



UNIONE EUROPEA
Fondo Europeo Agricolo
per lo Sviluppo Rurale



Regione Emilia-Romagna

L'Europa investe nelle zone rurali

AVVISI PUBBLICI REGIONALI DI ATTUAZIONE PER L'ANNO 2017 DEL TIPO DI
OPERAZIONE 16.2.01 "SUPPORTO PER PROGETTI PILOTA E PER LO SVILUPPO DI NUOVI
PRODOTTI, PRATICHE, PROCESSI E TECNOLOGIE NEL SETTORE AGRICOLO E
AGROINDUSTRIALE"

FOCUS AREA 3A DGR N. 227 DEL 27 FEBBRAIO 2017

RELAZIONE TECNICA FINALE

DOMANDA DI SOSTEGNO: 5050325

DOMANDA DI PAGAMENTO: 5170822

FOCUS AREA: 3A

Titolo Piano	INNOVAZIONE, EFFICIENZA E COMPETITIVITÀ DEL VIVAISMO FRUTTICOLO DELLA REGIONE EMILIA ROMAGNA - ACRONIMO: "Vivaismo 3.0"
Ragione sociale del proponente (soggetto mandatario)	CAV - Centro Attività Vivaistiche PEC: cav@evopec.it
Elenco partner del gruppo operativo	- CAV - Centro Attività Vivaistiche, Società Cooperativa Agricola; - DISTAL, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna; - CRPV Soc. Coop.

Durata originariamente prevista del progetto (in mesi)	18
Data inizio attività	1 Agosto 2018
Data termine attività (incluse eventuali proroghe già concesse)	31 Gennaio 2020

Relazione relativa al periodo di attività dal	01 Agosto 2018	al 31 Gennaio 2020
Data rilascio relazione	31 Gennaio 2020	

Autore della relazione	Giovanni Nigro		
Telefono		e-mail	gnigro@crpv.it

INDICE

Capitolo 1. Descrizione dello stato di avanzamento del piano

1.1 Stato di avanzamento delle azioni previste nel piano

Capitolo 2. Descrizione per singola azione

2.1 **AZIONE 1** – *ESERCIZIO DELLA COOPERAZIONE*

2.1.1 Attività e risultati

2.1.2 Costi

- Personale
- Trasferte
- Collaborazioni, consulenze, altri servizi

2.2 **AZIONE 3** – *SPECIFICHE AZIONI LEGATE ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO*

2.2.1 Attività e risultati

- **Sotto-azione 3.1:** applicazione di una nuova tecnica diagnostica (digital droplet pcr) per garantire la sanità totale del materiale vivaistico frutticolo regionale
- **Prova 3.1.1a:** trasferimento dei protocolli di diagnosi (*Il caso del virus del nanismo del susino PPV*)
 - 3.1.1a.1 - Obiettivi
 - 3.1.1a.2 - Materiali e metodi
 - 3.1.1a.3 - Risultati e discussione
 - 3.1.1a.4 - Conclusioni
- **Prova 3.1.1b:** trasferimento dei protocolli di diagnosi (*Il caso del viroide del Mosaico Latente del Pesco PMLVD*)
 - 3.1.1b.1 - Obiettivi
 - 3.1.1b.2 - Materiali e metodi
 - 3.1.1b.3 - Risultati e discussione
 - 3.1.1b.4 - Conclusioni
- **Prova 3.1.1c:** trasferimento dei protocolli di diagnosi (*Il caso del fitoplasma associato al giallume europeo delle drupacee "European Stone Fruit Yellows" ESFY*)
 - 3.1.1c.1 - Obiettivi
 - 3.1.1c.2 - Materiali e metodi
 - 3.1.1c.3 - Risultati e discussione
 - 3.1.1c.4 - Conclusioni
- **Prova 3.1.1d:** trasferimento dei protocolli di diagnosi (*Il caso del virus del Pinot grigio - GPGV*)
 - 3.1.1d.1 - Obiettivi
 - 3.1.1d.2 - Materiali e metodi
 - 3.1.1d.3 - Risultati e discussione

- 3.1.1d.4 - Conclusioni
- **Prova 3.1.2:** analisi delle piante drupacee in conservazione
 - 3.1.2.1 – Obiettivi
 - 3.1.2.2 - Materiali e metodi
 - 3.1.2.3 – Risultati, discussione e conclusioni
- **Prova 3.1.3:** fase di produzione, analisi e rilievi presso aziende agricole
 - 3.1.3.1 - Obiettivi
 - 3.1.3.2 - Materiali e metodi
 - 3.1.3.3 – Risultati e discussione
 - 3.1.3.4 – Conclusioni
- **Prova 3.1.4:** Fase di trasformazione: analisi sensoriali su campioni di frutta e vino
 - 3.1.4.1 – Obiettivi
 - 3.1.4.2 - Materiali e metodi
 - 3.1.4.3 - Risultati e discussione
 - 3.1.4.4 – Conclusioni
- **3.1.5 Costi - Azione 3**
 - Personale
 - Trasferte
 - Materiale consumabile
 - Spese per Materiale durevole e attrezzature
 - Collaborazioni, consulenze, altri servizi

2.3 - **AZIONE 4 – DIVULGAZIONE** (*Piano di divulgazione di trasferimento dei risultati e implementazione della rete pei*)

2.3.1 Attività e risultati

2.3.2 Costi

- Collaborazioni, consulenze, altri servizi

Capitolo 3. Criticità incontrate durante la realizzazione dell'attività

///

Capitolo 4. Altre informazioni

///

Capitolo 5. Considerazioni finali

5.1- Prodotti e Indicatori di risultato

5.2 - Ricadute (sui partecipanti)

Capitolo 1 - DESCRIZIONE DELLO STATO DI AVANZAMENTO DEL PIANO

Le attività hanno preso avvio in corrispondenza della data di inizio del progetto, precisamente il 1 Agosto 2018. In generale, tutte le attività sperimentali sono state attivate e messe a punto secondo i protocolli presentati nel Piano.

In sintesi:

- Le attività afferenti all'**AZIONE 1** sono state realizzate come previsto, seguendo i percorsi e utilizzando i diversi strumenti indicati nel Piano;
- Nessuna attività era prevista nell'ambito dell'**AZIONE 2**;

Tutte le attività previste nell'**AZIONE 3** sono state regolarmente effettuate, come riportato nel progetto.

In particolare, dalla *Prova 3.1.1* è emerso che la tecnica ddPCR è applicabile alla diagnosi di tutte le malattie previste nel progetto, con una maggior sensibilità rispetto alla tecnica Real Time PCR.

Nella Prova 3.1.2 si evince che la tecnica ddPCR è utilissima a individuare malattie latenti difficilmente diagnosticabili con le altre tecniche molecolari, sia nella fase di ingresso di nuove fonti candidate al CAV, sia nella fase successiva di conservazione delle piante di categoria pre – base.

Alla luce dei risultati ottenuti nella *Prova 3.1.3*, è possibile affermare che la tecnica ddPCR potrà essere applicata inizialmente per confermare la diagnosi visiva della malattia, quando nei pescheti si osservano sintomi di mosaico latente, e, successivamente, per capire se le piante asintomatiche nelle vicinanze di quelle malate siano anch'esse già state infettate dal viroide. In tal caso, se l'esito è positivo, cioè presenza del viroide, le piante 'serbatoio' dovranno essere abbattute per rallentare la progressione della malattia nel frutteto.

Nell'ambito della *Prova 3.1.4*, la fase di trasformazione sui campioni di vino e frutta saggiati ha evidenziato che, nel caso del vino, non ci sono state differenze significative tra quello prodotto da uve derivanti da piante infette e quello proveniente da uve raccolte da piante sane. Per quanto concerne la frutta sono, invece, emerse differenze significative tra quella derivante da piante malate di mosaico latente e quella ottenuta da piante sane.

Il GO ha sviluppato diverse iniziative di divulgazione (**AZIONE 4**), quali *1 Visita Guidata* (28 Novembre 2018), *1 Incontro Tecnico* (10 Maggio 2019), *2 Articoli Tecnici* (pubblicati sulla Rivista Frutticoltura: n° 5, 2019 e n°10, 2019), *implementazione del Portale CAV, CRPV* e della *rete PEI-AGRI*.

1.1 Stato di avanzamento delle azioni previste nel Piano

Azione	Unità aziendale responsabile	Tipologia attività	Mese inizio attività previsto	Mese inizio attività reale	Mese termine attività previsto	Mese termine attività reale
1 - Cooperazione	CRPV	Esercizio della Cooperazione	1	1	18	18
3 - Realizzazione del Piano	CAV - DISTAL	Azioni dirette alla realizzazione del Piano	1	1	18	18
4 - Divulgazione	CRPV	Divulgazione	4	4	16	16

Capitolo 2 - DESCRIZIONE PER SINGOLA AZIONE

2.1 AZIONE 1 – ESERCIZIO DELLA COOPERAZIONE

2.1.1 Attività e risultati

Azione

Azione 1 – ESERCIZIO DELLA COOPERAZIONE

Unità aziendale responsabile (Uar)

CRPV

Descrizione attività

CRPV, su incarico del beneficiario, ha svolto la funzione di coordinatore dell'attività di funzionamento prevista dal Piano.

È stato, dunque, individuato il **Referente Scientifico**: *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna, afferente al Distal.

Il CRPV, tramite proprio personale, ha seguito regolarmente e gestito con le necessarie e opportune documentazioni, tutte le fasi di sviluppo, dall'attivazione, anche formale, all'attuale rendicontazione finale, del Piano per assicurarne il corretto funzionamento e svolgimento.

In particolare, sono di seguito descritte in sintesi le diverse attività svolte dal CRPV.

A seguito della Determina regionale Num. 12162 del 27/07/2018 il CRPV ha proceduto all'attivazione del Piano e, in particolare, delle diverse prove e attività previste nell'Azione 3, come previsto nell'ambito del Piano.

Dopo un primo incontro plenario con tutti i partner del progetto di Filiera (*Domanda CARPETTA n. 5050933 – Posizione: F 13; Determina Num. 12162 del 27/07/2018 BOLOGNA*), svoltosi in data **31 Luglio 2018**, nel quale è stata data, tra l'altro, ampia informazione sui contenuti del Piano di Innovazione, si è svolta una specifica riunione di attivazione, in data **28 Agosto 2018**, in cui sono stati approfonditi i contenuti e gli obiettivi del Piano, al fine di avere la più ampia condivisione possibile delle informazioni, affinare le modalità di realizzazione delle azioni d'innovazione e per rendere operativi rapidi feedback. A questo incontro ne è seguito un secondo (**20 Novembre 2018**), in cui hanno preso parte esclusivamente i partner scientifici e un terzo (**25 Febbraio 2019**), con tutte le Unità Operative, per fare il punto sullo stato d'avanzamento e sviluppo delle diverse attività. Successivamente si sono svolti ulteriori incontri di coordinamento per definire lo stato di avanzamento lavori, precisamente, nelle date di seguito elencate:

- 17 Aprile 2019;
- 25 Settembre 2019;
- 20 Gennaio 2020.

L'incontro del **28 Agosto 2018** ha rappresentato anche il momento di costituzione del Comitato di Piano (CP) per la gestione e il funzionamento delle Unità Operative. Il CP è quindi composto:

- dal Responsabile del Piano (RP): (CAV);
- dal Responsabile Gestione del Piano (RGP): (CRPV)
- dal Responsabile Scientifico (RS) (*Alma Mater Studiorum – Università di Bologna - UNIBO, Distal*);
- da (CAV);
- da (CAV);
- da (CAV);
- da (CAV);
- da (CRPV).

Il CRPV si è, quindi, occupato di coordinare nel complesso tutte le attività, animando le Unità Operative, seguendone il percorso e verificandone la coerenza e buon sviluppo (attraverso innumerevoli contatti telefonici, via WhatsApp, mail e mailing list, documentabili dagli strumenti CRPV e incontri specifici). Il CRPV ha, inoltre, favorito lo scambio di informazioni e, quando ritenuto utile, il necessario supporto sia informativo che logistico per il buon sviluppo delle sinergie e attività previste dal Piano.

Ha, inoltre, stimolato e collaborato per la realizzazione di diverse azioni di divulgazione, come descritte di seguito nell'**AZIONE 4**.

L'attività di coordinamento e animazione ha visto il CRPV organizzare e partecipare a un **totale di 6 incontri** (uno di attivazione del progetto e 5 stati di avanzamento) nel periodo 1 Agosto 2018 - 31 Gennaio 2020; gli incontri si sono svolti nelle seguenti date:

- 28 Agosto 2018 (Tebano, RA);
- 20 Novembre 2018 (Tebano, RA);
- 25 Febbraio 2019 (Tebano, RA);
- 17 Aprile 2019 (Tebano, RA);
- 25 Settembre 2019 (Tebano, RA);
- 20 Gennaio 2020 (Tebano, RA).

I fogli firma di tutti gli incontri delle Unità Operative sopra citati, sono contenuti nell'*Allegato Azione 1*.

Per la fase organizzativa e logistica degli incontri e delle altre iniziative descritte di seguito, il CRPV si è avvalso sia della propria segreteria tecnica sia del supporto del CAV.

Durante il costante monitoraggio dei lavori e i risultati via via raggiunti in caso di scostamenti sono state valutate le necessarie azioni correttive. Questo è stato gestito anche in relazione ai momenti cruciali nello sviluppo delle diverse prove del Piano ("milestone"). Anche gli incontri sopra citati sono stati utili a questo scopo, oltre ai contatti diretti avuti tra i responsabili di ciascuna Prova ed il Responsabile del Piano.

Nell'ultimo semestre del progetto è iniziata la fase di analisi dei risultati per l'attuale rendicontazione finale, e il RGP ha fornito tutti gli strumenti, le informazioni e i suggerimenti utili alle unità operative per il corretto sviluppo di questa fase dell'attività.

Oltre alle attività descritte in precedenza, il CRPV ha svolto altre funzioni quali le attività di interrelazione con la Regione Emilia-Romagna, l'assistenza tecnico-amministrativa alle altre Unità operative, le richieste di chiarimento e la redazione di eventuali richieste di aggiustamento o comunicazioni di altra natura trasmesse poi dal Beneficiario all'Ente preposto.

Il CRPV si è occupato dell'aggiornamento della Rete PEI-AGRI in riferimento al Piano, come richiesto dalla Regione, al fine di stimolare l'innovazione, tramite l'apposita modulistica presente sul sito. Il CRPV ha, inoltre, gestito e predisposto documentazione e format e ha opportunamente informato e supportato i partner nella fase di rendicontazione tecnica ed economica.

Autocontrollo e Qualità

Attraverso le Procedure e le Istruzioni operative approntate nell'ambito del proprio Sistema Gestione Qualità, il CRPV ha lavorato al fine di garantire efficienza ed efficacia al progetto, come segue:

- Requisiti, specificati nei protocolli tecnici, rispettati nei tempi e nelle modalità definite;
- Rispettati gli standard di riferimento individuati per il progetto;
- Garantita la soddisfazione del cliente tramite confronti diretti e comunicazioni scritte;
- Rispettate modalità e tempi di verifica in corso d'opera definiti per il progetto;
- Individuati i fornitori ritenuti più consoni per il perseguimento degli obiettivi.
- La definizione delle procedure, attraverso le quali il Responsabile di Progetto ha effettuato il coordinamento e applicato le politiche di controllo di qualità, sono la logica conseguenza della struttura organizzativa del CRPV.

In particolare sono state espletate le attività di seguito riassunte.

- Attività di coordinamento

Le procedure attraverso le quali si è concretizzato il coordinamento dell'intero progetto si sono sviluppate attraverso riunioni e colloqui periodici con il Responsabile Scientifico e con quelli delle Unità Operative coinvolte.

- Attività di controllo

La verifica periodica dell'attuazione progettuale si è realizzata secondo cadenze temporali come erano state individuate nella scheda progetto. Più in particolare è stata esercitata sia sul funzionamento operativo che sulla qualità dei risultati raggiunti; in particolare è stata condotta nell'ambito dei momenti sotto descritti.

- Verifiche dell'applicazione dei protocolli operativi in relazione a quanto riportato nella scheda progetto;
- Visite ai campi sperimentali e ai laboratori coinvolti nella conduzione delle specifiche attività.

- Riscontro di non conformità e/o gestione di modifiche e varianti

Non si sono verificate situazioni difformi a quanto previsto dalla scheda progetto.

Tutte le attività svolte come previsto nella procedura specifica di processo sono registrate e archiviate nel fascicolo di progetto e certificate attraverso visite ispettive svolte dal Responsabile Gestione Qualità del CRPV.

Il Sistema Qualità CRPV, ovvero l'insieme di procedure, di misurazione e registrazione, di analisi e miglioramento e di gestione delle risorse è monitorato mediante visite ispettive interne e verificato ogni 12 mesi da Ente Certificatore accreditato (DNV-GL).

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al Piano di lavoro, criticità evidenziate.

Gli obiettivi del Piano sono stati raggiunti durante la vita del progetto e non sono state rilevate criticità nella fase di cooperazione delle Unità Operative.

2.1.2 Costi Azione 1

Personale

a) *Personale dipendente: Unità Operativa CAV*

<i>Nominativo</i>	<i>Ruolo nel Piano</i>	<i>Qualifica</i>	<i>Rapporto di lavoro</i>	<i>Impegno gg/uomo</i>	<i>Costo gg</i>	<i>costo totale (€)</i>
	Responsabile organizzativo del Piano	Dirigente	TI	20,6 (ore 165)	487,98	10.064,64
TOTALE PERSONALE (a)						€ 10.064,64

b) *Trasferte*

<i>Cognome e Nome</i>	<i>Descrizione</i>	<i>Importo (Euro)</i>
	Trasferte da sede CAV a sedi di svolgimento prove, riunioni per stati di avanzamento.	112,00
TOTALE TRASFERTE (b)		€ 112,00

TOTALE (a+b) **€10.176,64**

c) *Collaborazioni, consulenze, altri servizi: Unità Operativa CRPV*

<i>Ragione sociale della società di consulenza</i>	<i>Referente</i>	<i>Importo contratto</i>	<i>Attività realizzata</i>	<i>costo totale (€)</i>
C.R.P.V. SOC. COOP.		€ 10.000,00	Come da preventivo e da contratto approvato	€ 6.000,00

TOTALE **€ 6.000,00**

TOTALE AZIONE 1:

<i>Unità Aziendale responsabile</i>	<i>Personale/trasferte</i>	<i>Costo (€)</i>
CAV	<i>Personale</i>	10.064,64
	<i>trasferte</i>	112,00
CRPV	<i>consulenze</i>	6.000,00
TOTALE		16.176,64

2.2 - AZIONE 3 - SPECIFICHE AZIONI LEGATE ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO

2.2.1 Attività e risultati

Azione
AZIONE 3 - SPECIFICHE AZIONI LEGATE ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO
Unità aziendale responsabile (Uar)
CAV e DISTAL
Descrizione attività

SOTTO-AZIONE 3.1

Uar: tecnici CAV, ricercatori DISTAL

OBIETTIVI GENERALI

L'obiettivo generale del progetto, consiste nel dotare il vivaismo frutticolo regionale (Emilia Romagna) di nuovi e più efficienti strumenti di diagnosi fitopatologica per la diagnosi principalmente di virus, viroidi e fitoplasmi, al fine di assicurare agli agricoltori l'impiego di materiale di migliore qualità, sia per quanto concerne l'aspetto varietale sia, per quanto attiene alle problematiche fitosanitarie.

Entrando nel dettaglio degli obiettivi specifici:

- mettere a punto una più innovativa tecnica di diagnosi (Digital Droplet PCR) in grado di individuare la presenza di minime contaminazioni di organismi patogeni in campioni vegetali;
- produrre materiale vivaistico frutticolo certificato con un maggiore livello di sanità e migliori caratteristiche qualitative.

La tecnica introdotta per migliorare le prestazioni diagnostiche del laboratorio CAV è stata la "Digital Droplet PCR" oggi usata in medicina umana per la diagnostica precoce di importanti virus, quali l'HIV, essendo la stessa capace di rilevare anche una sola copia del DNA/RNA virale nel campione testato. Nel nostro caso, rileva la presenza del patogeno (es. virus, viroide, fitoplasma, batterio o nematode) nella pianta anche quando presente a bassissima concentrazione; di fatto basta la presenza di una sola copia del microorganismo per avere un esito positivo del test.

Nell'ambito del progetto PSR di filiera sono stati messi a punto protocolli per la individuazione di importanti malattie delle drupacee e della vite (virus della Sharka (PPV), viroide del Mosaico Latente

del pesco (PLMVd), fitoplasma delle drupacee (ESFYP) e Virus del Pinot Grigio (GPGV)) responsabili di un importante decadimento qualitativo e quantitativo del prodotto finale e della pianta stessa.

Come già accennato, la tecnica Digital sfrutta le chimiche fluorescenti (primers e sonde specifiche) della già consolidata tecnica Real Time PCR perciò la prima fase della messa a punto del saggio ddPCR per uno specifico patogeno consiste nella individuazione del protocollo Real Time più idoneo ad essere trasferito in tecnica digital. Per protocollo più idoneo si intende il protocollo pubblicato a più elevate sensibilità e specificità e più largamente validato mediante i principali circuiti interlaboratorio in ambito nazionale ed internazionale. Non secondaria è la scelta dei campioni su cui effettuare la messa a punto; per ogni patogeno da individuare sono stati considerati diversi campioni sicuramente infetti (controlli positivi) ed altri sicuramente non infetti (controlli negativi, rappresentati da piante ottenute principalmente da seme) appartenenti alle specie ospiti (susino, albicocco, pesco, vite), tutti provenienti dalle collezioni di isolati virali mantenuti in vivo presso il DISTAL e presso il CAV.

Le modalità di trasferimento del protocollo diagnostico in Digital hanno tenuto in considerazione sia l'efficacia che i costi del nuovo saggio. *In primis* per i patogeni a RNA (virus e viroidi) è stata valutata la performance di due diversi percorsi diagnostici:

- **saggio Digital in modalità TWO step** (ovvero mantenendo separate le fasi di retrotrascrizione generica e quelle di amplificazione dello specifico patogeno) valutando le performance di due enzimi di retrotrascrizione MMLV RT aventi costi sensibilmente differenti (Invitrogen e Promega);
- **saggio digital in modalità ONE step** (ovvero incorporando la reazione generica di retrotrascrizione direttamente nella reazione di amplificazione specifica). La modalità one step è a sua volta stata testata in due modalità differenti: la prima utilizzando la mastermix digital Biorad per realtime con probes (ddPCR Supermix for probes) aggiungendo l'enzima di retrotrascrizione MMLV RT di Invitrogen e Promega e valutandone le performance; la seconda utilizzando la mastermix ONE STEP Biorad (One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes Biorad).

Le condizioni del saggio Digital sono state ricavate empiricamente a partire dalle condizioni impiegate per l'analisi in Real Time adattando, se necessario, le concentrazioni di primers e sonde fluorescenti agli specifici reagenti necessari per l'analisi ddPCR al fine di ottenere un dato finale più chiaro e univoco possibile. Stabilite le condizioni per l'effettuazione del test in Digital per ciascun patogeno da diagnosticare, si passa alla valutazione della ripetibilità e della sensibilità del saggio. Per quanto riguarda il parametro di ripetibilità i medesimi campioni sono saggiati in doppio presso i due

laboratori coinvolti nella messa a punto (laboratorio CAV e laboratorio DSITAL) e i risultati ottenuti sono poi stati confrontati.

Prova 3.1.1a: trasferimento dei protocolli di diagnosi (il caso del virus del nanismo del susino PPV)

3.1.1a.1 - Obiettivi

Come già detto nella sezione generale 3.1, l'obiettivo consiste nel trasferimento di un protocollo di diagnosi del virus PPV dalla tecnica RealTime alla digital droplet PCR. Come protocollo più idoneo ad essere trasferito in tecnica ddPCR è stato scelto quello pubblicato da Olmos et al., 2005. Journal of virological Methods, 128,151-155. Tale protocollo, oggetto di progetti Ring Test di validazione nazionale (ARNADIA), è in grado di detectare le 2 isoforme del virus PPV (PPV-D e PPV-M) che interessano le principali specie di drupacee avvalendosi di una chimica TaqMan (Primers + sonda marcata) che ne assicura una maggiore specificità.

3.1.1a.2 - Materiali e metodi

Campioni utilizzati per la messa a punto del saggio ddPCR:

come premesso sono stati individuati 3 campioni di drupacee positivi a PPV in seguito ad analisi mediante tecnica Realtime PCR. Ciascuno dei tre campioni positivi a PPV appartiene ad una diversa specie di drupacee (pesco, albicocco, susino) interessata dalla infezione del virus oggetto di saggio; da ciascun campione è stato estratto l'RNA utilizzando il sistema Buffer McKenzie + Kit ZYMO) in uso al CAV. Nella messa a punto sono poi stati inseriti due campioni risultati negativi a PPV in seguito a test in realtime PCR; uno dei due (GF305) è rappresentato da una pianta di portinnesto di pesco originata da seme e pertanto sicuramente non infetta dal virus in quanto quest'ultimo non risulta in grado di essere trasmesso via seme.

IDENTIFICATIVO CAMPIONE	SPECIE	TIPO DI CONTROLLO
12	PESCO	Campione positivo a PPV (Test RealTime PCR)
13	SUSINO	Campione positivo a PPV (Test RealTime PCR)
13a	ALBICOCCO	Campione positivo a PPV (Test RealTime PCR)
18	ALBICOCCO	Campione negativo a PPV (Test RealTime PCR)
19	GF305 (pesco)	Campione negativo a PPV (Test RealTime PCR) originato da seme

Tabella 1: Campioni scelti per la fase di messa a punto del metodo in ddPCR per la detection di PPV

Prove effettuate:

Sui campioni riportati in Tabella 1 sono state effettuate le seguenti prove sperimentali utilizzando reagenti diversi con costi sensibilmente differenti:

- **saggio Digital in modalità TWO step** (reazioni di retrotrascrizione e ddPCR separate):
 - Retrotrascrizione con random esameri e Enzima RT (**Promega**) + saggio ddPCR con Mastermix Biorad (2X ddPCR Mastermix for probes)
 - Retrotrascrizione con random esameri e Enzima RT (**Invitrogen**) + saggio ddPCR con Mastermix Biorad (2X ddPCR Mastermix for probes)
- **saggio digital in modalità ONE step** (Retrotrascrizione e ddPCR avvengono in un'unica reazione incorporando l'enzima di retrotrascrizione alla masterix utilizzata per la ddPCR)
 - saggio ddPCR con Mastermix Biorad (2X ddPCR Mastermix for probes) a cui viene aggiunto l'enzima di retrotrascrizione MMLV RT (**Promega**);
 - saggio ddPCR con Mastermix Biorad (2X ddPCR Mastermix for probes) a cui viene aggiunto l'enzima di retrotrascrizione MMLV RT (**Invitrogen**);
 - saggio ddPCR utilizzando la mastermix ONE STEP Biorad (One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes Biorad).

Di seguito vengono riportate le condizioni di miscele di reagenti e i protocolli termici di ciascuna delle reazioni sopra citate:

Condizioni per saggio Two-step (RT INVITROGEN/PROMEGA + saggio ddPCR Supermix x probes 2X):

RETROTRASCRIZIONE (Enzimi Promega e Invitrogen)	
REAGENTI	QUANTITA' μ L/CAMPIONE
BUFFER RT 5X (Invitrogen/Promega)	1
dNTP 10mM	0.5
MMLV INV 200U/ μ l	0.25
Random esameri (INV 3 μ g/ μ l)	0.5
RNA (Estratto ZYMO+Tampone McKenzie)	1
Water	1.75
TOTALE	5
PROTOCOLLO TERMICO Reazione di retrotrascrizione: 50' A 37°C, 15' A 70°C, 4°C forever	

ddPCR mastermix	
REAGENTI	QUANTITA' μL/CAMPIONE
ddPCR Supermix x probes 2X	10
P241 (100 μ M)	0,2
P316D (100 μ M)	0,1
P316M (100 μ M)	0,1
Probe PPV D-M (5 μ M)	1,2*
c-DNA (ottenuto con retrotrascrizione secondo protocollo sopra riportato)	2
water	6,4
totale mix	20
PROTOCOLLO TERMICO reazione ddPCR	N° cicli
95°C per 10'	1x
94°C per 30'' (Ramp rate 2°C/sec) denaturazione	40x
58°C per 1' (Ramp rate 2°C/sec) annealing	
98°C per 10'	Disattivazione enzima
4°C per 30'	
4°C forever	

Condizioni per saggio one-step (ddPCR Supermix x probes + MMLV INVITROGEN/PROMEGA):

ddPCR mastermix	
REAGENTI	QUANTITA' μL/CAMPIONE
ddPCR Supermix x probes 2X	10
P241 (100 μ M)	0,2
P316D (100 μ M)	0,1
P316M (100 μ M)	0,1
Probe PPV D-M (5 μ M)	1,2*
MMLV (INVITROGEN o PROMEGA) 200U/ μ l dil 1:50	1
RNA (Estratto ZYMO+Tampone McKenzie)	2
water	5,4
totale mix	20
PROTOCOLLO TERMICO reazione ddPCR	N° cicli
48°C per 30' (reazione di retrotrascrizione)	1x
95°C per 10'	1x
94°C per 30'' (Ramp rate 2°C/sec) denaturazione	40x

58°C per 1' (Ramp rate 2°C/sec) annealing	
98°C per 10'	Disattivazione enzima
4°C per 30'	
4°C forever	

* Le quantità della miscela di reazione pubblicata per il saggio PPV sono state rispettate tranne che per la sonda PPV-DM la cui concentrazione è stata leggermente aumentata (da una concentrazione finale di 0.15µM come pubblicato nella bibliografia di riferimento ad una concentrazione di 0.3µM) per migliorare la separazione tra le droplet negative e quelle positive.

Condizioni per saggio one-step (ddPCR ONE STEP Biorad)

ddPCR mastermix	
REAGENTI	QUANTITA' µL/CAMPIONE
One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes Biorad	6.25
P241 (100µM)	0,25
P316D (100µM)	0,125
P316M (100µM)	0,125
Probe PPV D-M (5µM)	1,5*
DTT (300mM) Biorad kit	1.25
RT (Biorad kit)	2,5
RNA (Estratto ZYMO+Tampone McKenzie)	2.5
water	11
totale mix	25
PROTOCOLLO TERMICO reazione ddPCR	N° cicli
48°C per 60' (reazione di retrotrascrizione)	1x
95°C per 10'	Attivazione dell'enzima
95°C per 30'' (Ramp rate 2°C/sec) denaturazione	40x
58°C per 1' (Ramp rate 2°C/sec) annealing	
98°C per 10'	Disattivazione enzima
4°C per 30'	
4°C forever	

3.1.1a.3 - Risultati e discussione

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti analizzando i campioni in doppio presso il laboratorio CAV e in doppio presso il laboratorio DISTAL. In Tabella 2 sono riportate le medie dei valori ottenuti per ciascun campione analizzato in doppio.

CAMPIONE	LABORATORIO		Ct realtime PCR	Saggio one step Promega (copie/μL)	Saggio one step Invitrogen (copie/μL)	Saggio two step RT Promega (copie/μL)	Saggio two step RT Invitrogen (copie/μL)	Saggio one step Biorad
12	CAV	+PPV	17	1335	5475	675	1545	13900
	DISTAL		21	3067.5	7975	2280	1545	/
13	CAV	+PPV	19	900	3855	108	4985	nt
	DISTAL		20	1270	2975	1700	865	/
13a	CAV	+PPV	17	320	1245	295	1020	6350
	DISTAL		21	332.5	1047,5	335	305	/
18	CAV	-PPV	38	0.15	0.07	0.1	0	0.15
	DISTAL		40	22.5	24	13.5	26.5	/
19	CAV	-PPV	38	0	0.07	0.06	0.25	0.27
	DISTAL		40	1.3	0.6	0.2	0.8	/
water	CAV	C- PCR	/	0.07	0.07	0.14	0	0
	DISTAL			/				

Tabella 2 - Medie dei valori ottenuti per ciascun campione analizzato in doppio.

3.1.1a.4 - Conclusioni

Confrontando i dati ottenuti nei laboratori di DISTAL e CAV si è concordemente giunti alle seguenti conclusioni (elenco le modalità digital testate in ordine di performance, dalla migliore alla peggiore):

1. Protocollo One step (ddPCR One Step Biorad)
2. Protocollo One step (ddPCR Supermix for probes + MMLV RT Invitrogen)
3. Protocollo Two step (Retrotrascrizione con MMLV Invitrogen seguita da ddPCR Supermix for probes)
4. Protocollo One step (ddPCR Supermix for probes + MMLV RT Promega)
5. Protocollo Two step (Retrotrascrizione con MMLV Promega seguita da ddPCR Supermix for probes)

Alla luce di questi risultati si è deciso di raggiungere un compromesso pensando ad applicazioni di questo metodo nella routine del laboratorio CAV: il protocollo con la ddPCR One Step Biorad ha costi elevatissimi e performance migliori di quelle dimostrate dal protocollo One step (ddPCR Supermix for probes + MMLV RT Invitrogen) ma rispetto a quest'ultimo non aggiunge alcun miglioramento da un punto di vista qualitativo del risultato. In altri termini i campioni che risultano positivi e negativi con il Protocollo One step (ddPCR One Step Biorad) sono confermati tali anche dal protocollo One step

(ddPCR Supermix for probes + MMLV RT Invitrogen) decisamente meno dispendioso. Quindi a seconda del tipo di risultato che si vuole ottenere (qualitativo o quantitativo) si utilizza l'uno o l'altro protocollo.

L'applicazione del protocollo scelto per la diagnosi del PPV offre spunti di riflessione sulla necessità di creare una soglia positivo/negativo. I campioni inseriti come campioni negativi mostrano infatti in taluni casi la presenza di goccioline fluorescenti che in teoria testimonierebbero la presenza del virus ricercato nel campione. Scaturisce da questo dato la necessità di inserire ad ogni sessione analitica alcuni campioni sicuramente negativi che servono per il posizionamento di questa soglia pos/neg: i campioni che hanno un numero di goccioline fluorescenti superiori a quelle dei controlli negativi possono essere considerati positivi mentre saranno considerati dubbi i campioni in cui il numero di goccioline fluorescenti risulta molto vicino alla soglia. In tal caso il campione andrebbe ripetuto, meglio se a partire dal processo di estrazione dell'RNA.

In Figura 1 sono riportati esempi della visualizzazione di campioni positivi e negativi analizzati per la detection di PPV in ddPCR.

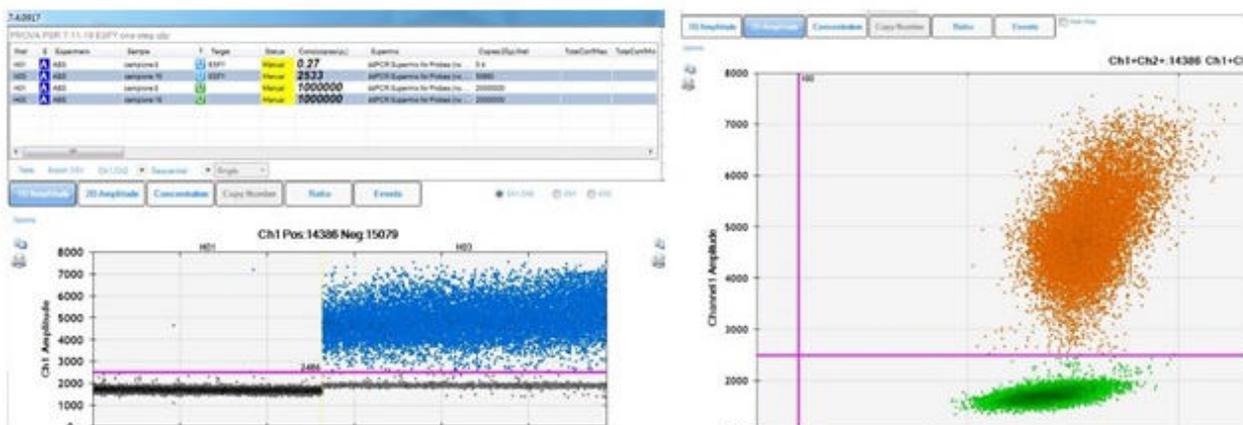


Figura 1: visualizzazione in 1D (a sinistra) e 2D (a destra) di due campioni (uno positivo e l'altro negativo) a PPV.

Prova 3.1.1b: trasferimento dei protocolli di diagnosi (il caso del viroide del Mosaico Latente del Pesco PLMVD)

3.1.1b.1 - Obiettivi

Come già detto nella sezione generale 3.1, l'obiettivo consiste nel trasferimento di un protocollo di diagnosi del viroide PLMVd dalla tecnica RealTime alla digital droplet PCR. Come protocollo più idoneo ad essere trasferito in tecnica ddPCR è stato scelto quello pubblicato da Serra et al., nel

2017 (Interference between variants of peach latent mosaic viroid reveals novel features of its fitness landscape: implications for detection. Sci Rep. 2017 Feb 17;7:42825. doi: 10.1038/srep42825). Tale protocollo, oggetto di progetti Ring Test di validazione nazionale, è in grado di detectare le più comuni varianti del viroide PLMVd che interessano il pesco; tale protocollo si avvale della chimica TaqMan (Primers + sonda marcata) che ne assicura maggiore specificità.

3.1.1b.2 - Materiali e metodi

Campioni utilizzati per la messa a punto del saggio ddPCR:

come premesso sono stati individuati 3 campioni di pesco positivi a PLMVd in seguito ad analisi mediante tecnica Realtime PCR. Nella messa a punto sono poi stati inseriti due campioni di portinnesto di Pesco GF305 da seme come controlli negativi perché risultati sani in seguito a test in realtime PCR. Da ciascun campione è stato estratto il DNA utilizzando il sistema Buffer McKenzie + Kit ZYMO in uso al CAV.

IDENTIFICATIVO CAMPIONE	SPECIE	TIPO DI CONTROLLO
14	PESCO	Campione positivo a PLMVd (Test RealTime PCR)
15	PESCO	Campione positivo a PLMVd (Test RealTime PCR)
16	PESCO	Campione positivo a PLMVd (Test RealTime PCR)
20	GF305 (pesco)	Campione negativo a PLMVd (Test RealTime PCR) originato da seme
21	GF305 (pesco)	Campione negativo a PLMVd (Test RealTime PCR) originato da seme

Tabella 3: Campioni scelti per la fase di messa a punto del metodo in ddPCR per la detection di PLMVd

Prove effettuate:

Sui campioni riportati in Tabella 3 sono state effettuate le seguenti prove sperimentali utilizzando materiali diversi con costi sensibilmente differenti:

- **saggio Digital in modalità TWO step (reazioni di retrotrascrizione e ddPCR separate):**
 - Retrotrascrizione con random esameri e Enzima RT (**Promega**) + saggio ddPCR con Mastermix Biorad (2X ddPCR Mastermix for probes)
 - Retrotrascrizione con random esameri e Enzima RT (**Invitrogen**) + saggio ddPCR con Mastermix Biorad (2X ddPCR Mastermix for probes)

- **saggio digital in modalità ONE step** (Retrotrascrizione e ddPCR avvengono in un'unica reazione incorporando l'enzima di retrotrascrizione alla mastermix utilizzata per la ddPCR)
 - saggio ddPCR con Mastermix Biorad (2X ddPCR Mastermix for probes) a cui viene aggiunto l'enzima di retrotrascrizione MMLV RT (**Promega**);
 - saggio ddPCR con Mastermix Biorad (2X ddPCR Mastermix for probes) a cui viene aggiunto l'enzima di retrotrascrizione MMLV RT (**Invitrogen**);
 - saggio ddPCR utilizzando la mastermix ONE STEP Biorad (One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes Biorad).

Di seguito vengono riportate le condizioni di miscele di reagenti e i protocolli termici di ciascuna delle reazioni sopra citate:

Condizioni per saggio Two-step (RT INVITROGEN/PROMEGA + saggio ddPCR Supermix x probes 2X):

RETROTRASCRIZIONE (Enzimi Promega e Invitrogen)	
REAGENTI	QUANTITA' μL/CAMPIONE
BUFFER RT 5X (Invitrogen/Promega)	1
dNTP 10mM	0.5
MMLV INV 200U/ μ l	0.25
Random esameri (INV 3 μ g/ μ l)	0.5
RNA (Estratto ZYMO+Tampone McKenzie)	1
Water	1.75
TOTALE	5
PROTOCOLLO TERMICO Reazione di retrotrascrizione: 50' A 37°C, 15' A 70°C, 4°C forever	

ddPCR mastermix	
REAGENTI	QUANTITA' μL/CAMPIONE
ddPCR Supermix x probes 2X	10
FP2 (10 μ M)	1
RP2 (10 μ M)	1
Probe P3 (4 μ M)	1.5*
c-DNA (ottenuto con retrotrascrizione secondo protocollo sopra riportato)	2
water	4.5
totale mix	20
PROTOCOLLO TERMICO reazione ddPCR	N° cicli

95°C per 10'	1x
94°C per 30'' (Ramp rate 2°C/sec) denaturazione	40x
58°C per 1' (Ramp rate 2°C/sec) annealing	
98°C per 10'	Disattivazione enzima
4°C per 30'	
4°C forever	

Condizioni per saggio one-step (ddPCR Supermix x probes+ MMLV INVITROGEN/PROMEGA):

ddPCR mastermix	
REAGENTI	QUANTITA' µL/CAMPIONE
ddPCR Supermix x probes 2X	10
FP2 (10µM)	1
RP2 (10µM)	1
Probe P3 (4µM)	1,5*
MMLV (INVITROGEN o PROMEGA) 200U/µl dil 1:12,5	0.5
RNA (Estratto ZYMO+Tampone McKenzie)	2
water	4
totale mix	20
PROTOCOLLO TERMICO reazione ddPCR	
	N° cicli
48°C per 30' (reazione di retrotrascrizione)	1x
95°C per 10'	1x
94°C per 30'' (Ramp rate 2°C/sec) denaturazione	40x
58°C per 1' (Ramp rate 2°C/sec) annealing	
98°C per 10'	Disattivazione enzima
4°C per 30'	
4°C forever	

* le quantità della miscela di reazione pubblicata per il saggio PLMVd sono state rispettate tranne che per la sonda Probe P3 la cui concentrazione è stata leggermente aumentata (da una concentrazione finale di 0.16µM come pubblicato nella bibliografia di riferimento ad una concentrazione di 0.3µM) per migliorare la separazione tra le droplet negative e quelle positive.

Condizioni per saggio one-step (ddPCR ONE STEP Biorad)

ddPCR mastermix	
REAGENTI	QUANTITA' µL/CAMPIONE
One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes Biorad	10
FP2 (10µM)	1
RP2 (10µM)	1

Probe P3 (4µM)	1,5*
DTT (300mM) Biorad kit	1
RT (Biorad kit)	2
RNA (Estratto ZYMO+Tampone McKenzie)	2
water	1.5
totale mix	20
PROTOCOLLO TERMICO reazione ddPCR	N° cicli
48°C per 60' (reazione di retrotrascrizione)	1x
95°C per 10'	Attivazione dell'enzima
95°C per 30'' (Ramp rate 2°C/sec) denaturazione	40x
58°C per 1' (Ramp rate 2°C/sec) annealing	
98°C per 10'	Disattivazione enzima
4°C per 30'	
4°C forever	

3.1.1b.3 - Risultati e discussione

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti analizzando i campioni in doppio presso il laboratorio CAV e in doppio presso il laboratorio DISTAL. In tabella 4 sono riportate le medie dei valori ottenuti per ciascun campione analizzato in doppio

CAMPIONE	LABORATORIO		Ct realtime PCR	Saggio one step Promega (copie/µL)	Saggio one step Invitrogen (copie/µL)	Saggio two step RT Promega (copie/µL)	Saggio two step RT Invitrogen (copie/µL)	Saggio one step Biorad
14	CAV	+PLMVd	24	0	162.5	260	4900	0
	DISTAL		25.3	14032.5	22125	11070	6500	
16	CAV	+PLMVd	18	110	4620	6105	171000	0
	DISTAL		19.1	47772.5	63275	35150	25250	
20	CAV	-PLMVd	34	0.43	0.6	0.5	1.6	0
	DISTAL		34.9	80.5	80	90	85.3	
21	CAV	-PLMVd	38	0.08	0	0	0	0
	DISTAL		37.8	36.0	32.9	32	24.9	
water	CAV	C- PCR	/	0	0	0.07	0	0
	DISTAL		/		/			

Tabella 4 - Medie dei valori ottenuti per ciascun campione analizzato in doppio

3.1.1b.4 - Conclusioni

Confrontando i dati ottenuti nei laboratori di DISTAL e CAV si è concordemente giunti alle seguenti conclusioni (in elenco le modalità digital testate in ordine di performance, dalla migliore alla peggiore):

1. Protocollo Two step (Retrotrascrizione con MMLV Invitrogen seguita da ddPCR Supermix for probes)
2. Protocollo Two step (Retrotrascrizione con MMLV Promega seguita da ddPCR Supermix for probes)
3. Protocollo One step (ddPCR Supermix for probes + MMLV RT Invitrogen)
4. Protocollo One step (ddPCR Supermix for probes + MMLV RT Promega)
5. Protocollo One step (ddPCR One Step Biorad)

Il protocollo Realtime per la detection di PLMVd scelto per la trasposizione in digital PCR è quello riconosciuto come migliore a seguito di ringtest nazionali. Il test riconosce isoforme diverse del viroide PLMVd e per fare questo i primers sono inevitabilmente degenerati. Questa condizione dei primers ha evidenziato, anche in realtime, la presenza di curve aspecifiche che compaiono a cicli soglia decisamente alti ma che in ddPCR si traducono in goccioline positive che creano inevitabilmente rumore di fondo. Come detto sopra per il test digital per la detection di PPV, anche per la detection di PLMVd si rende necessario inserire ad ogni sessione analitica alcuni campioni sicuramente negativi che servono per il posizionamento della soglia pos/neg rendendo più semplice l'interpretazione del risultato analitico. A sorpresa il Protocollo One step (ddPCR One Step Biorad) non ha dato alcun risultato, probabilmente a causa della poca compatibilità tra l'enzima di RT incorporato nel kit e la esigua lunghezza del genoma del viroide (300bp circa).

In figura 2 sono riportati esempi della visualizzazione di campioni positivi e negativi analizzati per PLMVd in ddPCR.

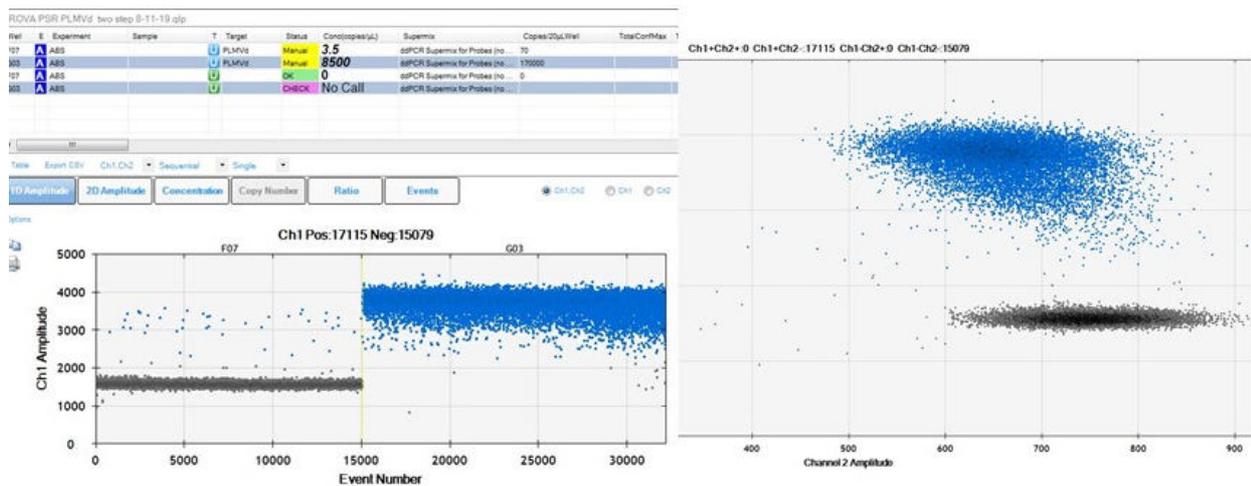


Figura 2: visualizzazione in 1D (a sinistra) e 2D (a destra) di due campioni (uno positivo e l'altro negativo) a PLMVd.

Prova 3.1.1c: trasferimento dei protocolli di diagnosi (il caso del fitoplasma associato al giallume europeo delle drupacee, "European Stone Fruit Yellows", ESFY)

3.1.1c .1 - Obiettivi

Come già detto nella sezione generale 3.1, l'obiettivo consiste nel trasferimento di un protocollo di diagnosi del fitoplasma associato al giallume europeo delle drupacee ESFY dalla tecnica RealTime alla digital droplet PCR. Come protocollo Realtime più idoneo ad essere trasferito in tecnica ddPCR è stato scelto quello pubblicato da Minguzzi et al., nel 2016 (A rapid Protocol of Crude RNA/DNA Extraction for RT-qPCR Detection and Quantification of Candidatus Phytoplasma prunorum. PLOS ONE DOI:10.1371/journal.pone.0146515). Tale protocollo si avvale della chimica TaqMan (Primers + sonda marcata) che ne assicura maggiore specificità ed è già stato trasposto in ddPCR con ottimi risultati (Rita Musetti and Laura Pagliari Phytoplasmas: Methods and Protocols, 2019. Methods in Molecular Biology vol 1875 Capitolo 13 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8837-2_13).

3.1.1c .2 - Materiali e metodi

Campioni utilizzati per la messa a punto del saggio ddPCR:

Come premesso nella sezione generale 3.1 sono stati individuati 3 campioni di drupacee positivi a ESFY in seguito ad analisi mediante tecnica Realtime PCR. Ciascuno dei tre campioni positivi

appartiene ad una diversa specie di drupacea (pesco, albicocco, susino) interessata dalla infezione del fitoplasma oggetto di saggio; da ciascun campione è stato estratto il DNA utilizzando il sistema Doyle and Doyle in uso al CAV. Nella messa a punto sono poi stati inseriti due campioni risultati negativi a ESFY in seguito a test in realtime PCR e provenienti dalle screenhouses del CAV. Nell'ambito dei test preliminari volti ad identificare i campioni da utilizzare per la messa a punto del saggio, sono state fatte alcune prove in realtime PCR per valutare la performance del saggio utilizzando un protocollo che amplifica direttamente il DNA estratto e un protocollo realtime one-step che prevede una fase di retrotrascrizione dell'estratto di DNA. Questa ultima affermazione potrebbe sembrare un controsenso; in realtà sull'estratto di DNA ottenuto con il protocollo Doyle and Doyle non vengono fatti trattamenti con RNasi per cui l'estratto, oltre al DNA, contiene anche una cospicua quantità di RNA trascritto a partire dal DNA del fitoplasma e prevalentemente costituito da rRNA (RNA ribosomiale) che rappresenta il target del saggio Realtime che si vorrà trasporre in ddPCR. Il risultato di tali prove preliminari in Realtime PCR è riassunto in Tabella 6.

IDENTIFICATIVO CAMPIONE	SPECIE	TIPO DI CONTROLLO
2	SUSINO	Campione positivo a ESFY (Test RealTime PCR)
3	SUSINO	Campione positivo a ESFY (Test RealTime PCR)
7	ALBICOCCO	Campione positivo a ESFY (Test RealTime PCR)
11	PESCO	Campione positivo a ESFY (Test RealTime PCR)
17a	ALBICOCCO	Campione positivo a ESFY (Test RealTime PCR)
15	PESCO SCREEN CAV	Campione negativo a ESFY (Test RealTime PCR)
17	ALBICOCCO SCREEN CAV	Campione negativo a ESFY (Test RealTime PCR)

Tabella 5: Campioni scelti per la fase di messa a punto del metodo in ddPCR per la detection di ESFY

Prove effettuate:

Sui campioni riportati in Tabella 5 sono state effettuate le seguenti prove sperimentali utilizzando reagenti diversi con costi sensibilmente differenti:

- **saggio digital in modalità ONE step** (Retrotrascrizione e ddPCR avvengono in un'unica reazione incorporando l'enzima di retrotrascrizione alla masterix utilizzata per la ddPCR)

- saggio ddPCR con Mastermix Biorad (2X ddPCR Mastermix for probes) a cui viene aggiunto l'enzima di retrotrascrizione MMLV RT (**Invitrogen**);
- saggio ddPCR con Mastermix Biorad (2X ddPCR Mastermix for probes) a cui viene aggiunto l'enzima di retrotrascrizione MMLV RT (**Promega**);
- **saggio DIRETTO ddPCR utilizzando la mastermix ONE STEP Biorad** (One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes Biorad).

Di seguito vengono riportate le condizioni di miscele di reagenti e i protocolli termici di ciascuna delle reazioni sopra citate:

Condizioni per saggio one-step (ddPCR Supermix x probes+ MMLV INVITROGEN/PROMEGA):

ddPCR mastermix	
REAGENTI	QUANTITA' μL/CAMPIONE
ddPCR Supermix x probes 2X	10
ESFY 16S- F (10 μ M)	1.8
ESFY 16S- R (10 μ M)	1.8
Probe ESFY 16S (4 μ M)	1.25
MMLV (INVITROGEN) 200U/ μ l dil 1:50	1
DNA (Estratto Doyle and Doyle)	2
water	2.15
totale mix	20
PROTOCOLLO TERMICO reazione ddPCR	N° cicli
48°C per 30' (reazione di retrotrascrizione)	1x
95°C per 10'	1x
94°C per 30'' (Ramp rate 2°C/sec) denaturazione	40x
58°C per 1' (Ramp rate 2°C/sec) annealing	
98°C per 10'	Disattivazione enzima
4°C per 30'	
4°C forever	

Condizioni per saggio one-step (ddPCR ONE STEP Biorad)

ddPCR mastermix	
REAGENTI	QUANTITA' μL/CAMPIONE
One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes Biorad	10
ESFY 16S- F (10 μ M)	1.8
ESFY 16S- R (10 μ M)	1.8

Probe ESFY 16S (4µM)	1,25
DTT (300mM) Biorad kit	1
RT (Biorad kit)	2
DNA (Estratto ZYMO+Tampone McKenzie)	2
water	0.25
totale mix	20
PROTOCOLLO TERMICO reazione ddPCR	N° cicli
48°C per 60' (reazione di retrotrascrizione)	1x
95°C per 10'	Attivazione dell'enzima
95°C per 30'' (Ramp rate 2°C/sec) denaturazione	40x
58°C per 1' (Ramp rate 2°C/sec) annealing	
98°C per 10'	Disattivazione enzima
4°C per 30'	
4°C forever	

3.1.1c .3 - Risultati e discussione

I risultati della prova Realtime per valutare il tipo di saggio da trasporre (diretto o one-step) sono riportati in tabella 6; tali risultati indicano che il tipo di saggio realtime migliore per l'analisi di ESFY risulta il test ONE-STEP.

IDENTIFICATIVO CAMPIONE	Tipo di controllo	Realtime PCR saggio DIRETTO (Kit Promega) su DNA estratto (Ct)		Realtime PCR saggio ONE-STEP (kit Promega+MMLV Promega1:100) su DNA estratto (Ct)
		CAV	DISTAL	CAV
2	+ESFY	31	29.2	29
3	+ESFY	25	24.8	25
7	+ESFY	27	21.7	23
11	+ESFY	31	29.1	0
17a	+ESFY	20	/	16
17	-ESFY	/	39.9	/
15	-ESFY	/	39.5	/

Tabella 6: Risultati RealTime su DNA estratto mediante saggio diretto e ONE-Step.

Confrontando infatti i Ct dei medesimi campioni ottenuti effettuando i due saggi a confronto si evince che ciascun campione ha Ct in media di 2 o 3 cicli inferiore con il saggio ONE-STEP rispetto a quello diretto. Si è proceduto quindi a trasporre in ddPCR il saggio eseguito in modalità ONE-STEP.

La valutazione delle performance dei saggi realtime one-step trasposti in ddPCR è stata effettuata saggiando diluizioni seriali del campione positivo 17a. I risultati ottenuti sono elencati in Tabella 7. Come previsto il saggio utilizzando la mastermix One-Step Biorad (One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes Biorad) ha dato i risultati migliori in termini di numero di droplet positive ma il protocollo saggio ONE step +MMLV Invitrogen, decisamente più economico, ha dato risultati perfettamente allineati in termini di positività/negatività del campione 17a a vari livelli di diluizione. Si utilizzeranno quindi nella routine del laboratorio l'uno o l'altro protocollo a seconda degli scopi specifici dell'analisi da effettuare.

CAMPIONE	Saggio ddPCR one step Promega (copie/μL)	Saggio ddPCR one step Invitrogen (copie/μL)	Saggio ddPCR one step Biorad (copie/μL)
17a dil 1:10	9000	11000	10900
17a dil 1:100	902	2090	100000
17a dil 1:200	467	1026	11100
17a dil 1:500	169	400	5360
17a dil 1:1000	90.6	215	2750
17a dil 1:10000	11.1	24.9	247
Sano 19	0.62	0.91	0.23
Water (C- PCR)	0.8	2.8	0

Tabella 7: risultati di protocolli realtime one-step trasposti in ddPCR

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti analizzando i campioni in doppio presso il laboratorio CAV e in doppio presso il laboratorio DISTAL. I protocolli utilizzati sono diversi sugli stessi campioni analizzati. In Tabella 8 sono riportate le medie dei valori ottenuti per ciascun campione analizzato in doppio.

CAMPIONE	LABORATORIO		Saggio ddPCR one step Invitrogen (copie/μL)	Saggio ddPCR DIRETTO ddPCR (copie/μL)
2	CAV	+ ESFY	5000	nt
	DISTAL		nt	1195
3	CAV	+ ESFY	28000	nt
	DISTAL		nt	18300
7	CAV	+ ESFY	181100	nt

	DISTAL		nt	30100
11	CAV	+ ESFY	22000	
	DISTAL		nt	1033.5
17	CAV	- ESFY	0.29	nt
	DISTAL		nt	41,5
15	CAV	- ESFY	0.15	nt
	DISTAL		nt	57.1
water	CAV	C- PCR	0	nt
	DISTAL		nt	nt

Tabella 8: media valori per campione analizzato

3.1.1c .4 - Conclusioni

Il saggio digital One-Step con l'aggiunta di MMLV Invitrogen, rispetto al saggio ddPCR diretto per la detection di ESFY, è risultato più robusto, ripetibile e specifico non producendo rumore di fondo nei campioni testati come controlli negativi; consideriamo buona pratica inserire sempre più campioni sicuramente negativi a ciascuna sessione analitica per ovviare al problema della soglia pos/neg.

Prova 3.1.1d: trasferimento dei protocolli di diagnosi (il caso del virus del Pinot Grigio)

3.1.1d.1 - Obiettivi

Come già detto nella sezione generale 3.1, l'obiettivo consiste nel trasferimento di un protocollo di diagnosi del virus del pinot grigio GPGV dalla tecnica RealTime alla digital droplet PCR. Come protocollo più idoneo ad essere trasferito in tecnica ddPCR è stato scelto quello riportato da Ratti et al., unpublished. Tale protocollo, oggetto di progetti Ring Test di validazione nazionale (ASPROPI), è in grado di detectare il virus del Pinot Grigio che interessa le principali varietà di vite di interesse economico; anche in questo caso il saggio realtime si avvale di una chimica TaqMan (Primers + sonda marcata) che ne assicura una maggiore specificità.

3.1.1d.2 - Materiali e metodi

Campioni utilizzati per la messa a punto del saggio ddPCR:

per la messa a punto del saggio ddPCR sono stati individuati 3 campioni di vite risultati positivi e 3 campioni risultati negativi a GPGV in seguito ad analisi mediante tecnica Realtime PCR. Da ciascun campione è stato

estratto l'RNA utilizzando il sistema Buffer McKenzie + Kit ZYMO in uso al CAV.

IDENTIFICATIVO CAMPIONE	SPECIE	TIPO DI CONTROLLO
22	VITE	Campione positivo a GPGV (Test RealTime PCR)
23	VITE	Campione positivo a GPGV (Test RealTime PCR)
24	VITE	Campione positivo a GPGV (Test RealTime PCR)
25	VITE	Campione negativo a GPGV (Test RealTime PCR)
26	VITE	Campione negativo a GPGV (Test RealTime PCR)
27	VITE	Campione negativo a GPGV (Test RealTime PCR)

Tabella 9: Campioni scelti per la fase di messa a punto del metodo in ddPCR per la detection di PPV

Prove effettuate:

Sui campioni riportati in Tabella 9 sono state effettuate le seguenti prove sperimentali utilizzando reagenti diversi con costi sensibilmente differenti:

- **saggio Digital in modalità TWO step** (reazioni di retrotrascrizione e ddPCR separate):
 - Retrotrascrizione con random esameri e Enzima RT (**Promega**) + saggio ddPCR con Mastermix Biorad (2X ddPCR Mastermix for probes)
 - Retrotrascrizione con random esameri e Enzima RT (**Invitrogen**) + saggio ddPCR con Mastermix Biorad (2X ddPCR Mastermix for probes)
- **saggio digital in modalità ONE step** (Retrotrascrizione e ddPCR avvengono in un'unica reazione)
 - incorporando l'enzima di retrotrascrizione alla masterix utilizzata per la ddPCR)
 - saggio ddPCR con Mastermix Biorad (2X ddPCR Mastermix for probes) a cui viene aggiunto l'enzima di retrotrascrizione MMLV RT (**Promega**);
 - saggio ddPCR con Mastermix Biorad (2X ddPCR Mastermix for probes) a cui viene aggiunto l'enzima di retrotrascrizione MMLV RT (**Invitrogen**);
 - saggio ddPCR utilizzando la mastermix ONE STEP Biorad (One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes Biorad).

Di seguito vengono riportate le condizioni di miscele di reagenti e i protocolli termici di ciascuna delle reazioni sopra citate:

Condizioni per saggio Two-step (RT INVITROGEN/PROMEGA + saggio ddPCR Supermix x probes 2X) :

RETROTRASCRIZIONE (Enzimi Promega e Invitrogen)	
REAGENTI	QUANTITA' μL/CAMPIONE
BUFFER RT 5X (Invitrogen/Promega)	1
dNTP 10mM	0.5
MMLV INV 200U/ μ l	0.25
Random esameri (INVITROGEN/PROMEGA 3 μ g/ μ l)	0.5
RNA (Estratto ZYMO+Tampone McKenzie)	1
Water	1.75
TOTALE	5
PROTOCOLLO TERMICO Reazione di retrotrascrizione: 50' A 37°C, 15' A 70°C, 4°C forever	

ddPCR mastermix	
REAGENTI	QUANTITA' μL/CAMPIONE
ddPCR Supermix x probes 2X	10
GPGV TAQ F (10 μ M)	1.8
GPGV TAQ F (10 μ M)	1.8
GPGV PROBE (4 μ M)	0.95*
c-DNA (ottenuto con retrotrascrizione secondo protocollo sopra riportato)	2
water	3.45
totale mix	20
PROTOCOLLO TERMICO reazione ddPCR	
95°C per 10'	N° cicli 1x
94°C per 30'' (Ramp rate 2°C/sec) denaturazione	40x
58°C per 1' (Ramp rate 2°C/sec) annealing	
98°C per 10'	Disattivazione enzima
4°C per 30'	
4°C forever	

Condizioni per saggio one-step (ddPCR Supermix x probes+ MMLV INVITROGEN/PROMEGA):

ddPCR mastermix	
REAGENTI	QUANTITA' μL/CAMPIONE
ddPCR Supermix x probes 2X	10
GPGV TAQ F (10 μ M)	1.8
GPGV TAQ F (10 μ M)	1.8
GPGV PROBE (4 μ M)	0.95*

MMLV (INVITROGEN o PROMEGA) 200U/μl dil 1:12.5	1
RNA (Estratto ZYMO+Tampone McKenzie)	2
water	2.45
totale mix	20
PROTOCOLLO TERMICO reazione ddPCR	N° cicli
48°C per 30' (reazione di retrotrascrizione)	1x
95°C per 10'	1x
94°C per 30'' (Ramp rate 2°C/sec) denaturazione	40x
58°C per 1' (Ramp rate 2°C/sec) annealing	
98°C per 10'	Disattivazione enzima
4°C per 30'	
4°C forever	

* le quantità della miscela di reazione pubblicata per il saggio GPGV sono state rispettate tranne che per la sonda GPGV PROBE la cui concentrazione è stata leggermente aumentata (da una concentrazione finale di 0.075μM come indicato da Ratti et al., unpublished, ad una concentrazione di 0.15μM) per migliorare la separazione tra le droplet negative e quelle positive.

Condizioni per saggio one-step (ddPCR ONE STEP Biorad)

ddPCR mastermix	
REAGENTI	QUANTITA' μL/CAMPIONE
One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes Biorad	10
GPGV TAQ F (10μM)	1.8
GPGV TAQ F (10μM)	1.8
GPGV PROBE (4μM)	0.95*
DTT (300mM) Biorad kit	1.25
RT (Biorad kit)	2,5
RNA (Estratto ZYMO+Tampone McKenzie)	2
water	0
totale mix	20
PROTOCOLLO TERMICO reazione ddPCR	N° cicli
48°C per 60' (reazione di retrotrascrizione)	1x
95°C per 10'	Attivazione dell'enzima
95°C per 30'' (Ramp rate 2°C/sec) denaturazione	40x
58°C per 1' (Ramp rate 2°C/sec) annealing	
98°C per 10'	Disattivazione enzima
4°C per 30'	
4°C forever	

3.1.1d.3 - Risultati e discussione

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti analizzando i campioni in doppio presso il laboratorio CAV e in doppio presso il laboratorio DISTAL. In Tabella 10 sono riportate le medie dei valori ottenuti per ciascun campione analizzato in doppio

CAMPIONE	LABORATORIO		Ct realtime PCR	Saggio one step Promega (copie/ μ L)	Saggio one step Invitrogen (copie/ μ L)	Saggio two step RT Promega (copie/ μ L)	Saggio two step RT Invitrogen (copie/ μ L)	Saggio one step Biorad
22	CAV	+ GPGV	25	119.8	1525	207	1460	5100
	DISTAL		25	708.1	4914	3991	1050	/
23	CAV	+ GPGV	24	233	7650	684	4120	/
	DISTAL		24	1491.2	18454	5941	2403	/
24	CAV	+ GPGV	25	94.9	1440	167.6	1365	/
	DISTAL		25	468.5	2202	1871	626	/
25	CAV	- GPGV	0	0	0	0.19	0	0.44
	DISTAL		0	0.6	0.6	0.1	0.5	/
26	CAV	- GPGV	0	0	0	0	0	/
	DISTAL		0	0.5	0.5	0.2	0.1	/
27	CAV	- GPGV	0	0	0	0	0	/
	DISTAL		0	0.5	0.1	0.6	0.2	/
water	CAV	NEG pcr	/	0.07	0	0.06	0	
	DISTAL		/	/	/	/	/	/

Tabella 10 - Medie dei valori ottenuti per ciascun campione analizzato in doppio

3.1.1d.4 - Conclusioni

Confrontando i dati ottenuti nei laboratori di DISTAL e CAV trasponendo il protocollo realtime per la detection di GPGV alla tecnica ddPCR si è concordemente giunti alle seguenti conclusioni (elenco le modalità digital testate in ordine di performance (dalla migliore alla peggiore)

1. Protocollo One step (ddPCR One Step Biorad)
2. Protocollo One step (ddPCR Supermix for probes + MMLV RT Invitrogen)
3. Protocollo Two step (Retrotrascrizione con MMLV Invitrogen seguita da ddPCR Supermix for probes)

4. Protocollo Two step (Retrotrascrizione con MMLV Promega seguita da ddPCR Supermix for probes)
5. Protocollo One step (ddPCR Supermix for probes + MMLV RT Promega)

Il saggio trasposto in digital PCR per la detection di GPGV è un saggio robusto, specifico e molto sensibile già in realtime. Ciò è stato confermato anche in digital PCR e le differenze tra i diversi protocolli sopra citati sono veramente esigue. Non è presente rumore di fondo significativo ma consideriamo buona pratica inserire come sempre più campioni sicuramente negativi a ciascuna sessione analitica per ovviare al problema della soglia pos/neg. Analizzando i risultati ottenuti si è optato per il Protocollo One step (ddPCR Supermix for probes + MMLV RT Invitrogen) per l'utilizzo di routine in quanto è in grado di quantificare e qualificare (positivo/negativo) il campione in maniera precisa con un dispendio di denaro e di tempo inferiore agli altri protocolli citati. Il Protocollo One step (ddPCR One Step Biorad) risulta sempre il più sensibile, ma come per il protocollo per la detection di PPV, lo si prenderà in considerazione quando si richiederà un dato preciso in termini di quantificazione del virus o quando ci sia necessità di un livello di sensibilità elevatissimo (ad esempio su campioni dubbi).

Prova 3.1.2: analisi delle piante drupacee in conservazione

3.1.2.1 - Obiettivi

Le fonti candidate a entrare nel "Sistema nazionale volontario di qualificazione del materiale di propagazione vegetale" (Decreto 19 marzo 2019) vengono conservate in ambiente totalmente isolato dall'esterno (pre – screen) fino al termine dei controlli fitosanitari. Le metodologie diagnostiche indicate nei disciplinari di certificazione comprendono al momento i saggi biologici su indicatori arborei e/o erbacei (indexaggio), i saggi sierologici (ELISA) ed infine i test molecolari (PCR e Realtime PCR). Chiaramente, nessuno di questi saggi raggiunge la sensibilità della Digital Droplet PCR. La nostra intenzione è dunque quella di applicare anche questa tecnica sulle fonti candidate, in particolare per rilevare quei patogeni che possono essere presenti allo stato latente nelle piante, o a concentrazioni bassissime. L'auspicio è che in futuro anche la digital venga inserita nei disciplinari di certificazione vivaistica. Ciò detto, i 4 protocolli diagnostici ddPCR messi a punto nelle sezioni precedenti, sono stati applicati sia a piante candidate di categoria pre-base (le fonti) sia a piante pre – base già in conservazione nelle screen del CAV per valutarne lo stato sanitario.

3.1.2.2 - Materiali e metodi

78 campioni di piante fra drupacee e vite presenti al CAV come fonti candidate/conservate, sono stati sottoposti ad estrazione di DNA/RNA e saggiati in doppio (in doppio presso il CAV e in doppio presso il DISTAL) mediante il protocollo ddPCR individuato come migliore, nelle sezioni precedenti, per lo specifico patogeno da saggiare. La Tabella 11 riporta i dettagli di ciascuno dei campioni saggiati secondo il seguente schema:

CODICE INTERNO CAMPIONE- NUMERO CAMPIONE (1-80)
VARIETA'
SPECIE/CATEGORIA
RISULTATO IN REALTIME PCR

Dei suddetti 78 campioni da analizzare in ddPCR fanno parte alcuni campioni sicuramente infetti dallo specifico patogeno (risultati positivi in seguito a Realtime PCR), alcuni campioni non infetti (risultati negativi in realtime PCR) e alcuni campioni sicuramente sani (utilizzati come controlli negativi nella fase di messa a punto dei protocolli). Oltre ai dettagli di ciascun campione da saggiare, la tabella 11 indica anche il patogeno da testare su ciascuno di essi tramite un codice colorato la cui interpretazione è indicata nella legenda a piè della medesima Tabella 11.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	31492019 CAMPIONE 1	37022019 CAMPIONE 9	71172019 CAMPIONE 17	71272019 CAMPIONE 25	71372019 CAMPIONE 33	71442019 CAMPIONE 41	35412019 CAMPIONE 49	6942019 CAMPIONE 57	71272019 CAMPIONE 65	7252019 CAMPIONE 73
	ROUBIONFVR/ROUGE001P1	RUBELVVR/RUB/ING09P3	CREA-FRF2437P2	CREA-FRF1903P2	MBFF3 BALL VHPF1	MBFF240 P1	CONTESSA PVR P3	17-37-10.a.D.G.25	ALBANA	MONTEPULCIANO
A	ALBIOCOCCO FONTE	ALBIOCOCCO FONTE	PESCO FONTE NB	PESCO FONTE FB	PESCO FONTE	PESCO FONTE	PESCO FONTE FB	NUCLEO VITE	NUCLEO VITE	NUCLEO VITE
	31492019 CAMPIONE 2	31492019 CAMPIONE 10	71112019 CAMPIONE 18	71242019 CAMPIONE 24	71312019 CAMPIONE 34	71492019 CAMPIONE 42	35432019 CAMPIONE 50	6942019 CAMPIONE 58	71522019 CAMPIONE 64	7242019 CAMPIONE 74
	ROUBIONFVR/ROUGE001P2	CACANSKARANA P1-P10	CREA-FRF2437P5	CREA-FRF1903P5	MBFF3 BALL VHPF2	MBFF35-001P2	ZAFISANFVR/MAURAR P4	GARGANEGA	BARBERA	PIGNOLETTO
B	ALBIOCOCCO FONTE	SUSINO FONTE	PESCO FONTE NB	PESCO FONTE FB	PESCO FONTE	PESCO FONTE	PESCO FONTE FB	NUCLEO VITE	NUCLEO VITE	NUCLEO VITE
	31972019 CAMPIONE 3	35942019 CAMPIONE 11	712019 CAMPIONE 19	71092019 CAMPIONE 27	71392019 CAMPIONE 35	71522019 CAMPIONE 43	35952019 CAMPIONE 51	7092019 CAMPIONE 59	7172019 CAMPIONE 67	7272019 CAMPIONE 75
	ROUBIONFVR/ROUGE001P3	WEL519 HONIF P1-P10	712019 CAMPIONE 19	CREA-FRF1744P3	MBFF4-001P1	MBFF BIG GEO P3	ZAFIT7NBVR/BIOWHITER P1	LAMBRUSCO SALAHINO	GROPPELLO GENTILE	PINOT GRIGIO
C	ALBIOCOCCO FONTE	SUSINO FONTE	PESCO FONTE NB	PESCO FONTE FB	PESCO FONTE	PESCO FONTE	PESCO FONTE NB	NUCLEO VITE	NUCLEO VITE	NUCLEO VITE
	31492019 CAMPIONE 4	35552019 CAMPIONE 12	71212019 CAMPIONE 20	71022019 CAMPIONE 28	71402019 CAMPIONE 34	71542019 CAMPIONE 44	35942019 CAMPIONE 52	7022019 CAMPIONE 60	71722019 CAMPIONE 68	7292019 CAMPIONE 76
	ROUBIONFVR/ROUGE001P4	WEL1403 FRANDIP P10	CREA-FRF2437P5	CREA-FRF1744P4	MBFF4-001P2	MBFF LUO D P1	ZAFIDANFVR/HONETTOP R P1	RABO50 PARE	GROPPELLO GUETTA	PINOT NERO
D	ALBIOCOCCO FONTE	SUSINO FONTE	PESCO FONTE NB	PESCO FONTE FB	PESCO FONTE	PESCO FONTE	PESCO FONTE NB	NUCLEO VITE	NUCLEO VITE	NUCLEO VITE
	31492019 CAMPIONE 5	31472019 CAMPIONE 13	71242019 CAMPIONE 21	71272019 CAMPIONE 29	71422019 CAMPIONE 37	35442019 CAMPIONE 45	31042019 CAMPIONE 53	7052019 CAMPIONE 61	7192019 CAMPIONE 69	7302019 CAMPIONE 77
	ROUBIONFVR/ROUGE001P5	WEL1403 FRANDIP4	NECTADONVA PVA5F70619P2	CREA-FRF2441P2	MBFF1 HEC P1	SEL OREA-FRF 10-31-10-15 P1-P	FERCLUSE PVR P1	SANGIOVESE	GROPPELLO MOSCASSINA	PRIMITIVO
E	ALBIOCOCCO FONTE	SUSINO FONTE	PESCO FONTE NB	PESCO FONTE FB	PESCO FONTE	PESCO FONTE FB	PESCO FONTE P0	NUCLEO VITE	NUCLEO VITE	NUCLEO VITE
	37092019 CAMPIONE 6	43242019 CAMPIONE 14	71052019 CAMPIONE 22	71042019 CAMPIONE 30	71432019 CAMPIONE 38	35442019 CAMPIONE 46	35942019 CAMPIONE 54	7092019 CAMPIONE 62	7222019 CAMPIONE 70	7312019 CAMPIONE 78
	RUBELVVR/RUB/ING09P1	WEL519 HONIF2	NECTADONVA PVA5F70620P1	CREA-FRF2441P5	MBFF1 HEC P2	SEL OREA-FRF 10-31-02-054 P1-P	SEL 10-31-10-05 P1	5.0.4	MERLOT	PRIMITIVO
F	ALBIOCOCCO FONTE	SUSINO FONTE	PESCO FONTE	PESCO FONTE FB	PESCO FONTE	PESCO FONTE P0	PESCO FONTE FB	NUCLEO VITE	NUCLEO VITE	NUCLEO VITE
	37092019 CAMPIONE 7	31472019 CAMPIONE 15	71242019 CAMPIONE 23	71042019 CAMPIONE 31	71452019 CAMPIONE 39	35592019 CAMPIONE 47	31042019 CAMPIONE 55	7092019 CAMPIONE 63	7222019 CAMPIONE 71	7322019 CAMPIONE 79
G	RUBELVVR/RUB/ING09P2	CACANSKARANA P2	NECTADONVA PVA5F70620P2	MBFF3 BAL P1	MBFF19-001P3	SEL OREA-FRF 31-06-154 P1-P11	SEL OREA-FRF 10-31-02-054 P3	VERDUZZO	MONTEPULCIANO	SAGRANTINO
	ALBIOCOCCO FONTE	SUSINO FONTE	PESCO FONTE	PESCO FONTE	PESCO FONTE	PESCO FONTE FB	PESCO FONTE P0	NUCLEO VITE	NUCLEO VITE	NUCLEO VITE
	35522019 CAMPIONE 8	35522019 CAMPIONE 16	1973222 CAMPIONE 24	7127222 CAMPIONE 32	7147222 CAMPIONE 40	7152222 CAMPIONE 48	7152222 CAMPIONE 56	7172222 CAMPIONE 64	7192222 CAMPIONE 72	7292222 CAMPIONE 80
H	GF305 (CAMP 20) HESSA AP.10)	SUSINA DI DRO P1-P9	CAMPIONE 22	GF305 (CAMP 21) HESSA AP.10)	GF305 (CAMP 20) HESSA AP.10)	GF305 (CAMP 20) HESSA AP.10)	GF305 (CAMP 21) HESSA AP.10)	CAMP 21 HESSA AP.10)	CAMPIONE 27 P5R	WATER
	PESCO	SUSINO FONTE	PESCO	PESCO	PESCO	PESCO	PESCO	WATER	WATER	WATER
	NEGESTV/NEGPPV	POS ESFY/NEGPPV	NEGESTV/NEGPPV	NEG ESTV/NEG PPV	NEG ESTV/NEG PPV	NEG PLMVA	NEG PLMVA	NEG GPV	NEG GPV	NEG GPV
	LEGENDA									
		COLONNE DEGLI STRATI PER DETECCIONIPPV E ESFY								
		COLONNE DEGLI STRATI PER DETECCIONIPLMV								
		COLONNE DEGLI STRATI PER DETECCIONIPLMV								

Tabella 11: dettaglio dei campioni di fonti candidate/conservate presso le screen house del CAV sottoposte a saggio ddPCR per l'individuazione dei patogeni PLMVd, PPV, ESFY e GPGV.

3.1.2.3 – Risultati, discussione e conclusioni

Risultati dell'analisi ddPCR per la detection di PPV e ESFY:

I campioni saggiati per PPV sono gli stessi saggiati per ESFY essendo i due patogeni in grado di infettare le medesime specie (susino, albicocco e pesco). E' stato quindi complessivamente saggiato **in doppio** un totale di 37 accessioni di drupacee (8 campioni di albicocco, 7 campioni di susino, 22 campioni di pesco) tutti facenti parte il materiale di fonte in conservazione presso il CAV. Sono inoltre stati inseriti 2 controlli negativi (piante sane da seme sicuramente non infette) e il campione contenente la sola miscela di reazione (water). I controlli negativi utilizzati (campioni 8 e 32) sono serviti come sistema per creare il valore soglia positivo-negativo. I risultati dell'analisi ddPCR in termini di numero di copie/ μ L (media del campione in doppio) sono riportati in tabella 12.

I campioni analizzati mediante **saggio ddPCR per la detection di PPV** sono risultati tutti negativi (con valori quantitativi tutti al di sotto del valore soglia). Il valore soglia calcolato presso il laboratorio DISTAL è pari a 0 mentre presso il laboratorio CAV per il saggio PPV è pari a 4.6 copie/ μ L pertanto tutti i campioni con valori al di sotto delle 5 copie/ μ L risultano negativi. Questo risultato conferma la necessità di creare tale valore soglia utilizzando campioni sicuramente sani ad ogni sessione analitica. Il campione 24 si conferma positivo come atteso (in quanto rappresenta il campione di controllo positivo del saggio ddPCR per PPV) in entrambi i laboratori che hanno eseguito l'analisi.

Il **saggio ddPCR per la detection di ESFY** è risultato estremamente pulito dal momento che il valore soglia è risultato molto basso (0.27 particelle / μ l quindi virtualmente <1) e tutti i campioni analizzati risultano avere valori quantitativi al di sotto di questa soglia a parte il campione utilizzato come controllo positivo (campione 16) che ha dato esito positivo come atteso. Tale risultato conferma il fatto che quando il saggio realtime è specifico e ripetibile lo è in automatico anche la sua trasposizione in ddPCR.

CAMPIONE	ddPCR PER PPV				ddPCR PER ESFY			
	CAV		DISTAL		CAV		DISTAL	
	Copie/ μ L	Risultato						
1	2.6	negativo	0.25	negativo	0	negativo	0.08	negativo
2	2.7	negativo	0	negativo	0.07	negativo	0.16	negativo
3	2.5	negativo	0	negativo	0	negativo	0	negativo
4	1.8	negativo	0.08	negativo	0	negativo	0	negativo
5	2.9	negativo	0	negativo	0	negativo	0	negativo

6	3.5	negativo	0	negativo	0.12	negativo	0	negativo
7	2.7	negativo	0	negativo	0	negativo	0	negativo
8 (C neg)	3.3		0.08		0.27		0.22	
9	3.2	negativo	0	negativo	0	negativo	0.07	negativo
10	3	negativo	0.42	negativo	0.1	negativo	0.53	negativo
11	3.6	negativo	0.71	negativo	0.17	negativo	0.41	negativo
12	4.2	negativo	1.36	negativo	0.11	negativo	0.27	negativo
13	3.65	negativo	0.33	negativo	0	negativo	0.07	negativo
14	3.55	negativo	0.25	negativo	0.1	negativo	0.20	negativo
15	3.95	negativo	0.24	negativo	0.07	negativo	0	negativo
16 (C pos ESFY)	3.7	negativo	0.28	negativo	2871	Positivo	10300	Positivo
17	3.1	negativo	0.33	negativo	0.03	negativo	0.07	negativo
18	3.3	negativo	0.2	negativo	0.03	negativo	0	negativo
19	3.6	negativo	0.43	negativo	0.1	negativo	0.07	negativo
20	3.65	negativo	1.02	negativo	0.06	negativo	0.36	negativo
21	3.2	negativo	0.33	negativo	0.06	negativo	0.27	negativo
22	3.75	negativo	0.25	negativo	0.22	negativo	0.41	negativo
23	3.95	negativo	1.04	negativo	0.03	negativo	0	negativo
24 (C pos PPV)	2981	positivo	7450	positivo	0	negativo	0	negativo
25	4.1	negativo	0.13	negativo	0.27	negativo	0.16	negativo
26	3.6	negativo	0.33	negativo	0.15	negativo	0.41	negativo
27	3.65	negativo	0	negativo	0.06	negativo	0.09	negativo
28	4.15	negativo	0.76	negativo	0.1	negativo	0.17	negativo
29	3.95	negativo	0.53	negativo	0.03	negativo	0.08	negativo
30	3.8	negativo	0.44	negativo	0	negativo	0.08	negativo
31	3.3	negativo	0.15	negativo	0.07	negativo	0	negativo
32 (C neg)	3.55		0		0		0.07	
33	3.15	negativo	0.22	negativo	0.07	negativo	0	negativo
34	4.5	negativo	1.3	negativo	0.09	negativo	0.15	negativo
35	4.6	negativo	2.1	negativo	0.03	negativo	0	negativo
36	3.7	negativo	0.22	negativo	0.03	negativo	0.16	negativo
37	3.55	negativo	0.14	negativo	0.06	negativo	0	negativo
38	3.9	negativo	0.18	negativo	0	negativo	0	negativo
39	3	negativo	0.07	negativo	0	negativo	0	negativo
40 (NEG PCR)	4.6	nt	0.14	/	0.03	nt	0.07	/

Tabella 12 - risultati dell'analisi ddPCR in termini di numero di copie/ μ L (media del campione in doppio)

Risultati dell'analisi ddPCR per la detection di PLMVd:

Mediante il saggio ddPCR per l'individuazione di PLMVd sono stati testati un totale di 36 campioni di pesco tutti facenti parte del materiale di fonte in conservazione presso il CAV. Sono inoltre stati inseriti 3 controlli negativi (piante sane da seme sicuramente non infette) e il campione contenente la sola miscela di reazione (water). Tutti i campioni sopra citati sono stati analizzati in doppio presso i laboratori CAV e DISTAL. I risultati ottenuti per ciascun campione a seguito dell'analisi ddPCR in termini di numero di copie/ μL (media del campione in doppio) sono riportati in Tabella 13.

I controlli negativi utilizzati sono serviti come parametro per creare il valore soglia positivo-negativo (0.4 particelle/ μL -ovvero 1 copia/ μL - per il saggio presso il CAV e 0.08 copie/ μL per il saggio presso il laboratorio DISTAL); i campioni analizzati hanno prodotto risultati chiaramente o al di sopra (campioni positivi) o minori/uguali al valore soglia.

Meritano un commento particolare alcuni risultati:

- campioni 25,31,36,37,41 e 44: campioni risultati positivi in realtime e confermati tali in ddPCR. Il saggio in doppio presso i due laboratori (CAV e DISTAL) produce risultati concordanti;
- campione 35: campione risultato dubbio in realtime (curva con $C_t=33$ ma con andamento **non** chiaramente di tipo esponenziale). Il campione in ddPCR è risultato negativo in entrambi i laboratori che hanno effettuato il saggio chiarendo il dubbio emerso in realtime PCR;
- campioni 26, 38, 39 e 42: campioni dubbi in Realtime PCR aventi C_t compreso tra 34 e 36 e andamenti delle curve borderline. Tali campioni sono risultati positivi in entrambi i laboratori che hanno effettuato il saggio. Questo risultato può essere spiegato considerando che il saggio realtime e il saggio ddPCR subiscono in maniera diversa la presenza di eventuali inibitori contenuti nell'estratto di RNA; in particolare il processo di emulsione della miscela di PCR caratteristica del saggio ddPCR crea micro-ambienti separati di amplificazione che contengono di fatto una quantità minore di inibitore rispetto a quella presente in una unica miscela di amplificazione realtime in cui la somma dei contaminanti l'estratto concorrono ad inibire l'attività della polimerasi. I medesimi campioni sottoposti semplicemente a diluizione 1:2 e risaggiati mediante tecnica Realtime PCR sono risultati infatti chiaramente positivi. Questo suggerisce di diluire sempre di un fattore 1:2-1:5 i campioni estratti in modo da ridurre il fenomeno di falsi negativi nelle reazioni di Realtime PCR dovuti alla presenza di inibitori nell'estratto. Tali campioni saranno eliminati dalla conservazione presso le screen house del CAV.

CAMPIONE	ddPCR PER PLMVd			
	CAV		DISTAL	
	Copie/μL	Risultato	Copie/μL	Risultato
17	0	negativo	0.5	negativo
18	0	negativo	0	negativo
19	0.07	negativo	0.6	negativo
20	0	negativo	0.27	negativo
21	0	negativo	0.53	negativo
22	0	negativo	0.4	negativo
23	0	negativo	0.9	negativo
24	0	negativo	0	negativo
25 (C pos PLMVd)	3535	positivo	816	positivo
26 (Ct=34)	7870	positivo	946	positivo
27	1	negativo	0.08	negativo
28	0.75	negativo	0.14	negativo
29	0.43	negativo	0.3	negativo
30	0.46	negativo	0	negativo
31 (C pos PLMVd)	8650	positivo	1719	positivo
32 (C neg)	0.03	/	0.08	
33	0	negativo	0.07	negativo
34	0.21	negativo	0.08	negativo
35 (C pos PLMVd) Ct=33	0	negativo	0.08	negativo
36 (C pos PLMVd)	54750	positivo	3510	positivo
37 (C pos PLMVd)	10200	positivo	1551	positivo
38 (Ct=35)	55700	positivo	2412	positivo
39 (Ct=36)	1012	positivo	147	positivo
40 (NEG PCR)	0		0	
41 (C pos PLMVd)	4045	positivo	2471	positivo
42 Ct=34	5885	positivo	168	positivo
43	2	negativo	0.24	negativo
44 (C pos PLMVd)	6425	positivo	808	positivo
45	0.09	negativo	0.35	negativo
46	3.4	negativo	0.42	negativo
47	0.52	negativo	0.41	negativo
48 (C neg)	0.4		0.09	
49	0.07	negativo	0.15	negativo
50	0.28	negativo	0.09	negativo
51	0.17	negativo	0	negativo
52	0.06	negativo	0	negativo

53	0.03	negativo	0	negativo
54	0.33	negativo	0	negativo
55	0.035	negativo	0	negativo
56(C neg)	0		nt	/

Tabella 13 - Risultati ottenuti per ciascun campione a seguito dell'analisi ddPCR in termini di numero di copie/ μ L (media del campione in doppio)

Risultati dell'analisi ddPCR per la detection di GPGV:

Un totale di 23 campioni di vite (di cui 2 campioni sicuramente sani e 2 campioni sicuramente infetti) provenienti dal Nucleo di Conservazione di Vite della Regione Emilia Romagna mantenuto presso le screen house del CAV sono stati saggiati utilizzando il protocollo ddPCR individuato per la detection del GPGV nella fase di messa a punto dei metodi. I campioni sono stati saggiati in doppio presso ciascuno dei due laboratori CAV e DISTAL. I risultati del saggio in termini di copie del virus/ μ L di estratto sono riportati in Tabella 14. Complessivamente il saggio ddPCR ha prodotto risultati estremamente puliti (rumore di fondo quasi inesistente in campioni sicuramente sani) e perciò facilmente interpretabili; il valore soglia è risultato molto basso in entrambi i laboratori che hanno effettuato il saggio e tutti i campioni positivi/negativi producono valori rispettivamente molto al di sopra/intorno al valore soglia. Questo risultato, così come per la detection del ESFY, è indice di ottima funzionalità/efficienza/specificità del saggio Realtime che si conferma tale anche quando trasposto in ddPCR.

CAMPIONE	ddPCR PER GPGV			
	CAV		DISTAL	
	Copie/ μ L	Risultato	Copie/ μ L	Risultato
57	0	negativo	0.14	negativo
58	0	negativo	0	negativo
59	0	negativo	0	negativo
60	0.04	negativo	0	negativo
61	0	negativo	0	negativo
62	0.08	negativo	0.08	negativo
63	0.15	negativo	0	negativo
64 (C neg)	0	negativo	0.35	negativo
65	0	negativo	0.14	negativo
66(C pos GPGV)	131	positivo	99.10	positivo
67	0	negativo	0.07	negativo
68	0.04	negativo	0.07	negativo

69	0.04	negativo	0.09	negativo
70	0	negativo	0.15	negativo
71(C pos GPGV)	231	positivo	107.3	positivo
72(C neg)	0	negativo	0.07	negativo
73	0	negativo	0	negativo
74	0.12	negativo	0	negativo
75	0.07	negativo	0	negativo
76	0.03	negativo	0	negativo
77	0	negativo	0.12	negativo
78	0	negativo	0	negativo
79	0.27	negativo	0.29	negativo
80(neg PCR)	0	negativo	0	negativo

Tabella 14 - Risultati del saggio in termini di copie del virus/ μ L di estratto

Prova 3.1.3: fase di produzione, analisi e rilievi presso aziende agricole

3.1.3.1 - Obiettivi

Queste tecniche di diagnostica assoluta messe a punto nelle azioni precedenti del piano, potranno essere utilissime non solo ai vivaisti ma anche agli agricoltori per contrastare la diffusione delle malattie nei frutteti. A tal riguardo è stata condotta una prova su pesco e su vite, per individuare in campo le cosiddette ‘piante serbatoio’, piante che pur non manifestando i sintomi della malattia risultano tuttavia infettate dal patogeno. La loro presenza minaccia il frutteto perché favorisce la diffusione della malattia.

Più in generale l’obiettivo del piano era quello di dotare il vivaismo frutticolo regionale di nuovi e più efficienti strumenti di diagnosi fitopatologica per la ricerca principalmente di patogeni ad alto rischio come virus, viroidi, fitoplasmi, funghi e batteri al fine di assicurare agli agricoltori l’impiego di materiale di migliore qualità, sia per quanto concerne l’aspetto varietale sia, per quanto attiene alle problematiche fitosanitarie.

In tale contesto gli obiettivi specifici che il Piano di innovazione ha voluto perseguire riguardano la produzione di “materiale vivaistico frutticolo certificato volontario italiano” con un maggiore livello di sanità e migliori caratteristiche qualitative rispetto al “materiale certificato volontario europeo”. Il raggiungimento dei suddetti obiettivi si traduce in un allungamento della vita media delle piante in campo con evidenti vantaggi economici per gli agricoltori, sia in termini di produttività, sia di sostenibilità ambientale per la minore necessità di uso di agrofarmaci e apporto di sostanze nutritive.

Inoltre anche la qualità organolettica e l'aspetto esteriore dei frutti risulta superiore rispetto al livello standard.

3.1.3.2 - Materiali e metodi

In collaborazione con il Servizio Fitosanitario Regionale (SFR) sono state individuate aziende agricole in regione presso le quali è stata segnalata la presenza di piante di pesco malate di PLMVd e di piante di vite malate di GPGV. I tecnici del CAV e del SFR si sono recati presso queste aziende e hanno prelevato campioni fogliari dalle piante sintomatiche e da quelle asintomatiche vicino alle piante ammalate.

Nell'Agosto del 2018 il gruppo di tecnici ha campionato presso l'azienda Ceroni di Faenza 15 piante di vite della cultivar Pinot grigio con sintomi sospetti molto evidenti a inizio stagione, quali deformazioni fogliari, scolorimenti nervali e punteggiature delle foglie, ritardo nel germogliamento, accorciamento internodi, aspetto cespuglioso, nanismo mosaico e bollosità, riferibili al virus del pinot grigio (GPGV). Contestualmente sono state campionate 15 piante adiacenti asintomatiche, opportunamente contrassegnate in campo con cartellini identificativi.

Nella stessa giornata tutti i campioni sono stati repentinamente consegnati al laboratorio fitopatologico del CAV per essere analizzati con la tecnica molecolare (PCR) e confrontati con la nuova tecnica ddPCR. A settembre, i tecnici sono tornati nella stessa azienda e hanno proceduto al campionamento di 100 kg di uva da piante asintomatiche e 100 kg di uva da piante con i sintomi. Subito dopo tutto il materiale è stato consegnato al responsabile enologico dell'azienda ASTRA per essere sottoposto alle opportune microvinificazioni (vedere dopo, prova 3.1.4).

Nell'Agosto 2019, presso l'azienda Castagnoli di Traversara di Bagnacavallo i tecnici hanno prelevato 10 campioni di pesco della varietà Zee Lady di cui 8 campioni derivanti da piante con sintomi e 2 campioni da piante senza sintomi. Chiaramente, sintomi ascrivibili al PLMVd (Peach latent mosaic viroid, mosaico latente del pesco). Inoltre presso l'azienda Tamburini di Bagnacavallo sono state campionate e contrassegnate 3 piante della varietà Morsiani 60 delle quali 2 con sintomi di PLMVd e 1 senza sintomi. Tutti i campioni sono stati consegnati rapidamente al laboratorio fitopatologico CAV per essere analizzati con la tecnica molecolare (PCR) e confrontati con la nuova tecnica ddPCR.

Alla fine dello stesso mese di Agosto, gli stessi tecnici hanno proceduto al campionamento di 40 kg di frutta prelevata da piante asintomatiche e 40 kg di frutta prelevate da piante con i sintomi, da entrambe le varietà di pesco. Subito dopo tutto il materiale è stato consegnato al responsabile delle

analisi sensoriali dell'azienda ASTRA per essere sottoposti a uno studio organolettico e chimico (vedere dopo, prova 3.1.4).

3.1.3.3 - Risultati e discussione

Per quanto riguarda la vite i risultati delle analisi di laboratorio effettuati con la tecnica ddPCR hanno confermato quelli derivanti dalla tecnica convenzionale Real time PCR: i campioni sintomatici di vite sono risultati positivi al GPGV, quelli asintomatici sono risultati negativi.

Anche nel caso del pesco i risultati delle analisi di laboratorio effettuati con la tecnica ddPCR hanno confermato quelli della tecnica convenzionale Realtime PCR: in questo caso però tutti i campioni, sintomatici e asintomatici, sono risultati positivi al PLMVd. Dunque, le analisi hanno chiaramente confermato la presenza del viroide nelle piante sintomatiche, come atteso, ma anche su piante visivamente senza sintomi. Queste ultime piante, cosiddette "serbatoio", dovranno essere estirpate in quanto favoriscono la diffusione della malattia nel frutteto essendo dimostrato che la principale modalità di trasmissione del viroide da una pianta malata a una sana nei frutteti commerciali è quella dei tagli da potatura.

Sulle stesse piante di pesco, con e senza sintomi, è stato inoltre rilevato che:

- Percentuale di frutti non commercializzabili: nessuna differenza significativa tra le due tesi in quanto l'agricoltore staccava a frutto non ancora maturo e consegnava tutta la produzione alla cooperativa;
- Calo produttivo significativo legato alla minore pezzatura dei frutti sulle piante sintomatiche (meno 30% in Zee Lady, da 217 grammi si passa a 146 grammi).
- In generale le piante sintomatiche mostravano frutti di qualità e pezzatura scadente.

Le figure sottostanti mostrano frutti della varietà Zee Lady campionati nell'estate 2019 da piante asintomatiche (A) e da piante con evidenti sintomi del viroide (B): fenditure trasversali sulla sutura, decolorazione dell'epidermide con macchie circolari giallo-verdi, malformazioni. La figura C mostra un frutto su pianta con evidenti fenditure trasversali sulla sutura, tipiche del mosaico latente.

A



B



C



3.1.3.4 - Conclusioni

I risultati hanno evidenziato l'affidabilità della nuova tecnica ddPCR per la ricerca di patogeni che causano gravi malattie anche nella fase di produzione frutticola cioè quando applicata presso le aziende agricole. L'elevata concentrazione dei patogeni sulle piante oggetto di saggio non ha permesso di verificare la sensibilità analitica del nuovo saggio ma solamente di confermarne la specificità.

Alla luce dei risultati ottenuti possiamo dire che quando nei pescheti si osservano sintomi di mosaico latente, la tecnica ddPCR potrà essere applicata in prima battuta per confermare la diagnosi visiva della malattia (è o non è mosaico latente?), in seconda battuta per capire se le piante asintomatiche nelle vicinanze di quelle malate siano anch'esse già state infettate dal viroide. In tal caso, anche le piante 'serbatoio' (asintomatiche) dovranno essere abbattute se si vuole realmente rallentare la progressione della malattia nel frutteto.

Prova 3.1.4: Fase di trasformazione: analisi sensoriali su campioni di frutta e vino (Tura - Cardoni)

3.1.4.1 - Obiettivi

L'obiettivo di questa fase era valutare il deprezzamento dei campioni di frutta e vino a causa delle malattie (PLMVd e GPGV) oggetto dello studio. Inoltre, rilevare il calo produttivo e l'aumento della percentuale di frutti non commercializzabili nelle piante affette da PLMVd. Infine, rilevare una differenza organolettica nella produzione di vino prodotto da uve provenienti da piante infette da GPGV.

3.1.4.2 -Materiali e metodi

Nel corso dell'estate 2018 nel vigneto di Pinot Grigio nel quale venivano segnalate piante affette da GPGV si era proceduto a campionare circa 1 quintale di uva da piante ammalate e 1 quintale da piante sane. I due campioni sono poi stati avviati alla microvinificazione, completatasi a inizi 2019. A febbraio

2019 le due microvinificazioni sono state sottoposte alle analisi chimiche e sensoriali al fine di verificare se la presenza della malattia GPGV potesse peggiorare la qualità dei vini prodotti. Le analisi sensoriali (test triangolare e test di preferenza) sono state condotte il 14 febbraio 2019 presso il laboratorio ASTRA, coinvolgendo tra i giudici anche tutto il personale del laboratorio CAV.

Nell'estate 2019 i campioni di pesco delle varietà Zee Lady e Morsiani 60 provenienti dalla prova 3.1.3 con e senza sintomi di mosaico latente sono stati consegnati al laboratorio ASTRA per le successive analisi chimiche, fisiche e sensoriali previste nel progetto, che vengono dettagliate nel paragrafo successivo. Le analisi sono state eseguite con il coinvolgimento dei tecnici del CAV.

3.1.4.3 - Risultati e discussione

In riferimento alle analisi sensoriali e chimiche condotte sui vini provenienti da uve prodotte da piante sintomatiche e asintomatiche risulta che i due campioni non sono risultati statisticamente differenti. Infatti solo 10 giudici dei 28 convocati hanno correttamente individuato il campione diverso nei test triangolari presentati, il numero di risposte corrette è risultato pertanto insufficiente per discriminare dal punto di vista statistico i due campioni a confronto. I giudici non hanno rilevato differenze significative fra i due vini ed entrambe le tesi non hanno evidenziato odori o sapori anomali o non tipici. I due campioni non sono risultati statisticamente differenti anche al giudizio edonistico (test di gradevolezza) con 14 preferenze per la tesi T1 sana e 13 preferenze per la tesi 2 malata.

Di seguito i dettagli della valutazione dei campioni in esame fornita dal panel di assaggio:

- Tesi 1 (vinificazione da piante sane):
caratteristiche visive: colore giallognolo di media intensità con su tono.
caratteristiche olfattive: buon odore tipico con note fruttate e note erbacee, senza anomalie gusto/olfattive.
caratteristiche gustative: gusto acidulo e sapido, buon aroma, media struttura, equilibrato.
- Tesi 2 (vinificazione da piante malate):
caratteristiche visive: colore giallognolo di media intensità con su tono.
caratteristiche olfattive: buon odore tipico con note fruttate e note erbacee, senza anomalie gusto/olfattive.
caratteristiche gustative: gusto acidulo e sapido, buon aroma, media struttura, equilibrato.

In riferimento alle analisi chimiche, fisiche e sensoriali dei frutti delle 2 varietà di pesco oggetto di studio, riportiamo di seguito i risultati ottenuti.

Analisi condotte sui frutti di Zee Lady (data di raccolta, 7/08/2019)

Parametri fisici Zee Lady con sintomi

varietà	Zee Lady
tipologia	pesca gialla
coltivazione	con sintomi PLMVD
provenienza	Tebano (RA)
peso medio g	146,6
calibro	66,7
durezza kg/0,5 cm ² *	4,02
colore L*	43,7
colore a*	20,46
colore b*	18,05
RSR %	12,0
acidità meq/100 g	12,73
acidità % ac. citrico	0,81
pH	3,77

Aspetto dei frutti Zee Lady con sintomi



Tabella 15 - dati medi dell'intero campione con sintomi

I 3 subcampioni di frutti che compongono il campione "con sintomi" sono risultati essere molto disomogenei fra subcampione e all'interno del subcampione. In particolare la pianta 1 della fila 1 ha evidenziato elevata disomogeneità nel calibro dei frutti (min 58, max 73), ed elevato colore verde di fondo e poco sovracolorabile variabile da 10 a 50% (raccolti troppo acerbi). I sintomi di mosaico latente apparivano poco evidenti. La pianta 41 della fila 1 ha evidenziato un sovracolorabile variabile dal 20 all'80% e si vedevano bene i sintomi della malattia su quasi tutti i frutti con depigmentazione del sovracolorabile. Anche in questo caso i frutti erano molto disomogenei per calibro (min 58 e max 78) e raccolti molto acerbi. La pianta 41 della fila 2 aveva un aspetto più sovracolorabile (dal 70 al 95%) e calibro variabile da 56 a 78 mm. I frutti essendo molto acerbi, sono stati lasciati a temperatura ambiente per 7 giorni per favorire la maturazione. Nella tabella 15 vengono evidenziati i dati medi dell'intero campione eseguiti su tutti i frutti per quanto riguarda peso, calibro e sovracolorabile rosso. La durezza, Brix e acidità sono invece riferiti ai soli frutti che sono stati utilizzati per eseguire la degustazione dopo 7 giorni di maturazione. Tali frutti erano circa 12 scelti fra i più grandi e con durezza media di 4.0 kg. In particolare sono stati eliminati i frutti molto piccoli e molto acerbi.

Parametri fisici Zee Lady senza sintomi

varietà	Zee Lady
tipologia	pesca gialla
coltivazione	senza sintomi di PLMVD
provenienza	Tebano (RA)
peso medio g	217,3
calibro	77,6
durezza kg/0,5 cm ² *	2,40
colore L*	37,2
colore a*	21,84
colore b*	12,40
RSR %	12,4
acidità meq/100 g	12,76
acidità % ac. citrico	0,82
pH	3,74

Aspetto dei frutti Zee Lady senza sintomi



Tabella 16 – dati analitici del campione senza sintomi

Il campione "senza sintomi" era composto da 2 subcampioni di 16 frutti ciascuno provenienti della pianta 3 e della pianta 5 della fila 1. In entrambi i campioni i frutti risultavano abbastanza omogenei per calibro (min 67 e max 84 mm) ed anche come sovracolorazione (da 7 a 90%). Il campione "senza sintomi" ha evidenziato un calibro medio più elevato, 77,6 mm contro 66,7 del campione "con sintomi". Brix, acidità e pH erano molto simili nei due campioni. La durezza della polpa era più elevata nel campione "con sintomi" (4,02 kg) contro 2,4 kg del campione "senza sintomi" (tab. 16)

La prova di degustazione è stata eseguita il 14 Agosto 2019 con un test triangolare su frutti tagliati a fette e sbucciati per non rendere visibile la buccia. La degustazione è stata eseguita da 18 giudici, tra cui tutti i tecnici del laboratorio CAV. 10 degustatori su 18 hanno individuato correttamente il campione diverso quindi il test è risultato significativo con un livello di probabilità di $p=0,05$. Al test di gradimento 7 degustatori hanno preferito il campione "senza sintomi" e 11 hanno preferito il "campione con sintomi". Il test di gradimento pertanto non è risultato significativo. In particolare i campioni sono stati descritti come segue:

- "Senza sintomi": polpa più tenera e più succosa con molta variabilità, gusto dolce e acidulo, lieve retrogusto amarognolo, di buon aroma tipico.
- "con sintomi": polpa più consistente e più croccante, meno succosa e con molta variabilità, gusto dolce e acidulo, lieve retrogusto amarognolo, di aroma leggermente più acerbo.

Le diversità sono quindi da imputare al diverso livello di maturazione più che ad altri parametri.

Analisi condotte sui frutti di Morsiani 60 (data di raccolta, 12/08/2019)

Parametri fisici Morsiani 60 con sintomi

varietà	Morsiani 60
tipologia	nettarina gialla
coltivazione	con sintomi
provenienza	Tebano (RA)
peso medio g	193,5
calibro	73,2
durezza kg/0,5 cm ² *	5,65
colore L*	36,7
colore a*	29,26
colore b*	14,86
RSR %	9,8
acidità meq/100 g	13,39
acidità % ac. citrico	0,86
pH	3,60

Aspetto dei frutti Morsiani 60 con sintomi



Tabella 17 dati analitici del campione con sintomi

Il campione "con sintomi" era costituito da 12 frutti della pianta 12 fila 1 e d a 11 frutti della pianta 11 fila 2. Entrambe le provenienze presentavano frutti raccolti con la presenza di colore di fondo ancora molto verde quindi acerbi. I frutti sono stati conservati a temperatura ambiente per 9 giorni per favorirne la maturazione. Come si evince dai dati della durezza, anche dopo 9 giorni la polpa si presentava ancora molto dura (5,65 kg dato medio con variabilità da 2,25 a 8,08 kg). Il Brix era molto basso (tab. 17).

Parametri fisici Morsiani 60 senza sintomi

varietà	Morsiani 60
tipologia	nettarina gialla
coltivazione	senza sintomi
provenienza	Tebano (RA)
peso medio g	182,4
calibro	71,5
durezza kg/0,5 cm ² *	4,90
colore L*	37,1
colore a*	31,10
colore b*	15,74
RSR %	9,6
acidità meq/100 g	13,64
acidità % ac. citrico	0,87
pH	3,54

Aspetto dei frutti Morsiani 60 senza sintomi



Tabella 18 – dati analitici del campione senza sintomi

Il campione "senza sintomi" era composto da 11 frutti di cui due piccoli e verdi che sono stati eliminati. Anche gli altri frutti sono stati raccolti con la presenza di colore di fondo ancora troppo elevata quindi acerbi. I frutti sono stati conservati a temperatura ambiente per 9 giorni per favorirne la maturazione. La durezza media della polpa dopo 9 giorni era di 4,9 kg (con variabilità da 3,45 a 7,44 kg). Nella tabella 18 sono evidenti i dati medi dell'intero campione eseguiti su tutti i frutti per quanto riguarda peso, calibro e sovracoloro rosso. La durezza, brix e acidità sono riferiti ai frutti dopo una conservazione di 9 giorni. Tutti i frutti sono stati utilizzati per la degustazione. Il brix risultava simile e molto basso per entrambi i campioni, malati e sani. Questo confermava che erano stati raccolti immaturi. L'acidità risultava simile in entrambi i campioni.

La prova di degustazione è stata eseguita il 21 Agosto 2019 con un test triangolare su frutti tagliati a fette e sbucciati per non rendere visibile la buccia. La degustazione è stata eseguita da 18 giudici, tra cui numerosi tecnici del CAV. 12 degustatori su 18 hanno individuato correttamente il campione diverso quindi il test è risultato significativo con un livello di probabilità di $p=0,05$. Al test di gradimento 15 degustatori hanno preferito il campione "senza sintomi" e 5 hanno preferito il "campione con sintomi". Il test di gradimento pertanto è risultato significativo per $p=0,01$. In particolare i campioni sono stati descritti come segue:

- "Senza sintomi": polpa croccante e soda ma leggermente più tenera rispetto all'altro campione, gusto poco dolce e acido, retrogusto amarognolo, aroma erbaceo e poco maturo.
- "con sintomi": polpa molto dura e molto croccante, acerba ed asciutta, gusto poco dolce e acido, retrogusto molto amaro, aroma non gradevole.

Entrambi i campioni non esprimevano le caratteristiche sensoriali tipiche della varietà perché i campioni erano stati raccolti leggermente acerbi e non avevano sviluppato gli aromi tipici. Le diversità rilevate sono probabilmente da imputare al diverso livello di maturazione più che ad altri parametri.

3.1.4.4 - Conclusioni

La Fase di trasformazione sui campioni di vino e frutta saggiati ha evidenziato che nel caso del vino non ci sono state differenze significative tra quello prodotto da uve malate e quello proveniente da uve sane.

Invece nel caso della frutta ci sono state differenze significative tra quella derivante da piante malate e quelle provenienti da piante sane. Prendiamo il caso di Zee Lady, le piante malate mostrano un calo produttivo evidente legato alla minore pezzatura dei frutti (146 grammi contro i 217 grammi nelle piante sane), frutti spesso deformi, più piccoli e di calibro variabile, più acerbi e duri. Alla prova di

degustazione, il test triangolare ha mostrato differenze significative tra la tesi sana e quella malata, differenze però principalmente attribuibili a un differente livello di maturazione dei campioni di frutta a confronto. Prima considerazione sui risultati ottenuti: ci siamo resi conto di quanto non sia trascurabile questa malattia. Essa causa danni notevoli in campagna, con un evidente deprezzamento delle produzioni a livello qualitativo e quantitativo. Vero è anche che si tratta di una malattia spesso presente allo stato latente, quindi il più delle volte la pianta malata non manifesta i sintomi. Ciò è uno svantaggio perché come visto nella sperimentazione, in campo avremo numerose piante asintomatiche serbatoio. Seconda considerazione: la cattiva abitudine degli agricoltori di raccogliere i frutti non ancora maturi, certo migliorano le performance di shelf life, ma l'aspetto gustativo del prodotto è decisamente penalizzato.

CONCLUSIONI FINALI

Le conclusioni finali vengono ampiamente trattate al capitolo 5: considerazioni finali.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate.

Gli obiettivi del Piano sono stati raggiunti.

Attività ancora da realizzare:

Nessuna

COSTI AZIONE 3

A) PERSONALE

- *Personale dipendente: Unità Operativa CAV*

Cognome e Nome	Tipo contratto	Ore	Importo (Euro)
	dirigente	255	15.633,31
	tecnico	734	25.809,24
	tecnico	680	16.642,68
	tecnico	629	13.269,73
	tecnico	484	14.929,56
TOTALE PERSONALE (A)			86.284,52

Trasferte

Cognome e Nome	Descrizione	Importo (Euro)
	Trasferte da sede CAV a sedi di svolgimento prove, riunioni per stati avanzamento	170,82

	Trasferte da sede CAV a sedi di svolgimento prove, riunioni per stati avanzamento	71,82
	Trasferte da sede CAV a sedi di svolgimento prove, riunioni per stati avanzamento	188,80
	Trasferte da sede CAV a sedi di svolgimento prove, riunioni per stati avanzamento	242,80
	Trasferte da sede CAV a sedi di svolgimento prove, riunioni per stati avanzamento	0
TOTALE TRASFERTE (B)		674,24

B) REALIZZAZIONE

- *Materiale consumabile*

Fornitore	descrizione	quantità	importo
BIORAD	plastiche e reagenti per ddPCR		13.000,00
TOTALE (C)			13.000,00

- *Spese per Materiale durevole e attrezzature*

Fornitore	descrizione	quantità	importo
BIORAD	Strumento di laboratorio: Digital Droplet PCR della Biorad	1	14.128,33
Life technologies Italia	Strumento di laboratorio: Proflex 3 x 32 well PCR	1	1.463,52
TOTALE (D)			€ 15.591,85

- *Collaborazioni, consulenze, altri servizi: Unità Operativa UNIBO*

Fornitore	descrizione	quantità	importo
UNIBO	Supporto alle attività di laboratorio e messa a punto dei protocolli di analisi	1	10.000,00
TOTALE (E)			€ 10.000,00

TOTALE COSTO AZIONE 3

PERSONALE (A)	Importo (Euro)
a) <i>Personale dip.</i>	86.284,52
b) <i>Trasferte</i>	674,24
Totale (A)	€ 86.973,76
REALIZZAZIONE (B)	
• <i>Materiale consumabile</i>	13.000,00
• <i>Materiale durevole e attrezzature</i>	15.591,85
• <i>Collaborazioni, consulenze, altri servizi</i>	10.000,00
Totale (B)	€ 38.591,85
TOTALE (A+B)	€ 125.550,61

2.3 - AZIONE 4 – Piano di divulgazione di trasferimento dei risultati e implementazione della rete pei

2.3.1 Attività e risultati

Azione
Azione 4 - DIVULGAZIONE
Unità aziendale responsabile (Uar)
CRPV
Descrizione attività

La divulgazione dell'innovazione alle imprese agricole e operatori del settore frutticolo e vitivinicolo, costituisce un'azione fondamentale del Piano. Il CRPV, su incarico del CAV, ha attivato il proprio personale per sviluppare questa attività sin dalle prime fasi del progetto.

Uno degli obiettivi di questa azione è stato quello di concretizzare un efficace collegamento funzionale *multi actor* tra innovazione, trasferimento e applicazione, e stimolare lo sviluppo e applicazione dell'innovazione lungo la filiera. La fase di divulgazione ha, pertanto, perseguito l'obiettivo di diffondere le informazioni-innovazioni valutate nel corso del Piano, non solo ai membri delle Unità Operative, ma a una più ampia gamma di *stakeholders* del settore agricolo. Il CRPV ha messo a disposizione delle Unità Operative un indirizzario che conta migliaia utenti, una mailing list di oltre 1.500 indirizzi, un portale che conta circa 10.000 visitatori all'anno oltre a considerare che già la sua base sociale contribuisce nel suo complesso a produrre circa il 60% della PLV vegetale regionale.

Come preventivato nel Progetto, il Piano di Comunicazione è stato sviluppato dall'operato del personale CRPV in collaborazione con la struttura del Beneficiario (CAV), al fine di sviluppare una "Comunicazione sostenibile", ossia organizzare iniziative utili a mostrare i risultati via via raggiunti dalle attività del progetto e sistemi di divulgazione logisticamente tali da limitare quanto più possibile gli spostamenti degli utenti, pur garantendo una visibilità massima delle innovazioni che meritavano evidenza sin dalle prime fasi di sviluppo del Piano.

In accordo con i responsabili delle Unità Operative, il personale CRPV ha, quindi, organizzato e gestito le seguenti iniziative e azioni di diffusione:

In totale, sono stati realizzati: **1 visita guidata presso il laboratorio del CAV, 1 incontro tecnico, 2 articoli tecnici** (vedasi Allegato Azione 4). Le iniziative svolte hanno visto la partecipazione di numerosi *stakeholders*.

Tutte le iniziative realizzate hanno rappresentato anche momenti di discussione e confronto sul tema oggetto dell'evento, permettendo, così, un utile scambio di esperienze e risposte a vantaggio di tutti i partecipanti e delle Unità Operative stesse.

Inoltre il CRPV ha messo a disposizione delle Unità Operative il proprio **Portale Internet**, affinché le attività e i risultati conseguiti nel presente Piano siano facilmente identificabili e fruibili dall'utenza. All'interno del portale CRPV è stata individuata una pagina dedicata al Piano, composta da una testata e da un dettaglio dove sono stati caricati tutti i dati essenziali del progetto e gli aggiornamenti relativi alle attività condotte. Inoltre, attraverso un contatto continuo con il Responsabile del Piano, un referente CRPV ha proceduto all'aggiornamento della pagina con notizie, informazioni e materiale divulgativo ottenuti durante lo sviluppo del Piano. Questo lavoro ha contribuito, unitamente alla pubblicazione dei risultati, alla consultazione dell'elenco dei Piani coordinati da CRPV, e a permettere una maggior diffusione delle informazioni e trasferimento dei risultati raggiunti. Questo strumento comunicativo e divulgativo consente altresì di poter visionare collegamenti e sinergie che il presente Piano ha anche con altri progetti e/o iniziative.

Come indicato nell'Azione 1, il personale CRPV si è fatto inoltre carico di predisporre in lingua italiana e inglese, le modulistiche richieste per la presentazione del Piano al fine del collegamento alla Rete PEI-Agri.

Tabella – Descrizione delle iniziative di divulgazione svolte.

Visite guidate		Incontri Tecnici		Pubblicazioni	
Data	Titolo (Provincia) (n. presenze)	Data	Titolo (Provincia) (n. presenze)	Data	Titolo (Rivista)
28/11/2018	<i>“Presentazione del nuovo strumento (Droplet Digital PCR System) di diagnosi fitopatologica per il rilevamento di virus, viroidi e fitoplasmi nei fruttiferi”.</i> (RAVENNA) (n. 26)	10/05/2019	<i>“Presentazione del nuovo strumento (Droplet Digital PCR System) di diagnosi fitopatologica per il rilevamento di virus, viroidi e fitoplasmi nei fruttiferi”.</i> (RAVENNA) (n. 19)	n. 05 - 2019	<i>“Vivaismo, aspetti fitosanitari e strategie di prevenzione”.</i> (FRUTTICOLTURA)
				n. 10 - 2019	<i>“Più controlli fitopatologici e diagnostica innovativa nella filiera”.</i> (FRUTTICOLTURA)
Tot = 1		Tot = 1		Tot = 2	

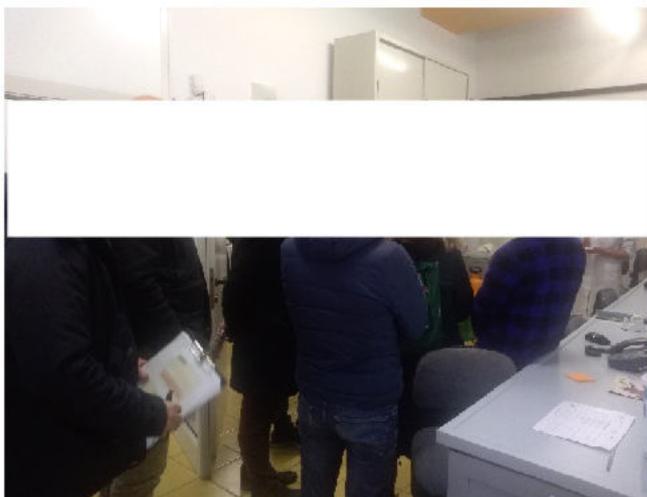


Foto - Visita guidata



Foto – Incontro tecnico

COSTI Azione 4

Realizzazione

C) CONSULENZE

- *Collaborazioni, consulenze, altri servizi: Unità Operativa CRPV*

Ragione sociale della società di consulenza	Referente	Importo contratto	Attività realizzata	costo totale (€)
C.R.P.V. SOC. COOP.		€ 10.000,00	Come da preventivo e da contratto approvato	€ 4.000,00
TOTALE CONSULENZE				€ 4.000,00

PERSONALE (A)	Importo (Euro)
<i>a) Personale dip.</i>	0
<i>b) Trasmerte</i>	0
Totale (A)	0
REALIZZAZIONE (B)	
<i>c) Collaborazioni, consulenze, altri servizi</i>	4.000,00
Totale (B)	€ 4.000,00
TOTALE (A+B)	€ 4.000,00

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate.

Gli obiettivi del progetto in merito alla formazione sono stati pienamente raggiunti e con alto grado di gradimento da parte degli utenti finali.

Attività ancora da realizzare:

Nessuna.

Capitolo 3 - CRITICITÀ INCONTRATE DURANTE LA REALIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ

Criticità tecnico- scientifiche	Non si rilevano criticità significative nello svolgimento del Piano.
Criticità gestionali (ad es. difficoltà con i fornitori, nel reperimento delle risorse umane, ecc.)	Non si rilevano criticità nella gestione del piano.
Criticità finanziarie	Non si rilevano criticità finanziarie.

Capitolo 4 - ALTRE INFORMAZIONI

Nessuna altra informazione viene integrata.

Capitolo 5 - CONSIDERAZIONI FINALI

L'attività realizzata nel Piano d'innovazione è stata foriera di risultati e molto proficua per le attività diagnostiche sia del CAV che del DISTAL. Siamo riusciti a implementare correttamente tutti e quattro i protocolli digital droplet che ci si prefiggeva di sviluppare. Dunque disponiamo già da ora della tecnologia più innovativa (e sensibile) per la diagnosi di Sharka, mosaico latente e fitoplasmi nelle drupacee e del virus del pinot grigio nella vite. Si tratta di un risultato importante; infatti stiamo parlando di malattie che causano danni ingenti al comparto della frutticoltura e della viticoltura. Basti pensare che nel 2015 è stato siglato un accordo tra tutti i vivaisti e le organizzazioni dei produttori della nostra Regione per contrastare insieme la diffusione di 3 malattie, due di queste appunto erano PPV e ESFY! Il mosaico latente non rientrava nell'accordo OP – vivaisti ma è attualissimo, infatti dal 2017 è normato a livello europeo sia per il materiale vivaistico CAC sia per il materiale vivaistico certificato europeo, quindi è diventato un patogeno di interesse comunitario (prima veniva attenzionato solo nell'ambito delle produzioni vivaistiche certificate nazionale). Anche il GPGV della vite è di primaria importanza, virus recentemente comparso in Veneto nelle zone dove si produce Pinot, ma che si sta diffondendo anche in Emilia – Romagna.

Un aspetto importante è quello relativo all'interpretazione dei risultati. Il test digital (ddPCR) non lascia dubbi per la ricerca di ESFY e GPGV, sempre i controlli negativi non hanno dato nessun segnale di amplificazione e i controlli positivi hanno dato abbondanti segnali di amplificazione. In questi casi non esiste la necessità di interpretazione del dato analitico, o è positivo certo oppure negativo certo.

Diverso è il discorso del test digital sviluppato per PLMVd e PPV, in questi casi infatti i controlli negativi (assenza della malattia) non sono risultati completamente negativi al test. Alcune goccioline della emulsione di amplificazione mostrano segnale positivo, parliamo chiaramente di pochissimi segnali, al di sotto delle 10 goccioline sulle circa 24.000 complessivamente analizzate. Come comportarsi in questi casi?

La prima considerazione è che non siamo i soli ad avere riscontrato questa casistica, altri gruppi di ricerca, non solo nel settore della patologia vegetale ma anche in quella umana, si sono posti il problema di inserire una soglia, intesa come numero di goccioline positive al test al di sotto della quale il campione venga dato come negativo, al di sopra come positivo. Pensiamo, a nostro parere, che sia fondamentale inserire un paio di controlli negativi (piante sicuramente sane, ad esempio ottenute da seme nel caso dei virus) ogni volta che si esegue un test in digital al fine di definire tale soglia di volta in volta che si eseguono le analisi: tutti i campioni incogniti con segnale al di sotto dei controlli negativi verranno considerati negativi al test, quindi esenti dalla malattia indagata.

La seconda considerazione è stata fatta in merito al protocollo di amplificazione del PLMVd, per il quale servirà un nuovo disegno di primer e sonde che siano più specifiche di quelle attualmente impiegate. Abbiamo avviato a questo proposito una collaborazione con il CREA DC di Roma per ottimizzare il protocollo digital del viroide, contiamo di presentare i risultati del nuovo test al convegno internazionale di virologia che si terrà a giugno in Olanda.

Nel progetto si auspicava anche all'estensione della tecnica digital ad altre problematiche fitosanitarie. Bene, nel corso del 2019 / inizi 2020, nei vivai di fragola presenti nella nostra Regione si è avuta una forte presenza di piante attaccate dal batterio *Xanthomonas fragariae*. Questo batterio non è più da quarantena, ma viene classificato come organismo regolamentato non da quarantena, la cui presenza deve essere molto contenuta in vivaio in quanto causa ingenti danni nella successiva fase produttiva. La filiera vivaistica della fragola è quasi tutta certificata, prevede 4 successive fasi di moltiplicazione che iniziano al CAV (CCP, CP1 e CP2) per passare ai vivai certificati, i numeri sono impressionanti, circa 300 milioni di piantine prodotte e vendute dai nostri vivaisti. *Xanthomonas* è un patogeno vascolare, se la pianta di partenza è ammalata, lo sono tutte le piante da essa derivate per propagazione agamica. Noi controlliamo le piante nel CCP e nei CP1 e CP2 annualmente applicando il protocollo ufficiale basato sulla PCR Real Time, qualche pianta infetta allo stato latente potrebbe sfuggire alla maglia dei controlli. Su suggerimento del Servizio Fitosanitario Regionale abbiamo trasferito i protocolli Real Time in Digital, così facendo abbiamo enormemente aumentato la sensibilità dei test e visto che un paio di campioni – sui 300 test eseguiti annualmente – hanno dato

segnale debole in digital a indicare la presenza di una contaminazione latente del batterio. Questo ha comportato l'eliminazione di un paio di piante dal nostro CCP, risultato molto importante perché la "pulizia" è un processo che deve partire a monte, nelle prime fasi di moltiplicazione. Confidiamo che abbinando la digital all'adozione di buone pratiche di contrasto della malattia in vivaio, la problematica della batteriosi della fragola possa rientrare entro i limiti accettabili di convivenza.

Nel corso della sperimentazione abbiamo inoltre validato un procedimento per rendere più sensibili le tecniche diagnostiche in senso lato. Nel test ESFY per aumentare la concentrazione del DNA target abbiamo sperimentato l'arricchimento del DNA tramite retrotrascrizione dell'RNA. Per il CAV è una novità assoluta, indubbiamente aumenta la sensibilità del saggio, in Real Time PCR infatti abbiamo guadagnato ben 3 ct.

Anche l'analisi dei costi ha giocato un ruolo non secondario nella scelta del metodo digital da impiegare in routine, laddove i reagenti della ditta Invitrogen davano risultati simili alla Biorad, abbiamo optato per i primi, essendo più economici.

Quando siamo passati dalla fase di messa a punto alla fase di analisi delle piante presenti al CAV (fonti candidate e piante in conservazione) tutti e quattro i test hanno funzionato bene. Le analisi sono state eseguite in doppio; in parallelo lo stesso campione è stato testato al CAV e al DISTAL. Complessivamente sono state realizzate circa 600 amplificazioni, in linea con gli obiettivi del progetto. In particolare il test GPGV è stato applicato a 23 vitigni in conservazione al CAV presso il nucleo di premoltiplicazione della regione Emilia Romagna. Non nascondiamo l'apprensione nell'eseguire il test su questo materiale che riveste un valore immenso per la nostra Regione, il timore che qualche vitigno potesse essere positivo al virus. Fortunatamente tutti e 23 i campioni saggiati sono risultati negativi, confermando il dato precedente della Real Time PCR. Nel caso delle analisi condotte sulle fonti candidate di drupacee, semaforo verde su PPV e Esfy, mentre 3 fonti candidate di pesco sono risultate positive al mosaico latente. Questi tre campioni verranno eliminati dalle pre-screen del CAV. Le fonti candidate a entrare nel "Sistema nazionale volontario di qualificazione del materiale di propagazione vegetale" (DM 19 marzo 2019) vengono conservate al CAV in ambiente totalmente isolato dall'esterno (pre-screen) fino al termine dei controlli fitosanitari. Le metodologie diagnostiche indicate nei disciplinari di certificazione comprendono al momento i saggi biologici su indicatori arborei e/o erbacei (indexaggio), i saggi sierologici (Elisa) e, infine, i test molecolari (PCR e Realtime PCR). Chiaramente, nessuno di questi saggi raggiunge la sensibilità della Digital Droplet PCR. La nostra intenzione è dunque quella di applicare anche questa tecnica sulle fonti candidate, in particolare per rilevare quei patogeni che possono essere presenti allo stato latente nelle piante, ovvero a

concentrazioni bassissime. CAV partecipa attivamente ai tavoli di lavoro ministeriali per la revisione dei protocolli di certificazione, assieme a CIVI Italia stiamo già perorando la necessità di aggiornare questi protocolli e di inserire la digital tra le tecniche ufficialmente riconosciute nei saggi sulle fonti candidate.

Vorremmo inoltre mettere in evidenza un ulteriore ambito applicativo della tecnica digital droplet, quella della selezione nei programmi di miglioramento genetico. Questo aspetto non è stato trattato nel presente progetto, tuttavia il metodo ddPCR messo a punto nel nostro progetto è stato applicato in altre sperimentazioni. Da oltre 15 anni, a Cesena, in un'apposita "struttura confinata" (serra chiusa da reti anti-insetto), sono attivi programmi di sperimentazione per la valutazione della sensibilità/tolleranza/resistenza al virus della Sharka di varietà di pesco, susino e albicocco, finanziati dalla Regione Emilia-Romagna ad ASTRA-CRPV. Sono state individuate diverse varietà e selezioni di albicocco che, infettate artificialmente con PPV, non hanno manifestato sintomi specifici di questo virus, ne risultanze positive per la presenza dello stesso, quando analizzati con le correnti diagnostiche, cioè metodi sierologici (Elisa) e molecolari (RT-PCR). Nel contempo, i ricercatori impegnati nel progetto di breeding Maspes, che prevede l'impiego di marcatori molecolari a supporto dei programmi di miglioramento genetico, hanno confermato la presenza, in alcune delle varietà che dalla sperimentazione sopra descritta risultavano almeno parzialmente resistenti, di 2 geni associabili alla resistenza a PPV. Si è perciò ritenuto necessario confermare il comportamento di queste varietà e selezioni di albicocco, applicando la tecnica diagnostica molecolare ad oggi ritenuta fra le più sensibili, cioè la ddPCR. In particolare, con la nuova metodologia si è potuto verificare, nelle piante inoculate con PPV, appartenenti a varietà sensibili e a varietà ritenute resistenti, sia la presenza del virus immesso attraverso l'inoculo artificiale, sia la sua capacità di moltiplicarsi nell'ospite. I risultati ottenuti hanno confermato che nelle varietà e selezioni che risultavano resistenti il sistema diagnostico ddPCR rileva un numero molto basso, di appena qualche decina di copie, del virus. Nelle varietà suscettibili a Sharka questo sistema rileva un numero altissimo di copie virali, fino ad alcune decine di migliaia.

5.1 - Prodotti e Indicatori di risultato

Tutti gli indicatori di risultato a suo tempo indicati in fase di stesura del progetto sono stati raggiunti, talvolta superati:

- Data point digital droplet PCR nella fase di messa a punto: circa 300;
- Data point digital droplet PCR nella fase di controllo fonti – conservazione: circa 600;

- 4 protocolli messi a punto e operativi: PPV, PLMVd, ESFY e GPGV;
- 1 protocollo aggiuntivo messo a punto e operativo: *Xanthomonas fragariae* su fragola;
- Organizzata una visita guidata al laboratorio CAV per illustrare la nuova strumentazione;
- Organizzato un incontro tecnico per divulgare le attività progettuali;
- 2 articoli scientifici pubblicati sulla Rivista di Frutticoltura nel corso del 2019.

5.2 - Ricadute sui partecipanti all'accordo di filiera

I partecipanti all'accordo di filiera sono le principali aziende vivaistiche regionali per produzione di piante drupacee, tutte trarranno benefici dalla presente sperimentazione. A conclusione del progetto ci sentiamo di confermare infatti tutte le ricadute positive sui partecipanti che furono indicate in fase di presentazione della misura 16.02.

Il progetto consente già ora al CAV, e alle aziende partecipanti all'accordo di filiera, di utilizzare strumenti all'avanguardia (dd PCR e ProFlex PCR) per la diagnostica fitopatologica aumentandone la competitività rispetto alle altre aziende del settore nazionali ed estere.

Elenco Allegati:

- *Allegato azione 1*
- *Allegato azione 4*

Data *14/05/20*