioni di DNA dai terreni relativi ad alcuni dei campioni vegetali su citati, utilizzando kit commerciali specifici per estrazione da suolo.

Amplificazione iniziale

Al fine di ottenere una alta sensibilità del sistema, il DNA dei campioni in esame è stato arricchito tramite amplificazione della regione ITS.

Recentemente gli studi di diagnostica molecolare dei funghi patogeni, si sono concentrati sull'analisi del DNA nucleare ribosomiale (rDNA), che è stato ampiamente utilizzato in studi filogenetici molecolari. L'rDNA si presenta strutturato in tre sub-unità separate da una regione ITS (*internal transcribed spacers*) che presenta segmenti altamente conservati, alternati ad altri con elevata variabilità. La variabilità della sequenza di tale regione permette di discriminare specie strettamente correlate ed è per questo che viene comunemente utilizzata nella diagnostica molecolare dei funghi.

Per questo motivo gli oligonucleotidi *detector* del *Macroarray* sono disegnati sulla regione ITS, che quindi è la regione da arricchire per una maggiore sensibilità.

L'amplificazione della regione ITS1/ITS2 viene eseguita tramite *nested* PCR, come descritto da Martin e Rygiewicz (*BMC Microbiology* 2005, 5:28); per la prima amplificazione vengono utilizzati i *primer* NSA3 e NLC2, i prodotti di questa vengono quindi amplificati con i *primer* NSI1 e NLB4. Le reazioni sono state effettuate in un volume totale di 50 µl, contenente 2 µl di DNA ed i vari reagenti necessari (*buffer* 1X, $MgCl_2$ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, *primer* 0,2 mM ciascuno, *Taq* polimerasi 0,04 U/µl). Per l'amplificazione è stato utilizzato un termociclatore *Eppendorf* impostando il seguente protocollo termico: denaturazione iniziale a 95°C per 7', seguita da 35 cicli a 95°C per 30" (denaturazione), a 60°C per 40" (*annealing*), a 72°C per 40" (estensione), con una estensione finale a 72°C per 5'. I prodotti di PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio 1,5%.

Macroarray

Si procede quindi con la metodica del *Macroarray* su membrana basato sulla marcatura diretta del DNA e individuazione per chemioluminescenza, che si articola nelle seguenti fasi:

- Preparazione della membrana (fissaggio di oligonucleotidi detector);
- Marcatura diretta degli amplificati dei DNA campioni;
- Ibridazione, lavaggi, esposizione.

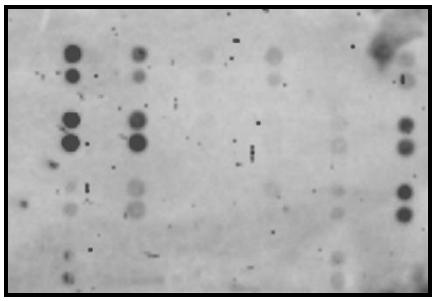
**Preparazione della membrana:** i singoli oligonucleotidi *detector* messi a punto vengono risospesi in uno *spotting buffer* ad una adeguata concentrazione (in genere 100 µM), vengono 'caricati' su piastre ELISA in base al disegno sperimentale e applicati su membrane Nylon + (*Hybond*) con un *Pin Replicato*r a 96 pin in duplice copia. La membrana viene quindi asciugata ed esposta ai raggi UV, per creare un legame covalente tra gli acidi nucleici e la membrana stessa; si procede al lavaggio della stessa prima in SDS e poi con Tris 100 mM. A questo punto la membrana è pronta per l'uso.

**Marcatura diretta degli amplificati dei DNA campioni:** i prodotti della PCR sono stati marcati con il kit *Genes Images AlkPhos Direct Labelling* (*Amersham Biosciences*) seguendo le istruzioni del produttore. La marcatura consiste nel legame diretto degli amplificati con la fosfatasi alcalina, che è in grado di metabolizzare (defosforilazione) il reagente *CDP-Star* ad un prodotto che produce un segnale chemiluminescente in grado di impressionare una lastra autoradiografica o di dare un segnale positivo su *Image Analyzer* (Fig.2).

**Ibridazione, lavaggi, esposizione:** in seguito ad una breve fase di pre-ibridazione la membrana viene posta in un fornetto da ibridazione con un *buffer* contenente il DNA marcato per 16-18 ore a

54°C o 55°C, a seconda della stringenza necessaria, in agitazione. In seguito ad una serie di lavaggi, il reagente CDP-Star (*Detection System CDP-Star*, *Amersham Biosciences*) viene aggiunto alla membrana per dieci minuti e questa viene successivamente esposta su lastre autoradiografiche per la rilevazione della chemioluminescenza. Le lastre vengono sviluppate dopo 90 minuti di esposizione, tempo ottimizzato per il massimo sviluppo del segnale con la minima interferenza del fondo. Alternativamente le membrane possono essere lette direttamente su *Image Analyzer* (per es. ChemiDoc, Bio Rad).

Fig. 2 – Esempio dei risultati ottenuti con analisi *Macroarray.*



## Risultati ottenuti dall'analisi tramite Macroarray

L'analisi effettuata, basata sul *Macroarray*, ha permesso di identificare in *multiplex* patogeni fungini diversi legati ai marciumi del colletto/radici e tracheomicosi, appartenenti a 4 generi e risultati presenti su 11 campioni appartenenti alle 20 specie prese in esame (Tab.2).

Tab. 2 - Funghi patogeni e saprofiti identificati nei campioni analizzati

| **Specie** | **Funghi identificati** |
|---|---|
| *Prunus serrulata 'Amanogawa'* (2 diversi campioni) | *Cylindrocarpon spp./heteronema* |
| *Taxus baccata* | *Cylindrocarpon spp./heteronema* |
| *Malus domestica 'Melrose'* | *Fusarium spp./ F.oxysporum* |
| *Picea pungens* | *Cylindrocarpon spp./heteronema* |
| *Catalpa bignonioides* | *Phytophthora spp.*<br>*P. hedraiandra, P. cinnamomi* |
| *Pinus mugo* | *Cylindrocarpon spp./heteronema* |
| *Laburnum anagyroides* (2 diversi campioni ) | *Cylindrocarpon spp./heteronema* |
| *Albizzia julibrissin* | *Phytophthora spp.* |
| *Eucaliptus parvifolia* | *Cylindrocarpon spp./heteronema* |

Sulla base dei risultati ottenuti è possibile affermare che la tecnica *Macroarray* rappresenta un valido strumento per la diagnosi su larga scala e l'individuazione di più patogeni fungini eventualmente coinvolti in contemporanea nella malattia; essa può essere applicata anche per una valutazione dello stato sanitario del terreno, limitatamente ai patogeni menzionati nell'introduzione, per i quali è stata messa a punto questa metodologia.