

PROGETTI DI FILIERA -FORMAT SCHEDA 16.2.01 – SALDO PIANO D'INNOVAZIONE

TITOLO: INNOVAZIONE, EFFICIENZA E COMPETITIVITÀ DEL VIVAISMO FRUTTICOLO DELLA REGIONE EMILIA ROMAGNA

TITOLO: INNOVATION, EFFICIENCY AND COMPETITIVENESS OF THE FRUIT TREE NURSERY SECTOR OF THE EMILIA ROMAGNA REGION

EDITOR: **Giovanni Nigro - CRPV**

RESPONSABILE ORGANIZZATIVO:

Il responsabile della stesura del progetto e del coordinamento delle attività

Nome **Giovanni** Cognome **Nigro**; Indirizzo Via Dell'Arrigoni, 120 47522 – Cesena (FC); Telefono: 0547 313526; e-mail: gnigro@crpv.it; Ente di appartenenza: CRPV - Centro Ricerche Produzioni Vegetali.

RESPONSABILE TECNICO-SCIENTIFICO:

Il responsabile del team scientifico

Nome: **Claudio**; Cognome: **Ratti**; Indirizzo: Viale Fanin, 40, 40127 – Bologna; Telefono 051 2096733; email: claudio.ratti@unibo.it; Ente di appartenenza: Alma Mater Studiorum - Università di Bologna - Dipartimento di Scienze Agrarie.

PAROLE CHIAVE in italiano: Malattia delle piante, Strumento diagnostico, Certificazione.

PAROLE CHIAVE in inglese: Plant disease, Diagnostic tool, Certification.

CICLO DI VITA PROGETTO: Data inizio **1/08/2018** Data fine **31/01/2020**

STATO PROGETTO: **Progetto concluso**

FONTE FINANZIAMENTO: **PSR Emilia-Romagna Misura 16.2.01**

COSTO TOTALE: € **148.738,08** % FINANZIAMENTO **70%**

CONTRIBUTO RICHIESTO: € **104.117,00**

LOCALIZZAZIONE GEOGRAFICA livello NUTS3 (province): **ITH57 (Ravenna), ITH58 (Forlì-Cesena)**

ABSTRACT

Obiettivi del progetto

La produzione di materiale vivaistico rappresenta il primo e fondamentale anello del processo produttivo frutticolo, poiché in grado di condizionarne fortemente la redditività.

L'obiettivo generale del piano è dotare il vivaismo frutticolo regionale di nuovi e più efficienti strumenti di diagnosi principalmente di virus, viroidi e fitoplasmi, come l'innovativa tecnica di diagnosi (Digital Droplet PCR) in grado di individuare la presenza di minime contaminazioni di organismi patogeni in campioni vegetali, per assicurare agli agricoltori materiale di migliore qualità per quanto attiene alle problematiche fitosanitarie.

Riepilogo risultati ottenuti:

Risultati principali

Il progetto ha consentito la messa a punto di un sistema diagnostico innovativo (digital droplet PCR) in grado di garantire la sanità assoluta delle fonti iniziali soggette a successiva moltiplicazione.

In particolare, è emerso che la tecnica ddPCR è applicabile alla diagnosi di tutte le malattie previste nel progetto:

- PLMVd, Peach latent mosaic viroid, viroide del mosaico latente del pesco la cui esenzione è richiesta, con la nuova normativa, anche nel materiale CAC;
- PPV, Plum Pox Virus, virus della Sharka;
- Fitoplasmi;
- GPGV, Grapevine Pinot Gris Virus, virus del Pinot Grigio della vite,

con una maggior sensibilità rispetto alla tecnica Real Time PCR.

È stato, inoltre, dimostrato 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 è, pertanto, 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.

Inoltre, sui campioni di vino e frutta analizzati dal punto di vista sensoriale è emerso 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.

Principali benefici /opportunità apportate dal progetto all'utilizzatore finale

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. Ad oggi la tecnica dd-PCR è infatti principalmente applicata nel campo della virologia umana, mentre sono ancora relativamente poche le applicazioni nel settore vegetale.

La ricaduta produttiva sul vivaismo della Regione Emilia Romagna è assicurata dalla possibilità di immettere sul mercato materiale di moltiplicazione di livello superiore rispetto ai produttori concorrenti di altre regioni o internazionali. Ciò dovrebbe portare ad un aumento delle piante certificate vendute, negli anni immediatamente successivi alla conclusione del progetto, dai partecipanti all'accordo di filiera.

Descrizione delle attività (max 600 caratteri)

- Esercizio della cooperazione: è stata svolta una intensa attività per garantire la corretta applicazione di quanto contenuto nel Piano stesso attraverso il monitoraggio dello stato d'avanzamento dei lavori e la definizione delle azioni correttive.
- Trasferimento di una nuova tecnica diagnostica (Digital Droplet PCR): è stata messa a punto una nuova tecnica diagnostica presso il laboratorio del CAV: la Digital Droplet PCR, per la diagnosi fitopatologica di **PLMVd** (Peach latent mosaic viroid, viroide del mosaico latente del pesco) la cui esenzione è richiesta, con la nuova normativa, anche nel materiale CAC, **PPV** (*Plum Pox Virus*, virus della sharka), **Fitoplasmi**, **GPGV** (Grapevine Pinot Gris Virus, virus del Pinot Grigio della vite); in grado di garantire la sanità totale del materiale vivaistico frutticolo regionale.
- Divulgazione: è stato sviluppato un ampio e articolato piano di divulgazione per fornire elementi informativi e tecnici di base.

ABSTRACT

Project Objectives

The production of propagation plant material is the first and fundamental step of the fruit production process, since it can strongly affect its profitability.

The general objective of the plan is to provide the regional fruit tree nursery sector with new

and more efficient diagnostic tools mainly for viruses, viroids and *phytoplasmas* diagnosis, such as the innovative Digital Droplet PCR, which can detect the presence of minimal contamination of pathogenic organisms in plant specimens, to provide farmers with plant material of the best phytosanitary quality.

Summary expected results:

The Project allowed the development of an innovative diagnostic system (digital droplet PCR) able to guarantee the absolute health of the initial sources subject to subsequent multiplication. DdPCR technique was applicable to the diagnosis of all the diseases foreseen within the Project:

- PLMVd, Peach latent mosaic viroid whose exemption is required, with the new regulation, also in the CAC material;
- PPV, Plum Pox Virus;
- *Phytoplasmas*;
- GPGV, Grapevine Pinot Gris Virus,

with greater sensitivity than the Real Time PCR technique.

It has also been shown that ddPCR technique was very useful in identifying latent diseases that are difficult to diagnose with other molecular techniques, both in the entry phase of new sources carried to the CAV, and in the subsequent conservation phase of the pre - basic category plants.

It is therefore possible to affirm that the ddPCR technique can be initially applied to confirm the visual diagnosis of the disease, when symptoms of latent mosaic are observed in the peach orchards. Subsequently, the technique can be applied to understand whether the asymptomatic plants, closed to the diseased ones, have also been infected with the viroid. In this case, if the outcome is positive (that confirms the presence of the viroid), the affected plants must be cut down in order to slow-down the progression of the disease in the orchard.

Sensory analysis did not show significant differences between the sample of wines produced from grapes deriving from infected plants and those coming from bunches harvested from healthy grapevines. With regard to the sensory analysis performed on fruits, significant differences emerged between samples deriving from plants affected by latent mosaic and those obtained from healthy plants.

Description of activities

Project activities include:

- Exercise of cooperation: an intense activity was carried out to ensure the correct application of the work, by monitoring the progress of the activities and defining corrective actions.
- Transfer of a new diagnostic technique (Digital Droplet PCR) that has been developed at the CAV laboratory able to guarantee the total health of the regional propagation plant material: the Digital Droplet PCR, for the phytopathological diagnosis of **PLMVd** (Peach latent mosaic viroid) whose exemption is required, with the new legislation, also in the material CAC, **PPV** (Plum Pox Virus), *Phytoplasmas*, **GPGV** (Grapevine Pinot Gris Virus).
- Dissemination: a large and articulated dissemination plan has been developed to provide basic information and technical elements.

REPORT FINALE DEL PROGETTO

L'attività realizzata nel Piano d'innovazione è stata foriera di risultati e molto proficua per le attività diagnostiche del CAV. Si è riusciti a implementare correttamente tutti e quattro i protocolli digital droplet che ci si prefiggeva di sviluppare. Dunque il CAV dispone 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.

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.

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*. 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. Pertanto, abbinando la digital all'adozione di buone pratiche di contrasto della malattia in vivaio, la problematica della batteriosi della fragola può rientrare entro i limiti accettabili di convivenza.

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. L'intenzione del CAV 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.

REPORT FINALE DEL PROGETTO (in inglese)

The activity carried out through the Innovation Plan was fruitful and full of positive results for CAV. All four digital droplet protocols have been successfully implemented. So CAV, as of now, has the most innovative (and sensitive) technology for the diagnosis of Sharka, latent mosaic and *phytoplasmas* in stone fruit and of Pinot Gris-virus in vines. It is an important result. In fact, these diseases cause significant damage to the fruit and wine growing sector.

An important aspect is that related to the interpretation of the obtained results. The digital test (ddPCR) leaves no doubt for the research of ESFY and GPGV. In fact, the negative controls always did not give any amplification signal, while the positive controls gave abundant amplification signals. In these cases there is no need to interpret the analytical data, as it is certainly positive or certainly negative. Other results concern the test developed for PLMVd and PPV. In fact, in these cases, the negative controls (absence of the disease) were not completely negative according to the test. In particular, some droplets of the amplification emulsion showed positive signal (even if was very weak, lower than 10 droplets out of the approximately 24,000 analyzed in total).

The project aimed to extend the application of digital technique to other phytosanitary problems. In fact, during the 2019 vintage and early 2020, in the strawberry nurseries of Emilia-Romagna Region there was a strong presence of plants attacked by the bacterium *Xanthomonas fragariae*. At the suggestion of the Regional Phytosanitary Service we transferred the Real Time protocols to Digital, in doing so we have greatly increased the sensitivity of the tests, since only a couple of samples - out of the 300 tests performed annually - have given weak digital signal to indicate the presence of a latent

contamination of the *bacterium*. Therefore, by combining digital technology with the adoption of good disease control practices in the nursery, the problem of strawberry *bacteriosis* can be contained within acceptable limits of coexistence.

The diagnostic methods indicated in certification specifications currently include biological tests on arboreal and/or herbaceous indicators (indexing), serological tests (Elisa) and, finally, molecular tests (PCR and Realtime PCR). Clearly, none of these essays achieves the sensitivity of the Digital Droplet PCR. The intention of the CAV is therefore to apply this technique also on candidate sources, in particular for detecting those pathogens that may be present in the latent state, that means at very low concentrations in plants.

ELEMENTI RACCOMANDATI

Sono stati organizzati n. 1 Visita Guidata, n. 1 Incontro Tecnico, n. 2 Articoli Tecnici pubblicati sulla Rivista Frutticoltura: n° 5, 2019 e n°10, 2019.

All'interno del portale CRPV è stata individuata una pagina (<https://progetti.crpv.it/Home/ProjectDetail/49>) dedicata al Piano composta da una testata e da un dettaglio dove sono stati caricati tutti i dati essenziali del progetto.