

## PROGETTO MIPAAF

(Bando OIGAI) DM 1861/7818/2011 del 26/01/2011.

### ACTINIDIA

(Azioni di Controllo Tecnicamente **IN**novative nella **ID**entificazione di **IA** avversità su Actinidia)

Coordinamento: Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia, DAFNE, Università della "Tuscia" di Viterbo - Prof. Giorgio M. Balestra.

L'obiettivo del Progetto ACTINIDIA è **sviluppare dei sistemi molecolari di diagnosi** quali-quantitativi, rapidi, efficienti ed economici, in grado di verificare la presenza, anche in assenza di sintomi, di 3 patogeni batterici del kiwi (*P. s. pv. actinidiae*, *P. viridiflava* e *P. s. pv. syringae*).

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. Le conoscenze di base attualmente disponibili sono 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 studiato approfonditamente da diversi gruppi di ricerca in tutto il mondo ormai da qualche anno. Ne consegue che gli approcci sono stati sostanzialmente diversi, come di seguito descritto.

#### **P.s. pv. actinidiae**

L'estrema pericolosità di questo patogeno, che sta mettendo gravemente in crisi l'intero settore dell'actinidicoltura, ha generato grandi pressioni sulla comunità scientifica che sta cercando 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 al riconoscimento su base genetica di questo patogeno, come di seguito riportato.

Il primo tentativo indiretto è stato fatto da Scortichini e colleghi nel 2002 che, valutando le relazioni genetiche tra *Pseudomonas avellanae*, *P.syringae* pv. *theae* e *P.syringae* pv. *actinidiae*, hanno sviluppato un paio di primers sul gene 16S del DNA ribosomiale, in grado di rilevare tutti questi agenti patogeni. Ma, oltre l'incertezza intrinseca legata alla rilevazione contemporanea di tre agenti patogeni, il metodo ha mostrato di avere molti limiti (Rees-George et al., 2010). Anche il gene *argK* è stato valutato come bersaglio per la definizione di primers specifici (Sawada et al., 2002) ma, come nello studio precedente, la coppia di primers OCTF/OCTR non è risultata in grado di distinguere tra *P. syringae* pv. *actinidiae* ed altre *Pseudomonadi* correlate. Un approccio più diretto è stato tentato nel 2002 da Koh e Nou; gli autori hanno rilevato un frammento specifico di PSA da analisi di profili RAPD. Il frammento è stato sequenziato e su di esso è stato disegnato una coppia

di primers (KNF/KNR) che amplifica un frammento di 492 bp. Anche in questo caso, il protocollo è risultato non sufficientemente specifico. Rees-George e colleghi hanno descritto nel 2011 due coppie di primers PCR, PsaF1/R2 e PsaF3/R4, progettati su specifiche sequenze dello spaziatore 16S-23S del rDNA (sequenza nota come ITS). Questi primers amplificano correttamente un frammento specifico sul DNA di ceppi di *P. syringae* pv. *actinidiae*, ma generano anche lo stesso frammento con il patogeno *P. syringae* pv. *theae*, geneticamente affine a PSA. Al fine di risolvere questa ambiguità, Gallelli e colleghi (2011) hanno recentemente proposto un protocollo duplex-PCR che amplifica contemporaneamente un frammento con la coppia di primers KNF/KNR, la cui parziale selettività è stata già commentata sopra, e uno con i primers AvrDdpx-F/AvrDdpx-R, selettivi nei confronti della pathovar *theae* rispetto a PSA. Combinando la specificità di entrambe le coppie di primers, gli autori sono in grado di riconoscere PSA, almeno tra i batteri rinvenibili su le piante di *Actinidia*.

Come si nota da questa sintesi sullo stato dell'arte circa gli studi compiuti finora per la messa a punto di un protocollo diagnostico realmente efficace e selettivo nei confronti di PSA, sono ancora molte le incertezze che rimangono.

Nel Progetto ACTINIDIA si è cercato di definire un metodo molecolare in grado di sciogliere definitivamente tali dubbi in materia di identificazione e rilevamento di questo patogeno.

Proprio per questo, lo sforzo principale è stato rivolto alla 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 erroneamente confuso. In particolare il metodo doveva essere in grado di dare risposte negative tanto con le Pseudomonadi appartenenti ad ogni altra pathovar di *P. syringae* più o meno affine a PSA (in particolare la pathovar *theae* che in tutti gli studi effettuati finora è sempre risultata la più vicina a PSA), che con tutti quei batteri che possono essere naturalmente presenti sulle piante di actinidia (nessuno studio è stato peraltro condotto finora in tal senso).

Inoltre, un altro aspetto importante fino ad oggi non ancora preso in considerazione, che si è voluto affrontare con queste indagini, riguarda le popolazioni a bassa virulenza (LV) di PSA che sono state segnalate di recente negli actinidieti in Nuova Zelanda ed Australia. 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 macchie necrotiche).

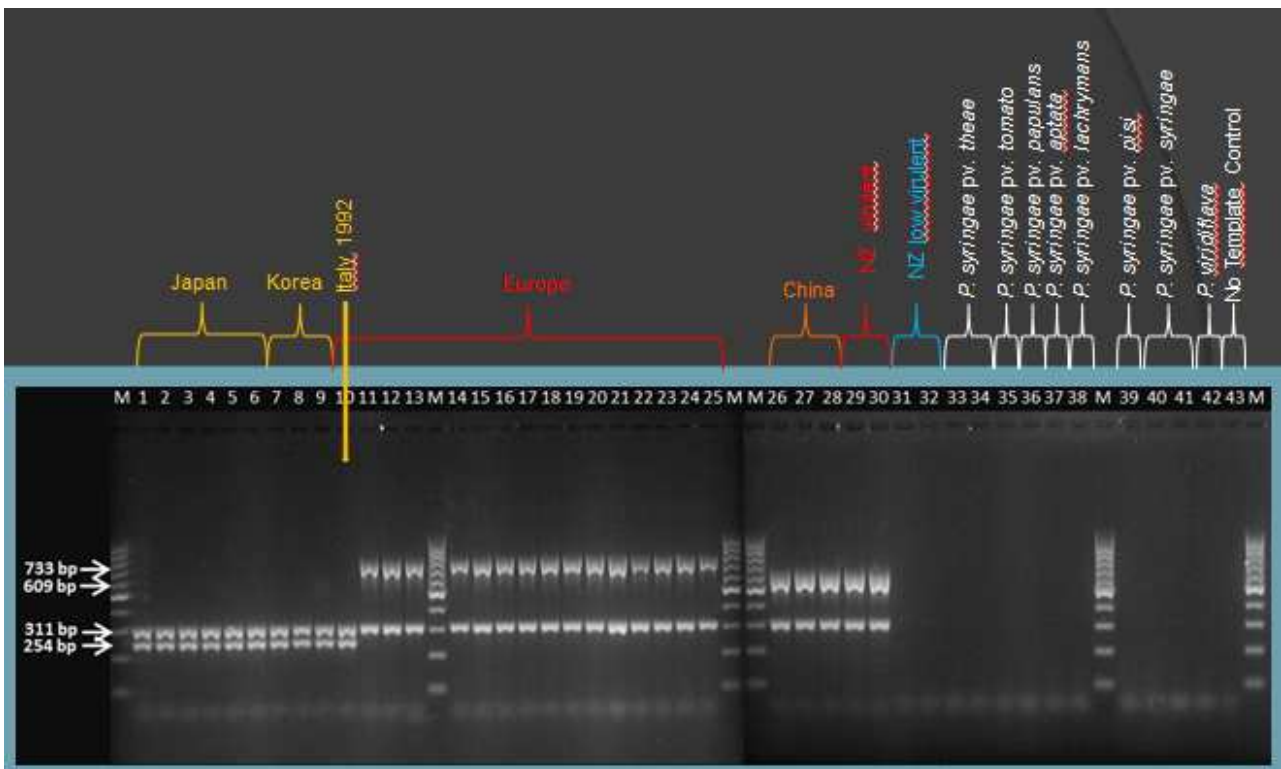
In considerazione di ciò, si è ritenuto opportuno investigare per avere nel nostro metodo diagnostico una selettività anche nei confronti di queste popolazioni, di scarsa o nessuna importanza a livello patogenetico.

Dalle ricerche effettuate nei database internazionali, anche grazie alla recente disponibilità di sequenze genomiche complete del patogeno, è stato possibile identificare alcuni geni con potenziali caratteristiche di unicità. 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 pathovar affini, compresa la pathovar *theae*, più che sufficienti per tracciare delle coppie di primers con altissima specificità (ancora potenziale, in questa fase) per PSA.

Sono state quindi definite le sequenze per 3 primers specifici in direzione forward (5'-3') (HZ3 F1, HZ3 F2 e HZ3 F3) e 1 primer in direzione reverse (3'-5') (HZ3 RU). 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 e HZ3 F2/HZ3 RU sono stati finora provati in PCR standard con risultati molto incoraggianti. Infatti hanno confermato la loro specificità verso PSA, anche allargando le prove a tutti i ceppi attualmente disponibili sia di PSA di tutte le provenienze italiane, europee e mondiali, sia appartenenti a diverse pathovar di *P. syringae*, sia a ceppi di *Pseudomonas* spp. o altri batteri isolabili da piante di actinidia in ambiente naturale.

Al fine di caratterizzare ulteriormente le popolazioni di PSA, sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi genomica, è stato sviluppato e validato un saggio di PCR multiplex (m-PCR). In questo saggio, oltre ad utilizzare la coppia di primers HZ3 F1/HZ3 RU, sopra descritta, sono state aggiunte altre 3 coppie di primers capaci ciascuna di amplificare selettivamente una delle tre principali popolazioni di PSA ad oggi note: quella Giapponese/Coreana, quella europea e quella cinese/neozelandese (virulenta). Con questa metodica è possibile, oltre alla corretta identificazione di tutti i ceppi di PSA virulento (la variante PSA-LV identificata solo in Nuova Zelanda ed Australia non viene amplificata da nessuno delle 4 coppie di primers), anche determinare l'appartenenza di un isolato sotto osservazione alle tre principali popolazioni di PSA ad oggi note, dando contemporaneamente importanti indicazioni circa la relativa origine geografica, ed in seconda battuta, anche sulla virulenza degli isolati. Di seguito è riportato un esempio di amplificazione.



Infine, la terza combinazione di primers, HZ3 F3/HZ3 RU, per le dimensioni del frammento amplificato (128 bp), compresa tra 80 e 200 bp, sembra 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 mediante RotorGene Q (Qiagen) per Real-time PCR.

Sebbene l'utilizzo di questa nuova strumentazione sia relativamente semplice, è stato comunque 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 molto incoraggianti sotto diversi punti di vista:

- il sistema sembra avere una estrema specificità nei confronti di PSA poiché NON amplifica il DNA di diverse pathovar; tra queste, per la prima volta rispetto a tutti i precedenti tentativi, è compresa anche la pathovar *theae*;
- il protocollo Real-Time dovrebbe permettere anche la quantificazione del patogeno; in tal senso sono infatti state già “costruite” le prime rette di taratura del sistema con DNA di riferimento (PSA dal ceppo depositato NCPPB 7285) a concentrazione nota in diluizioni decimali progressive;
- il sistema sembra avere una estrema sensibilità; dalle prime prove sembra in grado di rilevare la presenza del DNA del patogeno a quantità ridottissime, fino a circa 100 fg, equivalenti a circa 15 copie-equivalenti del genoma batterico;
- il sistema, inoltre, sembra essere in grado di distinguere in maniera molto efficace anche il genoma batterico delle popolazioni di PSA virulente (PSA V) da quello delle popolazioni non virulente per ora isolate esclusivamente in Nuova Zelanda (PSA LV), aggiungendo così ulteriore significatività al suo impiego.

Le sperimentazioni sono tuttora in atto.

### **P. viridiflava**

Il patogeno in questione, per quanto significativo, non ha una patogenicità comparabile con quella di PSA. Si è comunque scelto, come previsto dal Progetto, di 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. I nostri studi in questo caso si sono focalizzati principalmente sulla analisi delle sequenze degli spaziatori trascritti che separano i geni codificanti per le subunità ribosomali 16S e 23S (meglio noti come ITS). La comparazione delle suddette sequenze con le analoghe di specie affini ci ha permesso di identificare porzioni sufficientemente divergenti e caratteristiche per il disegno di primers specifici.

Anche questi primers sono attualmente in fase di valutazione.

### **P.s. pv. syringae**

Questo è certamente il patogeno di più difficile da studiare per diversi motivi: il primo è che in questa pathovar spesso vengono inclusi ceppi di *Pseudomonas syringae* (Pss) la cui collocazione tassonomica non è ancora del tutto definita; il secondo, conseguente al primo, è che è molto difficile stabilire quali siano realmente gli isolati di *Pseudomonas syringae* che determinano danni su actinidia (principalmente macchie necrotiche fogliari di piccole dimensioni) piuttosto che altri di *Pseudomonas syringae* solo casualmente presenti sul filloplano di actinidia e sul quale non determinano alcun tipo di lesione.

Per tali motivi, in una prima fase si è cercato di raccogliere degli isolati effettivamente provenienti da lesioni su foglie di *Actinidia* spp. e se ne è valutata la patogenicità mediante contaminazione artificiale di tessuti di actinidia allevati in ambiente controllato. Su un pool consistente di isolati di partenza (circa una trentina), solo pochi (attualmente 8) hanno riprodotto i sintomi riferibili a Pss, sono dunque risultati realmente patogeni, e quindi includibili nella pathovar *syringae*.

Di questi ultimi si stanno approfondendo 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.

Gli studi sono attualmente in corso.