

(Bando OIGA II) DM 1861/7818/2011 del 26/01/2011

Progetto "ACTINIDIA"

(Azioni di Controllo e Tecnicamente INnovative nella IDentificazione di Avversità su Actinidia)

Coordinamento: Dipartimento di Scienze e Tecnologie per
l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia (DAFNE)

Università degli Studi della Tuscia di Viterbo – Coord. Sci. Dr. Giorgio M. BALESTRA

Relazione finale Tecnico-Scientifica Progetto OIGA 'ACTINIDIA'

Le malattie di natura batterica costituiscono la classe di patologie delle colture agrarie maggiormente problematica in merito alla loro diagnostica ed al loro controllo. Tali agenti patogeni, attaccando e danneggiando uno o più tessuti, causano danni che possono portare al deperimento e alla morte stessa della pianta. Le perdite economiche possono essere molto gravi e riguardano non solo una diminuzione della produzione o la perdita di raccolti o piantagioni, ma anche, in alcuni casi, l'impossibilità stessa di sviluppo di un settore di produzione in risposta alle richieste del mercato.

E' questo il caso delle batteriosi ed in particolare di quella denominata cancro batterico, a carico dell'actinidia e dei suoi frutti, i kiwi, le quali, in diverse regioni e da diversi anni, stanno colpendo pesantemente un settore agro-industriale in cui l'Italia è indiscusso leader mondiale. La produzione e il commercio di kiwi riveste un importante ruolo nell'economia ortofrutticola del nostro Paese. Dalla sua introduzione all'inizio degli anni '70, il kiwi ha trovato in Italia un ambiente di coltura favorevole, che oggi, con oltre 500.000 t/anno, copre circa 1/3 della produzione mondiale e si pone come il principale produttore mondiale. Il Lazio, insieme a Piemonte, Veneto ed Emilia-Romagna, sono le regioni maggiormente interessate da tale attività. *Actinidia deliciosa* Pl. (cv. Hayward) è la cultivar maggiormente diffusa, sebbene da diversi anni vi sia stato un notevole incremento delle cultivar di *Actinidia chinensis* con frutti a polpa gialla come Jin Tao, Zespri Gold, Soreli.

La mancanza di un sistema di riconoscimento per questa tipologia di patogeni a carico del kiwi che sia rapido, affidabile e sensibile ha impedito a lungo la diagnosi precoce di queste fitopatie in campo e nei processi di lavorazione e di conservazione e la messa in atto da parte dei

produttori e dell'intera filiera di adeguate misure di contenimento/riduzione delle perdite da essa derivanti.

L'approccio tradizionale di riconoscimento di questi patogeni richiede oggi tempi piuttosto lunghi (2 settimane) ed inoltre non sono disponibili strumenti per effettuare una diagnosi pre-sintomatica, nella fase in cui il batterio è presente nella pianta/magazzino/celle-frigo, ma ancora non sono visibili i sintomi della malattia/frutti.

Lo sviluppo di metodi di diagnostica molecolare (basata sull'analisi di DNA e RNA) ha migliorato significativamente la capacità di identificazione di patogeni, ma almeno fino all'inizio del presente Progetto, non era stata sviluppata rispetto a quello che è diventata dal 2008 una vera emergenza fitosanitaria nazionale per l'actinidia.

Le piante di actinidia sono soggette all'attacco di due diverse patologie di *P. syringae*: oltre a *P. s. pv. actinidiae*, agente del cancro batterico, di cui si è accennato sopra, è presente anche *P. s. pv. syringae*, agente della necrosi florale batterica. A questi si aggiunge la specie *P. viridiflava*, agente della maculatura batterica.

La stretta affinità tra i tre agenti patogeni rende estremamente problematica la loro identificazione morfologica e biochimica, così come la loro chiara caratterizzazione molecolare. Si rende così assolutamente necessario un unico test di diagnosi molecolare per i tre agenti patogeni.

Proprio questo era lo scopo principale del presente progetto: sviluppare dei sistemi

molecolari di diagnosi qualitativa e quantitativa, rapidi, efficienti ed economici, in grado di verificare la presenza, anche in assenza di sintomi, di queste popolazioni batteriche (*P. s. pv. syringae*, *P. viridiflava* e *P. s. pv. actinidiae*) garantendo e tutelando i frutteti di actinidia sull'intero territorio nazionale, le nuove varietà/produzioni vivaistiche, come i sistemi di lavorazione, conservazione e commercializzazione dei frutti di kiwi che, essendo in maggioranza esportati, devono essere certificati anche rispetto a queste problematiche al fine di determinare una sicurezza fitosanitaria ed un valore aggiunto ad un prodotto agroalimentare di eccellenza

Made in Italy.

In dettaglio gli obiettivi generali e specifici che ci si era preposti di raggiungere nell'arco temporale del Progetto erano:

Caratterizzazione genetica di *P. s. pv. actinidiae*, *P. s. pv. syringae* e *P. viridiflava* per trovare

Regioni genomiche discriminanti tra le specie

La specificità è un aspetto chiave di ogni sistema di diagnosi. Per la realizzazione di un sistema di diagnosi basato sulla tecnologia PCR è necessario disporre di regioni genomiche polimorfiche e discriminanti tra le specie oggetto di studio. Tale prima attività ha richiesto dunque la caratterizzazione molecolare dei tre agenti patogeni, basandosi sulla analisi di dati pre-esistenti (anche dati internazionali) o su dati appositamente ottenuti.

Sviluppo di un protocollo di diagnosi qualitativa mediante multiplex-PCR

In regioni idonee dovevano quindi essere disegnati dei primers specie-specifici per *P. s. pv. actinidiae*, *P. s. pv. syringae* e *P. viridiflava* in maniera tale da permettere l'utilizzo di più coppie di primers (multiplex-PCR) contemporaneamente al fine di discriminare, in base alla lunghezza dei frammenti amplificati, i diversi agenti patogeni in seguito ad elettroforesi su gel di agarosio e visualizzazione dei prodotti di PCR agli UV.

Sviluppo di un protocollo di diagnosi quali-quantitativa mediante real-time PCR

Esistono attualmente diverse tecnologie di realizzazione della real-time PCR. Il principio alla base del sistema di quantificazione è la misura della fluorescenza che viene prodotta durante l'amplificazione del bersaglio. La quantità di fluorescenza emessa è proporzionale alla quantità di prodotto di PCR (amplificone), il che permette il monitoraggio della reazione. Le differenze risiedono nel meccanismo attraverso il quale viene emesso il segnale fluorescente. Il principio più semplice ed economico è basato sul legame al DNA a doppio filamento di un composto intercalante, quale il SYBR Green I. Gli altri tre principi sono basati sull'introduzione di un oligonucleotide addizionale marcato con un fluorocromo. In questi ultimi il segnale di fluorescenza è rilasciato dopo idrolisi della sonda (hydrolysis probes) o durante l'ibridazione dell'amplificone con uno (molecular beacon) o due (hybridization probes) oligonucleotidi. Questi ultimi, grazie all'introduzione di una sonda addizionale possono presentare una maggiore specificità.

Validazione dei metodi diagnostici sviluppati

E' questa la fase di valutazione dell'efficacia dei metodi diagnostici sviluppati, così come delle loro potenzialità applicative. Tale fase consiste quindi nel valutare da un lato l'accuratezza di tali metodi in termini di specificità, sensibilità e robustezza, dall'altro l'efficacia in relazione ad altri approcci di diagnosi esistenti di tipo tradizionale.

Dunque l'obiettivo finale del Progetto ACTINIDIA è stato quello di sviluppare dei sistemi molecolari di diagnosi qualitativa e quantitativa, rapidi, efficienti ed economici, in grado di verificare la presenza, anche in assenza di sintomi, **dei 3 patogeni batterici del kiwi (*P. s. pv. syringae*, *P. viridiflava* e *P. s. pv. actinidiae*)**.

Va premesso, a tal proposito, che le conoscenze di base disponibili all'inizio del Progetto erano molto diverse tra i 3 diversi patogeni. Infatti, mentre per i primi due patogeni sono disponibili informazioni assai scarse, per *P. s. pv. actinidiae*, la sua pericolosità e dannosità hanno fatto sì che esso venga da alcuni anni studiato intensamente da diversi gruppi di ricerca in tutto il mondo.

Pseudomonas syringae pv. *syringae*

Questo è stato certamente il patogeno più difficile da studiare per diversi motivi: il primo è che in questo taxon (patovar) vengono abitualmente inclusi ceppi di *Pseudomonas syringae* la cui collocazione tassonomica non è ancora del tutto definita. Ciò fa sì che nelle banche dati internazionali di sequenze genetiche sia estremamente difficile discernere quali sequenze siano da ricondurre realmente alla patovar *P. s. pv. syringae*.

Il secondo problema, è che è effettivamente molto difficile stabilire quali tra gli isolati di *Pseudomonas syringae* siano quelli che determinano danni su actinidia (principalmente macchie necrotiche fogliari di piccole dimensioni) piuttosto che altri morfologicamente e geneticamente molto simili ai primi, presenti invece solo casualmente sul filloplano di actinidia (o all'interno dei tessuti dello stesso) e sul quale non determinano alcun tipo di lesione.

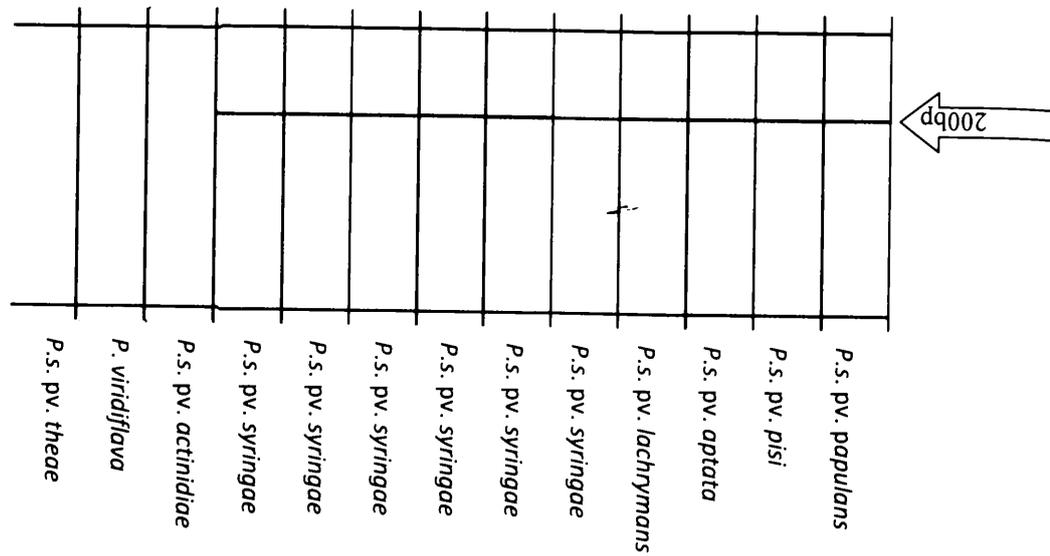
Per tali motivi, in una prima fase è stato necessario raccogliere degli isolati effettivamente provenienti da lesioni su foglie di *Actinidia* spp. e valutarne la patogenicità mediante contaminazione artificiali di tessuti di actinidia allevati in ambiente controllato. Su un pool consistente di isolati di partenza (circa una trentina), solo pochi (8) hanno riprodotto i sintomi riferibili a *P. s. pv. syringae*, risultando realmente patogeni. Di questi ultimi si è cercato di approfondire le conoscenze molecolari, finora molto scarse e confuse, nel tentativo assai complesso di rinvenire regioni che siano per essi sufficientemente caratteristiche da consentire la definizione di un protocollo molecolare di identificazione affidabile.

Anche per questo taxon, come nei casi precedenti, si è dapprima lavorato alla definizione della sequenza corretta della regione intergenica degli spaziatori trascritti (ITS) del DNA ribosomiale. Quindi sono state amplificate le regioni corrispondenti, avendo cura di analizzare solo gli isolati rinvenuti da lesioni fogliari a carico di *Actinidia* spp. Le sequenze ottenute sono state comparate, utilizzando lo strumento online BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), con quelle presenti nei database internazionali (National Center for Biotechnology Information - NCBI). Purtroppo nuovamente, come nel caso di *P. s. pv. actinidiae*, non è stato possibile rinvenire nelle sequenze delle differenze sufficienti alla identificazione univoca di questa patovar, poiché le stesse hanno mostrato percentuali di omologia vicine al 100% con quelle analoghe di diverse *Pseudomonas*.

Si è quindi tentato un approccio differente: la realizzazione di una SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), cioè la sequenza di un amplicone specifico per gli isolati di PSS. Per ottenere questo amplicone è necessario confrontare numerosi profili RAPDs, ovvero serie di ampliconi generati dall'utilizzo in PCR di diversi primers casuali con una lunghezza di solo 10 basi ciascuno (random decamers). Nel nostro caso di studio, sono stati analizzati tutti i profili elettroforetici (ciascuno formato da più ampliconi) generati mediante PCR con 10 diversi primers casuali dagli isolati di *P. s. pv. syringae*, in confronto con quelli generati da tutte le pseudomonadi affini presenti nella nostra collezione di microrganismi. Tramite questa analisi è stato identificato un solo frammento (amplicone) che mostrava caratteristiche di unicità interessanti.

Tale amplicone è stato clonato e sequenziato. Il risultato, una sequenza di circa 420 nucleotidi, è stato sottoposto a comparazione con le sequenze presenti nei database NCBI, comprese le sequenze WGS genomiche presenti, con le stesse modalità illustrate per la sequenza ITS.

La sequenza del frammento (rivelatosi poi parte di una "putative protein") è risultata abbastanza caratteristica, almeno rispetto alla maggior parte delle pseudomonadi analoghe. D'altra parte, sono invece state riscontrate poche basi di differenza rispetto ad alcune patovar di *Pseudomonas syringae*. Queste sequenze più simili a quella da noi ottenuta erano quasi tutte relative a taxa che notoriamente producono lesioni necrotiche fogliari su ospiti vegetali diversi (es. *P. s. pv. aptata*, *P. s. pv. lachrymans*, *P. s. pv. pisi* e *P. s. pv. papulans*). Questa osservazione ci sembra particolarmente interessante in quanto suggerisce una certa omologia tra organismi che di fatto sembrano avere attitudini patogenetiche molto simili; a tal proposito, si sta cercando di predisporre le basi per un nuovo filone di ricerca in tal senso.



Anche in questo caso sarebbe stato di estrema utilità poter disporre dell'intera sequenza genomica degli isolati in nostro possesso per poter allargare le ricerche di sequenze specifiche oltre quelle di comune utilizzo, quali quelle degli ITS. Purtroppo non è stato possibile affrontare anche questo argomento all'interno del Progetto, sia per ragioni di tempo che di disponibilità economica.

In ogni caso, si è tentato comunque di designare dei primers ed una sonda che avessero le migliori caratteristiche di specificità verso *P. s. pv. syringae* sulla base dei risultati in nostro possesso. In questo caso la sonda è stata marcata con il fluoroforo Cy5 silenziato dal quencher

BHQ-2.

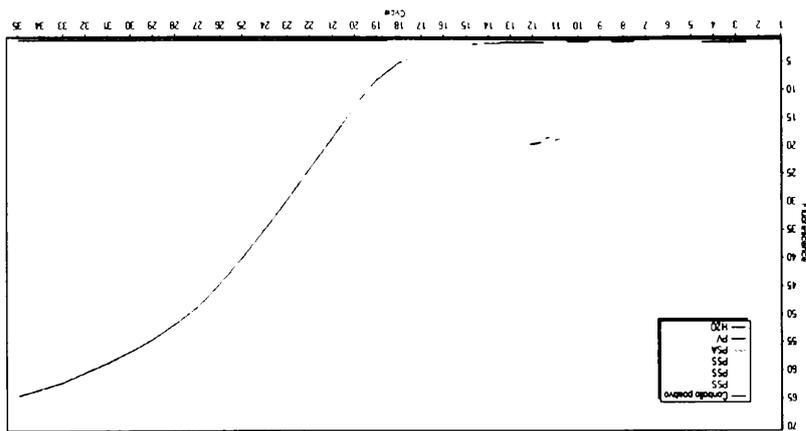
Sequenza (5'-3')

Primer Forward ACCATCATTCGTTCCCAATC

Primer Reverse GGAAGAAGCCATCGTGAC

Sonda CCCCTACCATCTCAATCGTG

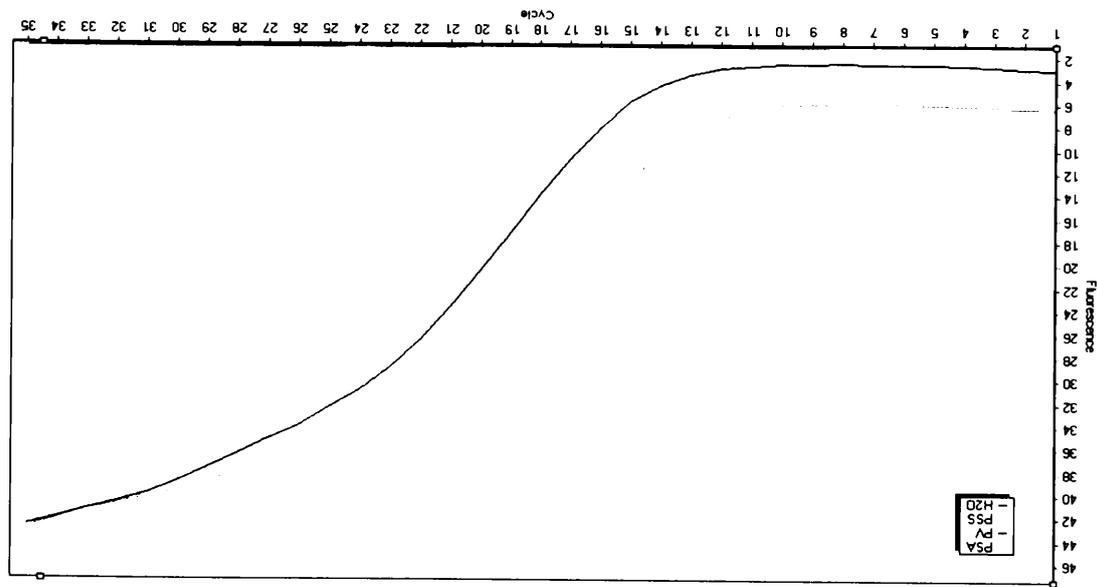
I risultati sono stati comunque interessanti poiché la sonda è risultata in grado di rilevare la presenza di *P. s. pv. syringae*, almeno nella accezione da noi intesa, ovvero di quei batteri isolati da piccole lesioni necrotiche su foglie di actinidia riconducibili geneticamente a *P. s. pv. syringae*. Nelle prove effettuate su miscele di diversi DNA quello dei batteri in esame è stato sempre riconosciuto senza alcun problema. Probabilmente, in presenza del gruppo di batteri analoghi, agenti di maculature necrotiche angolari sulle foglie di altre specie vegetali, si potrebbe avere un segnale positivo (falso positivo). Ma resta da capire se tali patogeni siano in realtà rinvenibili su piante di kiwi ed, eventualmente, se anche essi possano causare lesioni alle foglie di actinidia.



Multiplex RT-PCR

Lo scopo finale del Progetto OIGA era la definizione di un singolo strumento molecolare in grado di identificare contemporaneamente la presenza dei 3 patogeni batterici del kiwi.

L'ultimo step è consistito dunque nel combinare le metodiche per i 3 patogeni prese singolarmente. Ovviamente il lavoro era stato orientato fin dall'inizio a questo scopo finale, quindi si è trattato "semplicemente" di mettere nella stessa miscela di reazione per "multiplex Real-Time PCR" le tre sonde per i tre diversi patogeni, marcate come abbiamo descritto in precedenza con 3 diversi fluorofori, FAM che viene letto nello spettro del verde per *P. s. pv. actinidiae*, HEX che viene letto nello spettro del giallo per *P. viridiflava* ed Cys che viene letto nello spettro del rosso per *P. s. pv. syringae*.



Il sistema è stato testato ripetutamente con pool diversi di DNA sia provenienti da organismi differenti che con concentrazioni variabili di DNA. Ha mostrato una ottima robustezza sia in termini di ripetibilità che di sensibilità. Purtroppo, essendosi concluse le ultime fasi di messa a punto solo negli ultimi mesi del 2013, non è stato finora possibile testare l'intero pacchetto multiplex su campioni vegetali provenienti da impianti infetti. In ogni caso, considerando i risultati ottenuti nelle ripetute attività di validazione su campioni vegetali per ciascuna delle singole metodiche e l'efficacia del sistema multiplex su miscele artificiali di DNA, non si intravede alcun motivo di dubitare della efficacia del metodo anche su campioni naturali.

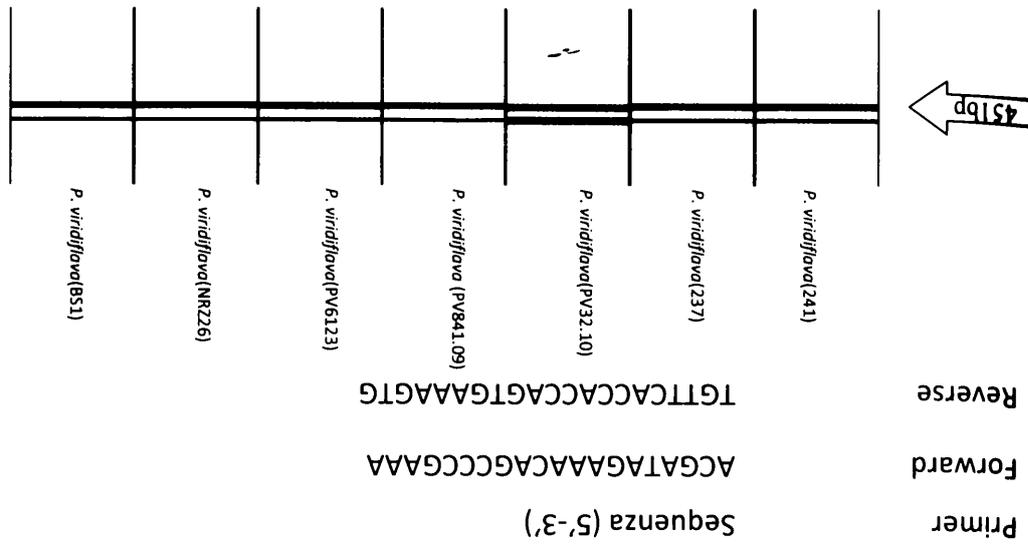
Pseudomonas viridiflava

Il patogeno in questione, per quanto significativo, non ha una patogenicità comparabile con quella di PSA. Si è comunque previsto dal Progetto, a mettere a punto un sistema diagnostico molecolare anche per *P. viridiflava*.

Pur essendo specie a sé stante e quindi teoricamente più semplice da identificare, recenti studi indicano una struttura della specie molto più complessa di quanto immaginato, con ripercussioni anche sulla semplicità di identificazione di sequenze specifiche per la definizione di Primers e Sonde.

Come avvenuto inizialmente per *P. s. pv. actinidiae*, i nostri studi anche in questo caso si sono focalizzati sulla analisi delle sequenze degli spaziatori interni trascritti che separano i geni codificanti per le subunità ribosomiali 16S e 23S (meglio noti come ITS). Oltre ai (pochissimi) dati già presenti nei database internazionali, sono state ottenute nuove sequenze di questa parte del genoma per tutti i ceppi di *P. viridiflava* disponibili nella nostra collezione di microrganismi batterici.

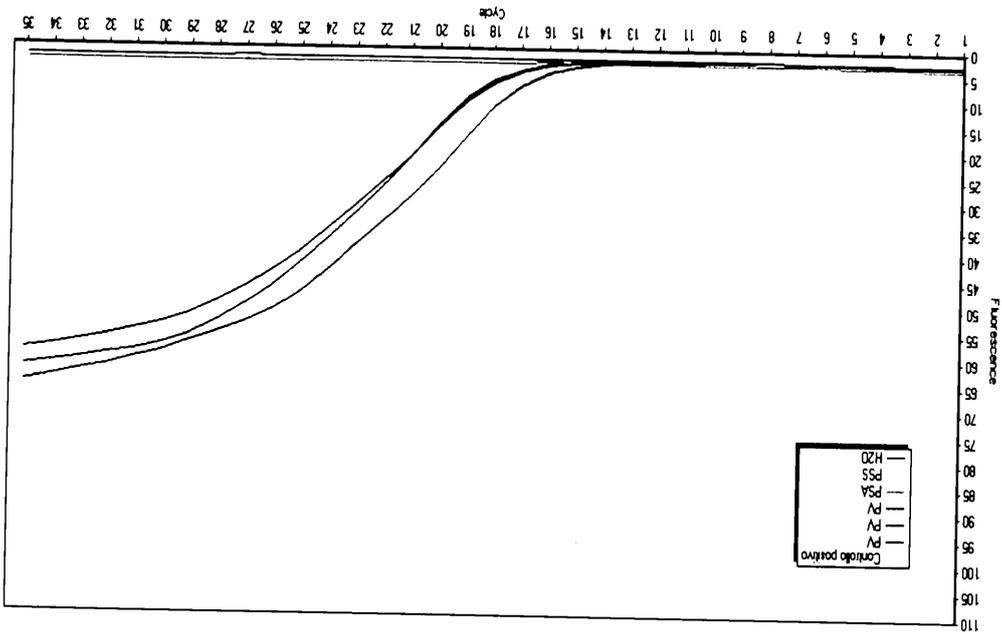
Le sequenze sono state quindi allineate tra loro e con gli organismi filogeneticamente più affini al fine di rinvenire tratti di sequenza con caratteri peculiari ed unici per *P. viridiflava*. Sono stati quindi definiti su tali regioni dei primers ad alta specificità.



Sono anche stati disegnati dei primers ed una sonda per l'utilizzo della Real-Time PCR. La metodica è esattamente la stessa utilizzata per *P. s. pv. actinidae*, con la differenza che si è passati dalla PCR standard, direttamente alla RT-PCR con sonda Taqman, questa volta marcata con un diverso fluoroforo, HEX (che emette fluorescenza rilevabile nello spettro del giallo) ed il quencher BHQ. Anche le caratteristiche dei primers che amplificano la zona della sonda sono stati scelti in modo tale da avere caratteristiche di compatibilità di utilizzo con quelli per l'identificazione di *P. s. pv. actinidae*. In tal modo è possibile usare le due sonde contemporaneamente e quindi rilevare la presenza di entrambe i patogeni nel substrato in analisi; si tratta di ciò che è definito in campo scientifico come "multiplex R-T PCR".

Sequenza (5'-3')

Primer Forward CCATAAGCACCCACACGAAT
 Primer Reverse TATCAGGGGTGCGCTAAC
 Sonda TAGAACAAGCCCGAAATTGG



Pseudomonas syringae pv. *actinidiae*

L'estrema pericolosità di *P. s. pv. actinidiae* ha generato grandi pressioni sulla comunità scientifica che ha cercato di dare delle risposte concrete nel minor tempo possibile. Negli ultimi decenni, l'analisi molecolare mediante PCR ha dimostrato di essere uno strumento molto potente per la rilevazione di batteri specifici, spesso senza la necessità di passare attraverso il loro allevamento *in vitro*. Per i motivi sopra esposti, molti gruppi di ricerca si sono dedicati, più o meno recentemente, anche al riconoscimento su base genetica di questo patogeno.

Per la realizzazione di un sistema di diagnosi basato sulla tecnologia PCR è innanzitutto necessario disporre di regioni genomiche polimorfiche e discriminanti tra le specie oggetto di studio (1° obiettivo del Progetto): a tal proposito i primi approcci tentati nell'ambito del Progetto OIGA hanno riguardato la regione degli Spaziatori Interni Trascritti (ITS) della regione del DNA ribosomiale. Le scarse differenze riscontrate (<0,1%) tra la sequenza del patogeno e quella corrispondente di pseudomonadi affini, *P. s. pv. theae* in primis, ci hanno fatto desistere dall'approfondimento dello studio di queste sequenze, ovvero dall'impiegare energie nel disegno di primers specifici. Questa intuizione si è poi rivelata esatta, come dimostrato dalla selectività soltanto parziale dei primers ottenuti in tale regione da un gruppo di ricerca neozelandese, che ha pubblicato i suoi risultati nel 2010 (Rees-George *et al.*, 2010).

Stante le difficoltà oggettive di rinvenire specifiche differenze nel DNA della patovar che risulta comunque geneticamente simile alle altre di *P. syringae*, si è scelto un approccio di base più ampio ed impegnativo, ma con prospettive certamente molto interessanti. Infatti, in collaborazione con altri gruppi di ricerca americani, inglesi, canadesi e brasiliani si è deciso di affrontare il sequenziamento dell'intero genoma di ben nove ceppi di *Psa*, isolati in diversi paesi colpiti dalla malattia ed in tempi diversi. Inoltre, come riferimento è stato sequenziato anche il genoma della patovar geneticamente più affine, *P. syringae* pv. *theae*. Sebbene l'intero procedimento abbia richiesto tempo e risorse economiche ed umane considerevoli, come si vedrà di seguito, i risultati di questa ricerca sono stati di basilare importanza per il prosieguo delle ricerche. Da questo studio sono emerse evidenze fondamentali per la comprensione della epidemiologia del patogeno su scala internazionale e sulla probabile origine della popolazione virulenta che sta devastando gli actinidieti di tutto il mondo. Inoltre, un altro aspetto importante che si è evidenziato con queste indagini, ha riguardato le popolazioni a bassa virulenza (LV) di *PSA* segnalate negli actinidieti di Australia e Nuova Zelanda. Tali popolazioni, pur essendo classificate

come PSA, sembrano essere in grado di produrre sulle piante di kiwi esclusivamente danni molto lievi a livello fogliare (solo piccole macchie necrotiche) ed in base alle evidenze ottenute, risultano non direttamente riconducibili a *P. s. pv. actinidiae*.

I risultati di questa prima fase di ricerca sono stati pubblicati su una prestigiosa rivista scientifica internazionale (Mazzaglia *et al.*, 2012). L'importanza e la validità di questa ricerca sono testimoniate anche dal fatto che le più importanti pubblicazioni successive di altri gruppi di ricerca sull'argomento prendono spunto proprio dai risultati ottenuti da noi (Butler *et al.* 2013; McCann *et al.* 2013)

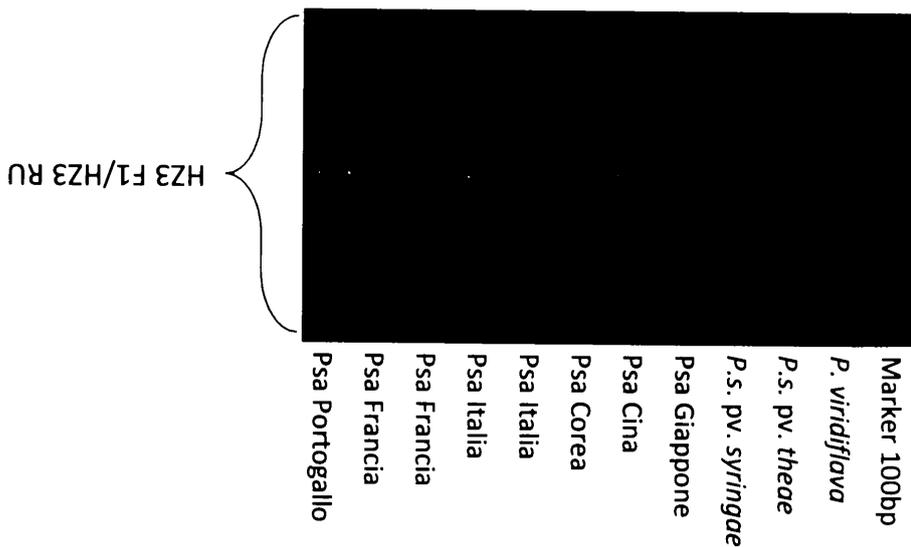
Per quanto attiene più direttamente agli scopi del Progetto ACTINIDIA, comunque, sulla base di questi dati fondamentali è stato possibile approfondire la ricerca di una parte del genoma di PSA che avesse le caratteristiche di specificità necessarie a discriminare tra il patogeno in oggetto ed ogni altro batterio che potesse con esso essere confuso. In particolare il metodo doveva essere in grado di dare risposte negative tanto con le Pseudomonadi appartenenti ad ogni altra patovar di *P. syringae* più o meno affine a PSA (in particolare le patovar *theae* ed *avellanae* che in tutti gli studi fatti finora sono sempre risultati i più vicini a PSA), che con tutti quei batteri che possono essere naturalmente presenti sulle piante di actinidia.

Particolarmente promettente in tal senso è risultata la sequenza del gene effettore HopZ3, molto probabilmente coinvolto strettamente nella patogenesi di PSA verso il kiwi, che ha mostrato percentuali di dissimilarità rispetto a tutte le patovar affini, compresa la patovar *theae*, più che sufficienti per tracciare delle copie di primers con altissima specificità per PSA. Sono state quindi definite le sequenze per 3 primers specifici in direzione forward (5'-3') e 1 primer in direzione reverse (3'-5'):

Primer	Sequenza (5'-3')
HZ3 F1	CAGAGCGCTAACGAGAAA
HZ3 F2	GGCAGGGACATAAATTAC
HZ3 F3	GCATTATTATCCCCCTCTT
HZ3 RU	CGAGCATACATCAACAGGTCA

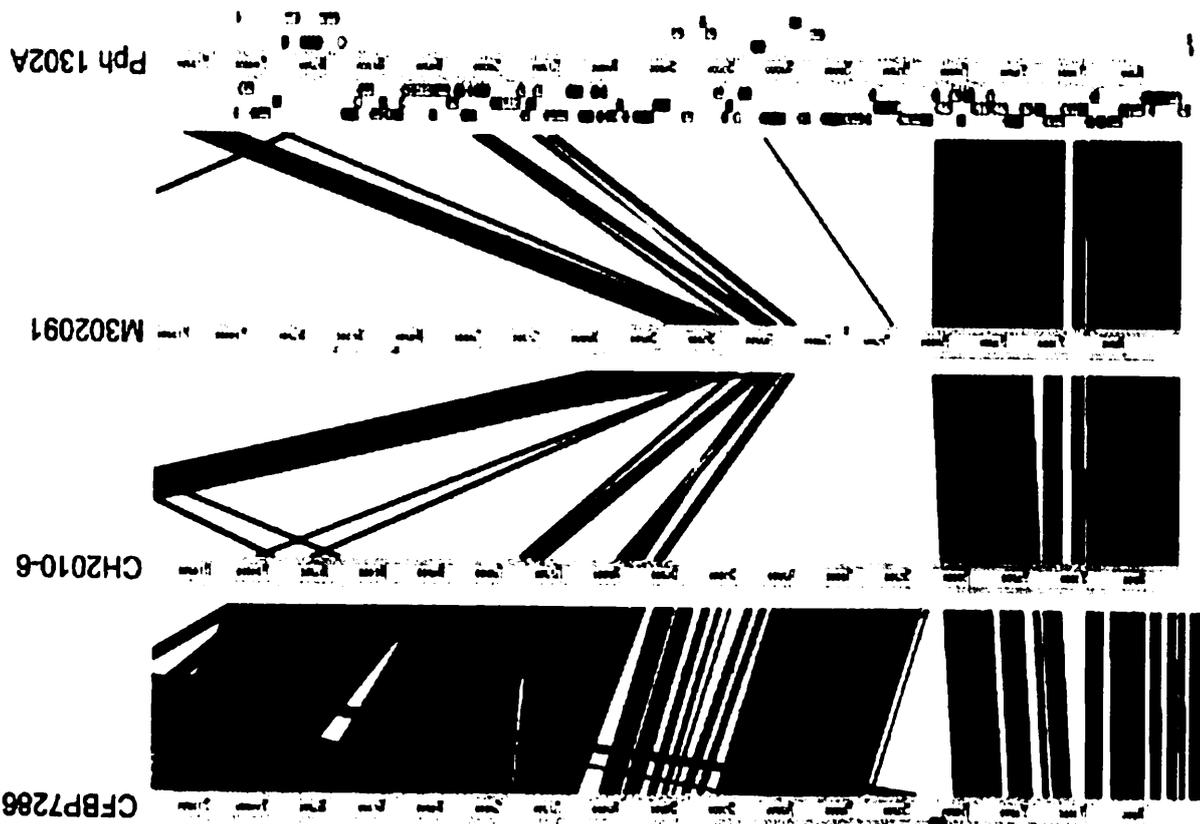
Con l'utilizzo combinato dei 3 primers forward con quello reverse è possibile avere 3 diversi frammenti di amplificazione con dimensioni diverse, rispettivamente di 310, 280 e 128 bp.

Gli abbinamenti dei primers HZ3 F1/HZ3 RU, HZ3 F2/HZ3 RU e HZ3 F3/HZ3 RU sono stati provati dapprima in PCR standard con risultati assolutamente esatti rispetto alle aspettative come mostrato nella seguente figura in cui è riportato un esempio di amplificazione con la prima coppia di primers.



Infatti, analizzando con tale metodica tutti i ceppi attualmente disponibili sia di PSA di tutte le provenienze italiane, europee e mondiali, sia appartenenti a diverse patovar di *P. syringae*, sia infine, a ceppi di *Pseudomonas* spp. o altri batteri isolabili da piante di actinidia in ambiente naturale, le 3 coppie di primers hanno confermato la loro specificità totale nei confronti di *P. s. pv. actinidiae*.

Uno dei risultati più interessanti ottenuti dal sequenziamento genomico, è stato l'identificazione di una "isola genomica", simile ad una presente in *P. s. pv. phaseolicola* (PPHGI-like), in cui risiede la maggior parte della variabilità genetica all'interno della patovar *actinidiae*, ovvero che presenta differenze sostanziali tra ceppi di *P. s. pv. actinidiae* di diversa provenienza e virulenza.



Allineamento dell'isola genomica PHG1-1 da *P. syringae* pv *phaseolicola* 1302A (Accession # AJ870974) con isole simili di ceppi di Psa CFBP7286 (Italia), CH2010-6 (Cina), and MAF302091 (Giappone). Le regioni genomiche di ceppi di Psa sono stati allineati con PHG1-1 tramite BLASTN e visualizzati con l'Artemis comparison tool [56]. Le posizioni dei prodotti di PCR che distinguono l'isola presente nel ceppo CH2010-6 e MAF302091 dall'isola presente nel ceppo CFBP7286 sono rispettivamente indicate da due rettangoli gialli ed uno arancione.

Multiplex-PCR per l'identificazione di popolazioni di patogeno

Ciò ha dato lo spunto per un ulteriore studio mirante a creare un metodo molecolare in grado di riconoscere non soltanto *P. s. pv. actinidiae*, ma anche le diverse popolazioni del patogeno presenti in diverse aree geografiche. Infatti è stato sviluppato e validato anche un saggio di standard PCR multiplex (m-PCR): questo metodo, oltre ad identificare correttamente tutti i ceppi del patogeno in oggetto, ne ha anche assegnato l'appartenenza alle tre principali popolazioni di PSA.

Sono state definite le sequenze per 4 coppie di primers:

Primer	Sigla	Sequenza 5'-3'
250 Japkor F	250 JFK	AGCAACGGTTGTTTC
250 Japkor R	250 JKR	AAATGTTTGCCAGCCAAATC
HopZ3 Spec F1	HZ3 F1	CAGAGGCGCTAACGAGGAA
HopZ3 tutto R	HZ3 RU	CGAGCATACATCAGAGTCA
Cina F	CH F	GGAGTTCAGCACTGACG
Cina R	CH R	CGCTCAAGATCCTTTCCAT
B 733 F	B 733 F	TGGTGATCGTCTGGATGTG
B 733 R	B 733 R	ATTATGCTCCTGGCTCATGG

I risultati, in accordo con gli obiettivi di questa particolare ricerca, hanno infatti permesso di riconoscere una prima popolazione "giapponese/coreana" di media virulenza, una "europea" ad alta virulenza, e una "cinese", anch'essa ad alta virulenza, dando quindi contemporaneamente importanti indicazioni circa la relativa origine geografica, ed in seconda battuta, anche sulla virulenza degli isolati. Anche questo significativo passo in avanti nella diagnosi del patogeno è documentato da una pubblicazione scientifica di alto livello (Balestra et al., 2012).

Nella figura sottostante sono rappresentati i risultati di una amplificazione con i suddetti primers, dopo elettroforesi su gel di agarosio, così come pubblicata su Plant Disease.

Amplificazione multiplex PCR con 4 coppie di primers. Posizioni 1-6: ceppi giapponesi di Psa (KW1, KW11, 4911, 4912, 5095, 5097); posizioni 7-9: ceppi coreani di Psa (Kn2, 23663, 23664); posizioni 10-25: ceppi europei di Psa (PSA92, 7285, 7286, 7287, 490, 1T0, 15ER, 829, 830, 820, 832, 835, 1F, 5F, 14F, LSV38.17); posizioni 26-28: ceppi cinesi di Psa (CH2010-5, CH2010-6, CH2010-7); posizioni 29-30: ceppi neozelandesi di Psa (18839, 18875); posizioni 31-32: ceppi neozelandesi di Psa isolati da piante di actinidia ma che non provocano il cancro (18804, 18882); posizioni 33-34: *P. syringae* pv. *theae* (2598, 2599); posizione 35: *P. syringae* pv. *tomato*; posizione 36: *P. syringae* pv. *papuanus*; posizione 37: *P. syringae* pv. *optata*; posizione 38: *P. syringae* pv. *lachrymans*; posizione 39: *P. syringae* pv. *pisi*; posizioni 40-41: *P. syringae* pv. *syringae* (3909 b,1, 4250,1); posizioni 42-44: *P. avellanae* (NCPBB 4224, NCPBB4226, Pav34); posizione 45: *P. syringae* pv. *morsprunorum*; posizione 46: *P. syringae* pv. *maculicola*; posizione 47: *P. viridiflava*; posizione 48: controllo negativo. M: marker molecolare (GeneRuler 100-bp DNA ladder; Genenco). Le frecce indicano gli ampliconi di Psa (311 bp): quello europeo (733 bp), quello giapponese/coreano (609 bp) e quello cinese (254 bp).

REAL-TIME PCR con SYBR-Green per l'identificazione di PSA

Come previsto dal Progetto, al fine di migliorare la sensibilità di rilevamento del patogeno e poterne eventualmente quantificare la presenza all'interno dei tessuti vegetali, è stato messo a punto anche un saggio di Real-Time PCR. Questa metodica molecolare presenta notevoli vantaggi rispetto alla PCR standard. Come primo vantaggio, la RT-PCR risulta estremamente più sensibile della PCR standard, la qual cosa è di particolare importanza qualora si intenda ricercare il patogeno in tessuti asintomatici in cui la quantità delle cellule del patogeno è spesso molto bassa (altro obiettivo del Progetto). Ma anche la sua velocità (circa un'ora) e la possibilità di analizzare direttamente i campioni senza passare attraverso la fase di isolamento del patogeno, ne fanno l'arma più efficace per il rinvenimento (detection) del patogeno su qualsiasi substrato: dal materiale vegetale asintomatico (foglie, germogli, corteccia, fusto, radici e frutti), alla presenza sulle superfici della pianta (ivi compresi i frutti), alla eventuale presenza nel terreno.

Di nuovo, prendendo spunto dalla precedente ricerca, si è notato che la terza combinazione di primers descritta nella metodologia multiplex-PCR, HZ3 F3/HZ3 RU, per le dimensioni del frammento amplificato (128 bp), compresa tra 80 e 200 bp, infatti, risultava essere particolarmente adatta ad un utilizzo in Real-Time PCR, utilizzando ad esempio un intercalante per il materiale genetico che genera fluorescenza, come il Sybr Green.

Proprio questo protocollo è stato provato sul nuovo apparecchio RotorGene Q (Qiagen) per Real-time PCR, acquisito grazie al finanziamento del Progetto ACTINIDIA.

Sebbene l'utilizzo di questa nuova strumentazione sia relativamente semplice, è stato ovviamente necessario effettuare una serie di esperimenti preventivi per ottimizzare la manualità e la preparazione delle reazioni al fine di ottenere risultati affidabili.

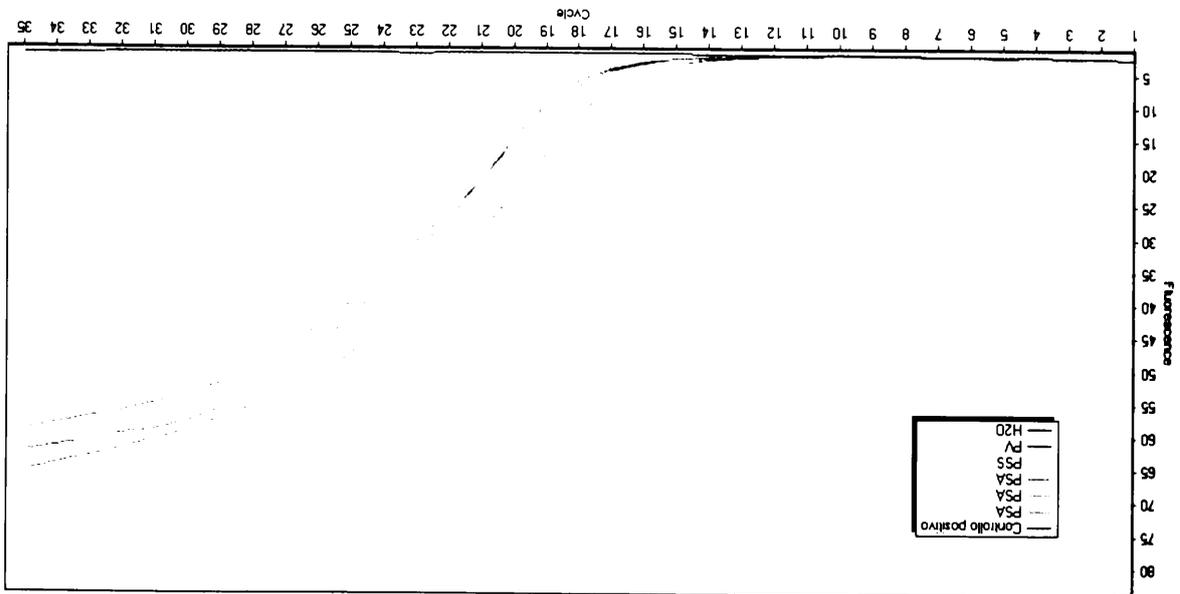
Dopo tali aggiustamenti, anche in questo caso i primi esperimenti mirati alla valutazione dell'efficacia del sistema con metodica Real-Time sono risultati estremamente interessanti sotto diversi punti di vista:

- il sistema sembra avere una estrema specificità nei confronti di PSA poiché NON amplifica il DNA di diverse patovar; tra queste, per la prima volta rispetto a tutti i precedenti tentativi, è compresa anche la patovar theae;

Validazione del metodo RT-PCR (SVBR-Green) su tessuti vegetali e su frutti

A questo punto la metodica è stata utilizzata per saggiarne le capacità di rilevare PSA sui diversi tessuti vegetali artificialmente e naturalmente infetti.

I risultati ottenuti sono stati di grande interesse poiché il metodo ha funzionato bene sia nel primo caso (inoculazione artificiale con ceppi diversi, anche non PSA), di cui nella figura sottostante è riportato un esempio, che nel secondo quando i tessuti analizzati erano quelli la cui colonizzazione è nota, ovvero le foglie, i germogli, gli strati di legno sottocorticali o gli essudati.



Test per la presenza di PSA sui frutti

Un'attenzione particolare è stata rivolta alla analisi dei frutti. Infatti questi rappresentano il prodotto primario commercializzato su scala internazionale (ad essi si affiancano solo, in misura proporzionalmente trascurabile, il materiale di propagazione ed il polline). Ovviamente un ruolo di questi come potenziale vettore del patogeno avrebbe dei risvolti disastrosi in termini economici, conducendo alla inibizione delle esportazioni di cui l'Italia è leader mondiale.

Gli esperimenti volti a verificare l'eventuale attitudine dei frutti ad ospitare il patogeno sono stati effettuati secondo due modalità:

- 1) inoculazione artificiale dei frutti con diverse concentrazioni del patogeno e rilevamento mediante R-T PCR dello stesso ad intervalli di tempo progressivi, tenendo i frutti nelle normali condizioni di conservazione (celle frigorifera);

- 2) analisi di frutti provenienti da actinidieti soggetti a infezioni evidenti del patogeno.

Di seguito è descritto brevemente lo svolgimento della prova con inoculazione artificiale:

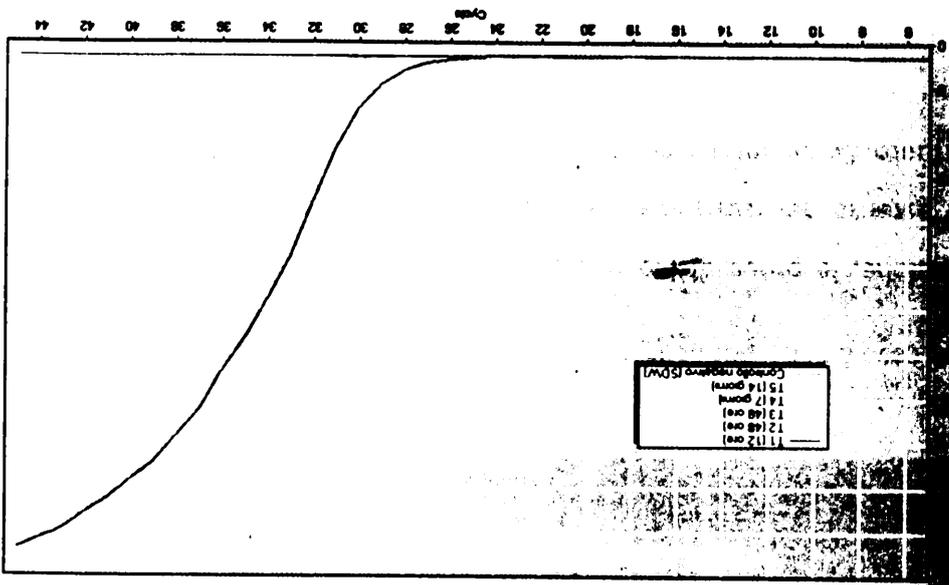
- Sono stati considerati 6 lotti da 50 frutti ciascuno, sottoposti a sterilizzazione superficiale mediante immersione in ipoclorito di sodio all'1% per 1 minuto seguita da 3 risciacqui in acqua distillata sterile ed asciugatura in ambiente sterile a 27 °C per 1 giorno.

- Quindi 2 lotti di frutti sono stati inoculati mediante asperzione di 25 ml di una sospensione batterica di un ceppo noto di PSA (CFBP 7286) contenente 1×10^6 cellule batteriche ciascuno; 2 lotti sono stati inoculati mediante asperzione di 25 ml acqua distillata sterile ciascuno, come controllo. Quindi i frutti venivano asciugati in termostato a 27°C per 1 ora e conservati in cella frigorifera a 4°C

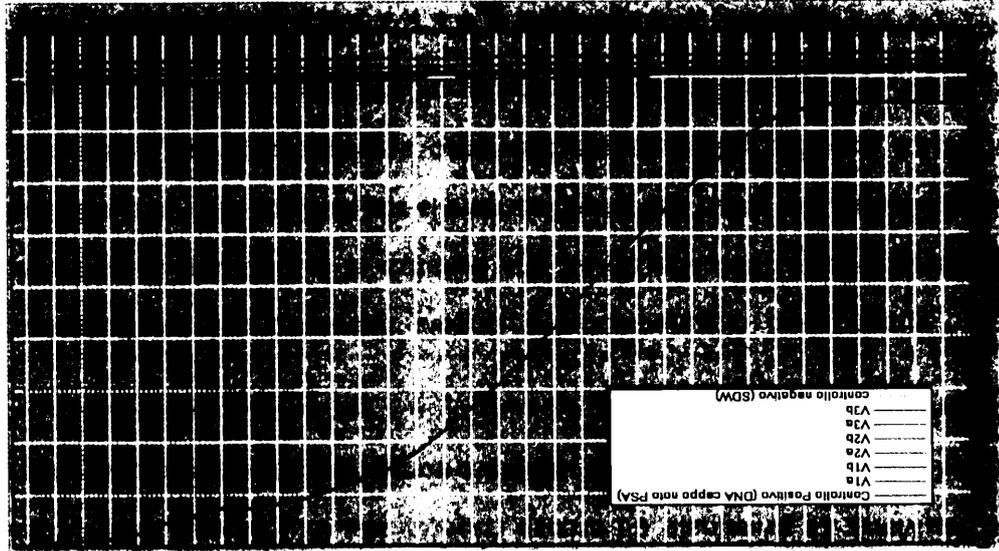
- Da ciascuno di questi lotti venivano prelevati 2 gruppi da 10 frutti ciascuno agli intervalli di tempo sotto indicati:

- T-1 (dopo 12 ore dall'inoculazione)
- T-2 (dopo 24 ore dall'inoculazione)
- T-3 (dopo 48 ore dall'inoculazione)
- T-4 (dopo una settimana dall'inoculazione)
- T-5 (dopo due settimane dall'inoculazione)

- Questi venivano quindi sottoposti a lavaggio in 500 ml di PBS (+ 0,1% tween) in agitazione a 150 rpm per 90 minuti, poi seguiva una filtrazione del liquido di lavaggio con garza sterile ed una centrifugazione a 12.000 rpm per 15 min a 6 °C. Il pellet ottenuto veniva risospeso in 1,5 ml di PBS. Nel grafico sottostante è riportato l'esito della prova con i frutti inoculati con la sospensione a maggior concentrazione batterica:



In nessun caso è stato possibile rinvenire PSA su frutti esposti ad infezione naturale. In conclusione, le prove di inoculazione artificiale hanno dimostrato che PSA sopravvive sulla superficie esterna dei frutti solo per tempi molto ridotti ed in quantità minime rispetto all'inoculo effettuato. Se ne deduce che le cellule batteriche di PSA sui frutti non soltanto muoiono



è evidente nel grafico sottostante: Nel caso di frutti provenienti da impianti significativamente colpiti dalla malattia, il risultato

CONTA COLONIE		ESITO	
13	35 x 10 ⁴	positivo	35 x 10 ⁴
14	3 x 10 ⁴	positivo	250
15	8 x 10 ¹	positivo	45
(7 GG)	No signal	negativo	0
(14 GG)	No signal	negativo	0
(48 H)	No signal	negativo	0

Come si vede dalla tabella sottostante che riassume i risultati delle analisi sui frutti inoculati artificialmente con la dose più alta di patogeno, questo è stato rinvenuto solamente entro 24 ore dalla inoculazione artificiale (che corrisponde comunque ad una dose più che sovrabbondante rispetto a ciò che si verifica abitualmente in natura).

in tempi brevi, ma esposte alle condizioni ambientali prima e di conservazione poi, vengono degradate completamente tanto da non poterne più rilevare nemmeno il DNA.

Le analisi sui frutti di kiwi provenienti da impianti naturalmente infetti da PSA hanno confermato quanto sopra osservato, ovvero che questo batterio non sopravvive sulla superficie esterna dei frutti di kiwi, in contrasto rispetto a quanto registrato sulle foglie e sui rami.

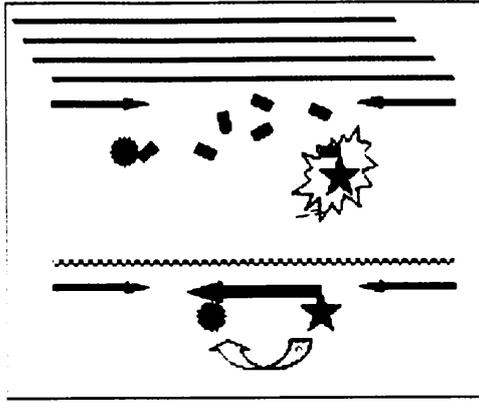
Molto probabilmente, la tomentosità dei frutti e la compattezza dell'epicarpo ne ostacolano il successo nella colonizzazione e nella sopravvivenza su di essi.

Si può quindi affermare che i frutti di kiwi non possono essere considerati veicoli di infezione del patogeno PSA e che quindi la loro commercializzazione su scala nazionale ma soprattutto l'esportazione dei frutti di kiwi risponde a tutti i requisiti fitosanitari.

REAL-TIME PCR con sonda Taqman

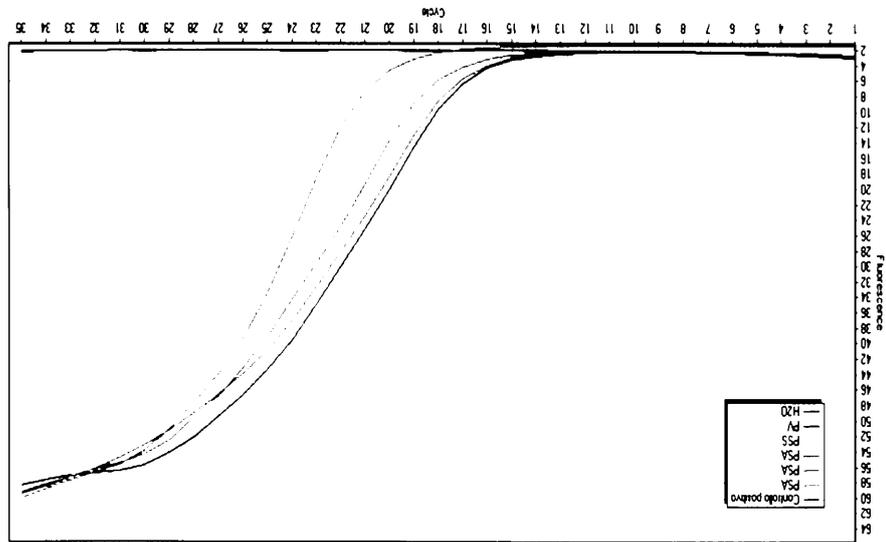
Inoltre, come previsto dal Progetto, la metodica della RT-PCR è stata ulteriormente implementata: è stato sviluppato anche un sistema di diagnosi basato non sulla metodica del SYBR Green (intercalante del DNA che genera fluorescenza), ma piuttosto sull'utilizzo di una sonda marcata (sonda TaqMan). La principale differenza rispetto alla RT-PCR con SYBR-Green è nella ancor maggiore sensibilità e nella possibilità di utilizzare contemporaneamente più sonde marcate con fluorofori differenti.

Le sonde Taqman sono oligonucleotidi a singolo filamento con un fluoroforo ed un "quencher" (silenziatore della fluorescenza) ad una distanza di 3 a 30 basi che possono legarsi all'interno di un amplicone. Nel corso dell'amplificazione la sonda viene distrutta mediante idrolisi dall'attività nucleasica specifica per il doppio filamento associata alla Taq polimerasi. Questo risulta in un aumento del segnale fluorescente dovuto all'abolizione dell'effetto di "quenching", come sotto illustrato nella figura.



In collaborazione con il Dr. Norman Schaad e Yvette Berthier Schaad, due dei maggiori esperti mondiali del settore, è stata dunque identificata una sequenza, di nuovo sulla sequenza del gene effettore HopZ3, da usare come "probe" e due primers per l'amplificazione del frammento di DNA che la comprende. La sonda è stata marcata con un apposito fluoroforo (FAM) la cui emissione (fluorescenza) viene emessa nel campo di lunghezza d'onda del verde, e "silenziosa" con un BHQ (Black Hole Quencher). Sia i primers che la sonda sono stati fatti sintetizzare presso Macrogen Europa.

Di nuovo il metodo ha mostrato una ottima efficacia nel rilevare la presenza di *P. s. pv. actinidiae*.



Conclusioni

Gli obiettivi di questo progetto erano certamente ambiziosi. Viste le ridottissime conoscenze scientifiche, soprattutto in ambito molecolare, relative ai 3 patogeni batterici del kiwi di cui si poteva disporre prima dell'inizio del Progetto, si può senza alcun dubbio affermare che il lavoro svolto in questo Progetto ha prodotto dei risultati eccezionali.

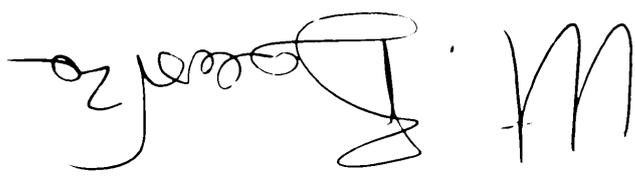
Se oggi si può ragionevolmente dire che le conoscenze scientifiche soprattutto in merito al patogeno più pericoloso dell'*actinidia*, *P. s. pv. actinidiae*, sono aumentate a dismisura e che uno dei centri di eccellenza mondiali su questo argomento è l'Università degli studi della Tuscia, gran parte del merito va a questo Progetto che ha permesso di sostenere i costi di studi così importanti.

Al di là degli obiettivi specifici del Progetto, di cui si discuterà più avanti, infatti, l'approccio genomico è risultata una carta decisamente vincente. Da questo studio che ha messo in luce tanti nuovi aspetti di *P. s. pv. actinidiae* hanno preso spunto praticamente tutti i più recenti studi svolti dalla comunità scientifica internazionale che si è interessata al problema. Le conoscenze sulla struttura reale delle popolazioni di *P. s. pv. actinidiae* distribuite in tutto il mondo sono frutto di questo approccio, così come della loro diversa aggressività. Anche le scoperte relative ai meccanismi di aggressione posseduti dallo stesso patogeno, sia in termini di riconoscimento dell'ospite vegetale, sia in termini di vere e proprie tossine, hanno preso il via dalla conoscenza approfondita dell'intero genoma.

In ogni caso, al termine di questi 3 anni, il Progetto ha prodotto i risultati attesi: gli strumenti diagnostici messi a punto sono di sicuro interesse scientifico ma anche di assoluta rilevanza pratica. Infatti se da una parte essi rappresentano lo stato dell'arte delle metodiche molecolari ad oggi disponibili per questi patogeni, al tempo stesso rendono la fase di diagnosi di questi patogeni possibile, sicura e veloce.

Ovviamente non si tratta di strumenti di cui l'utente finale, ovvero il coltivatore di kiwi, possa disporre direttamente, sia per le conoscenze scientifiche che comunque anche l'applicazione delle tecniche richiede, ma anche per il costo delle attrezzature scientifiche necessarie allo svolgimento dei saggi diagnostici. Ciò però non limita in alcun modo l'importanza di questi nuovi strumenti: essi infatti permetteranno, a chiunque sia in grado di farlo (laboratori di diagnosi pubblici o privati, servizi fitosanitari, ecc.), di fornire un servizio diagnostico di eccellente livello a costi relativamente contenuti.

- Baroli C., Berge O., Montel C. L., Guilbaud C., Balestra G. M., Varvaro, L., Jones C., Dangl J.L., Baltus D. A., Sands D.C. and Morris C.E. (2014), The *Pseudomonas viridiflava* phylogroups in the *P. syringae* species complex are characterized by genetic variability and phenotypic plasticity of pathogenicity-related traits. Environmental Microbiology DOI: 10.1111/1462-2920.12433.
- Loreti S., Pucci N., Gallèlli A., Minardi P., Ardizzi S., Balestra G.M., Mazzaglia A., Taratufolo M.C. (2014). Experience from the Italian inter-laboratory study on the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Phytopathologia mediterranea, (53) 1.
- Balestra G.M., Gallipoli L., Tagliavento V., Ciarroni S., Taratufolo M.C., Renzi M., Mazzaglia A. (2013). Batteriosi del kiwi: conoscenze, convenza e prospettive. Bioagricoltura, 130: 40-41, ISSN: 1722-1099.
- Ciarroni S., Taratufolo M.C., Gallipoli L., Balestra G.M., Mazzaglia A. (2013). Approaching MLVA to investigate intrapathovar variability of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. In: Atti del XIX Convegno Nazionale di Patologia Vegetale SIPav, Padova, 23-25 settembre 2013.
- Balestra G.M., Taratufolo M.C., Vinatzer B.A., Mazzaglia A. (2012). A multiplex PCR assay for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and differentiation of populations with different geographic origin. Plant Disease, 97(4): 472-478.
- Renzi M., Copini P., Taddei A.R., Rossetti A., Gallipoli L., Mazzaglia A., Balestra G.M. (2012). Cancro batterico dell'actinidia: strategie d'infezione e reazioni delle piante di *Actinidia* spp. Convegno Nazionale sulla Batteriosi dell'Actinidia, Latina, 24-26 Maggio.
- Balestra G.M., Taratufolo M.C., Vinatzer B.A., Mazzaglia A. (2012). Riconoscimento molecolare di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* e contemporanea attribuzione a popolazioni del patogeno di differente provenienza e grado di virulenza tramite multiplex-PCR. Convegno Nazionale sulla Batteriosi dell'Actinidia, Latina, 24-26 Maggio2012.
- Mazzaglia A., Studholme D.J., Taratufolo M.C., Cai R., Almeida N.F., Goodman T., Guttman D.S., Vinatzer B.A., Balestra G.M. (2012). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to the same genetic lineage. PLOS ONE, 7: e36518.
- Mazzaglia A., Studholme D.J., Taratufolo M.C., Cai R., Almeida N.F., Goodman T., Guttman D.S., Vinatzer B.A., Balestra G.M. (2012). Il genoma di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: acquisizioni per la caratterizzazione molecolare delle principali popolazioni. Convegno Nazionale sulla Batteriosi dell'Actinidia, Latina, 24-26 Maggio.
- Renzi M., Copini P., Taddei A.R., Rossetti A., Gallipoli L., Mazzaglia A., Balestra G.M. (2012). Bacterial canker on kiwifruit in Italy: anatomical changes in the wood and in the primary infection sites. Phytopathology, 102: 827-840.

Viterbo, 08/01/2015

- Rees-George J., Vanneste J.L., Cornish D.A., Pushparajah I.P.S., Yu J., Templeton M.D., Everett K.R. (2010). Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S-23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. Plant Pathol. 59:453-464.
- McCann H.C., Rikkerink E.H.A., Bertels F., Fiers M., Lu A., Rees-George J., Andersen M.T., Gleave A.P., Haubold B., Wohlers M.W., Guttman D.S., Wang P.W., Straub C., Vanneste J., Rainey P.B., Templeton M.D. (2013). Genomic analysis of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* provides insight into the origins of an emergent plant disease. PLOS ONE, 9(7): e1003503.
- Mazzaglia A., Studholme D.J., Taratufolo M.C., Cai R., Almeida N.F., Goodman T., Guttman D.S., Vinatzer B.A., Balestra G.M. (2012). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to the same genetic lineage. PLOS ONE, 7: e36518.
- Butler M.I., Stockwell P.A., Black M.A., Day R.C., Lamont I.L., Poulter R.T.M. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* from recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker belong to different clones that originated in China. PLOS One, 8(2): e57464.
- Balestra G.M., Taratufolo M.C., Vinatzer B.A., Mazzaglia A. (2012). A multiplex PCR assay for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and differentiation of populations with different geographic origin. Plant Disease, 97(4): 472-478.

Bibliografia

- Mazzaglia A., Renzi M., Taratufolo M.C., Balestra G.M. (2010). Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* populations using different typing techniques. 7th International Symposium on Kiwifruit, Faenza, 12-17 Settembre 2010.
- Balestra G.M., Rossetti A., Ricci L., Renzi M., Quattrucci A., Taratufolo M.C., Mazzaglia A. (2010). Evolution of Kiwifruit Bacterial Canker. XVI Convegno Nazionale di Patologia Vegetale (SIPAV), Firenze, 14-17 Settembre 2010.