

## **DIAGNOSI DELLE MALATTIA DELLE PIANTE MEDIANTE DIGITAL DROPLET PCR**

S. Botti, M. Cardoni e M. Pancaldi

CAV, Centro Attività Vivaistiche, Via Tebano 45, 48018 Faenza (RA)

C. Ratti

DISTAL, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari – Università di Bologna

### *Le richieste del mondo vivaistico*

Nella moderna frutticoltura la fase di impianto rappresenta un momento di fondamentale importanza in quanto comporta scelte che influiranno per diversi anni sul rendimento qualitativo degli investimenti effettuati e, quindi, sulla redditività dell'azienda. Le scelte tecniche strategiche all'impianto riguardano, senza dubbio, la qualità genetico-sanitaria delle piante messe a dimora. La produzione di materiale vivaistico di elevata qualità rappresenta quindi il primo e fondamentale anello del processo produttivo frutticolo, poiché è in grado di condizionarne fortemente la futura redditività. Tutta la filiera vivaistica deve quindi operare al fine di azzerare l'incidenza di fitopatologie nel materiale poi venduto agli agricoltori. I vivaisti si impegnano con importanti investimenti nelle proprie aziende, contestualmente richiedono ai Centri di Conservazione quali il CAV di fornire loro materiale di "categoria base" con elevate garanzie sanitarie. Quasi tutte le malattie sono oggi facilmente diagnosticabili utilizzando le tradizionali metodiche di diagnosi fitopatologica, tuttavia alcuni patogeni potrebbero sfuggire alla maglia dei controlli, vuoi perché settoriali, cioè non presenti in tutti i settori/organi della pianta, vuoi perché latenti, ovvero presenti a concentrazioni bassissime e non sempre rilevabili con le attuali tecniche di diagnostica. Ogni anno i Centri di Conservazione ricevono dai vivaisti stessi e dai costitutori nuove varietà da introdurre nel processo di certificazione, le cosiddette "piante madri candidate di pre-base". Le analizzano per verificarne lo stato sanitario e la rispondenza genetica secondo i protocolli previsti dai più recenti disciplinari di certificazione genetico-sanitaria, un processo che dura fino a 3-4 anni prima che venga emesso un responso sull'assenza di organismi nocivi agenti di malattie. Avere la certezza che queste piante siano sane è fondamentale, perché da esse partiranno tutte le successive fasi di moltiplicazione. È da queste considerazioni che è nata la necessità di mettere a punto un sistema diagnostico innovativo in grado di garantire la sanità assoluta delle fonti candidate. La tecnica introdotta è la "Digital Droplet PCR (ddPCR)", oggi usata in medicina umana per la diagnostica precoce di importanti virus, quali l'HIV, essendo capace di rilevare anche una sola copia del DNA/RNA virale nel campione testato. Nel nostro caso, la ddPCR rileva la presenza del patogeno (es. virus, viroide, fitoplasma, batterio o nematode) nella pianta anche quando presente a bassissima concentrazione; di fatto, la presenza di una sola copia del microorganismo nel campione testato è sufficiente per avere un esito positivo al test.

### *La tecnica digital droplet PCR*

La "ddPCR" rappresenta un'evoluzione delle già note e consolidate tecniche PCR e "Realtime PCR"; da quest'ultima, infatti, riprende alcuni aspetti della chimica fluorescente. L'elemento di grande innovazione introdotto dal sistema "digital" va ricercato nella fase di emulsione della miscela di reazione. La miscela di reazione (reagenti per amplificazione a cui viene aggiunto il campione da testare sotto forma di estratto di DNA/RNA della pianta oggetto di saggio) viene infatti emulsionata all'interno di uno strumento chiamato DROPLET GENERATOR utilizzando speciali oli e

speciali supporti plastici; le 20.000 goccioline ottenute contengono ciascuna tutti gli elementi per lo svolgimento di una reazione di amplificazione. La miscela di PCR emulsionata viene quindi introdotta in un tradizionale termociclatore per effettuare i cicli di amplificazione. Se il campione non è infetto dallo specifico patogeno, nessuna delle goccioline conterrà il DNA/RNA del patogeno ricercato e nessuna di esse emetterà fluorescenza; al contrario, se il campione è infetto dallo specifico patogeno, una parte o tutte le “droplets” (a seconda di quanto il campione è infetto) emetteranno fluorescenza. La quantificazione del numero esatto di goccioline fluorescenti viene effettuata mediante lettura al DROPLET READER che fornisce una quantificazione precisa del numero di copie del patogeno presenti nel campione vegetale di partenza. Statisticamente parlando, infatti, ciascuna droplet contiene al massimo una copia del genoma del patogeno, perciò il numero delle droplets fluorescenti quantificate dal droplet reader corrisponde al numero di particelle del patogeno presenti nel campione vegetale di partenza. Questa tecnica è stata recentemente introdotta nei laboratori del CAV che la sta utilizzando per la messa a punto dei protocolli per la diagnosi delle principali malattie delle piante di interesse vivaistico. Al momento sono già stati messi a punto protocolli per la diagnosi del virus della Sharka (PPV), del viroide del Mosaico Latente del pesco (PLMVd), del fitoplasma delle drupacee (ESFYP) e del virus del Pinot Grigio (GPGV). CAV si propone di estendere questo tipo di tecnica all’individuazione di molte altre malattie. La precisione del dato di quantificazione in uscita e la possibilità di individuare infezioni virali anche in fase molto precoce (pochissime droplet positive) rende questa tecnica molto utile nell’analisi delle piante candidate ad entrare nel processo di certificazione vivaistica.

Di seguito è riportata una descrizione schematica del workflow di una reazione Digital Droplet PCR (figure da 1 a 3).



Fig. 1. Fase di emulsione della miscela di reazione utilizzando il Droplet Generator.



Fig. 2. Lettura della fluorescenza delle goccioline al Droplet Reader e visualizzazione dei risultati.

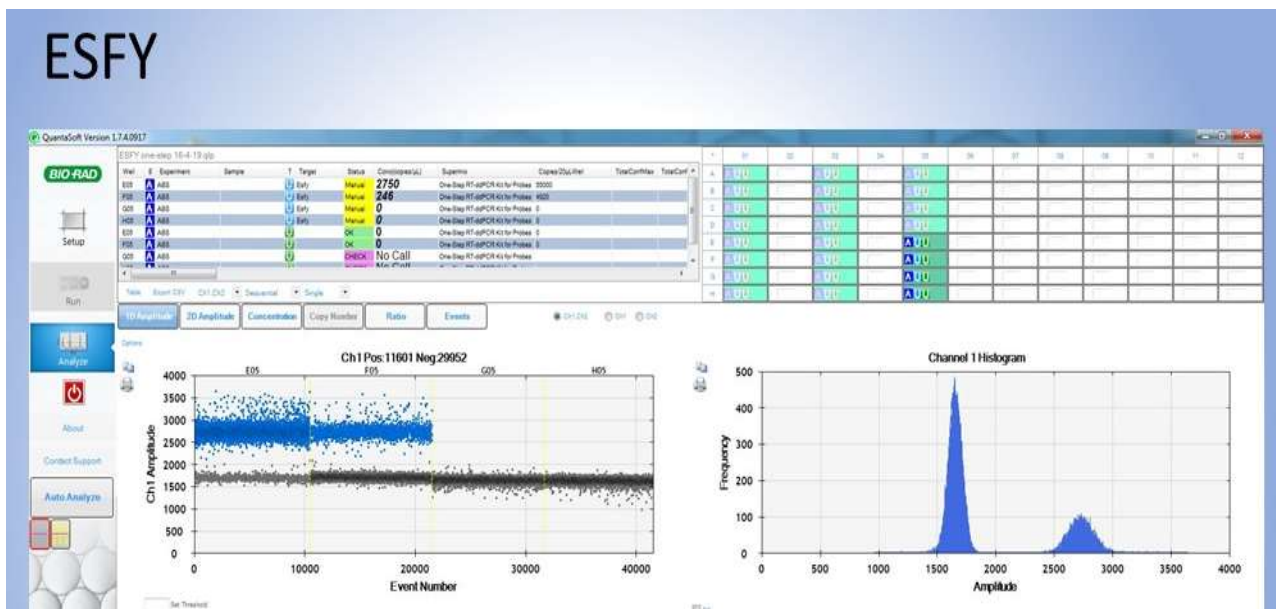


Fig. 3. Esempio di visualizzazione dei risultati, il caso di ESFY (European Stone Fruit Yellows Phytoplasma).

### Bibliografia

Botti S., Cardoni M., Bissani R., Pezzi D., Tura E., Zisa R., Contaldo C., Nigro G., Ratti C., Babini- A.R., Pancaldi M. Più controlli fitopatologici e diagnostica innovativa nella filiera. Frutticoltura-Speciale Vivaismo e Miglioramento Genetico- n°10-2019: 10-14.

Qualità Vivaistica Italia, Decreto MIPAAFT del 19 marzo 2019 relativo al “Sistema nazionale volontario di qualificazione del materiale di propagazione vegetale” pubblicato su Gazzetta Ufficiale,, n. 119 del 23 maggio 2019.

Strain M.C., Lada S.M., Luong T., Rought S.E., Gianella S., Terry V.H., Spina C.A., Woelk C.H. e Richman D.D., 2013. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. PLoS ONE.

Vogelstein, B. e Kinzler, K. W., 1999. Digital PCR. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9236–9241.