

Focus

La LAMP: un metodo diagnostico molecolare di elezione per rilevare la Sharka

Gli strumenti impiegati sono di piccole dimensioni e trasportabili, e possono essere utilizzati anche in pieno campo



Sintomi di Sharka su albicocche. Sono ben visibili le caratteristiche deformazioni e butterature, caratterizzate da aree depigmentate e depresse.

Data: *Wed Sep 01 11:42:05 CEST 2021*

Il vaiolo della prugna (Sharka) è una delle malattie più gravi e distruttive delle drupacee. L'agente causale è il Plum Pox Virus (PPV), un virus ad RNA trasmesso da molte specie di afidi in modo non persistente oppure tramite innesti. Il PPV ha una vasta gamma di ospiti tra le specie di *Prunus*. Le piante infette possono risultare asintomatiche per diversi mesi con i sintomi che hanno spesso un andamento transitorio. I sintomi della Sharka variano nello spazio e nel tempo e possono essere confusi con altre fisiopatie, come carenze di nutrienti o danni causati da pesticidi. I sintomi possono comparire su foglie,

fiori e frutti di tutte le drupacee e, occasionalmente, sui noccioli delle albicocche (Figura 1), interessando alcune parti o tutta la pianta. La manifestazione dei sintomi varia inoltre a seconda dell'ospite, della cultivar, del ceppo di PPV, dell'età dell'albero e delle condizioni ambientali. Tipicamente la sintomatologia della Sharka compare in primavera o all'inizio dell'estate, scompare durante i periodi di caldo intenso, per poi ripresentarsi più avanti nella stagione, quando le temperature si moderano. Sebbene sia difficile controllare la diffusione virale a breve raggio, principalmente per la difficoltà di evitare la puntura degli afidi vettori sulle piante, la diffusione a lunga distanza può essere contenuta da specifiche azioni ispirate a rigide norme di quarantena e dalla tempestiva attività di monitoraggio e di controllo diagnostico di laboratorio.

Tutti i virus, come abbiamo tristemente appreso durante la pandemia Covid19, sono costituiti da acidi nucleici, che portano l'informazione necessaria per l'infezione, e da un involucro proteico che li protegge, denominato capside. Questi costituenti molecolari possono essere rilevati attraverso opportuni metodi diagnostici di tipo molecolare o sierologico.

La diagnostica ha da sempre avuto un ruolo importante nella comprensione dell'evoluzione dei virus e dei meccanismi delle malattie infettive. L'introduzione del saggio immunologico (ELISA), basato sull'individuazione delle proteine capsidiche virali, alla fine degli anni '70 ha dato una grande spinta alla diagnosi delle malattie da virus delle piante. La sierologia e la microscopia elettronica sono rimasti i sistemi diagnostici chiave fino allo sviluppo dell'analisi di sequenza a metà degli anni '80. Negli ultimi anni, la reazione a catena della polimerasi (PCR) è emersa come il sistema diagnostico preferito e più utilizzato. Il microarray e il sequenziamento di nuova generazione, invece, rappresentano, anche se con procedure complesse, i sistemi per eccellenza per rilevare e scoprire infezioni virali sconosciute, oltre a generare informazioni su sequenze virali per individuare i ceppi o per identificare i virus all'interno di dati derivati da approcci metagenomici.

Negli ultimi anni, nel settore della diagnosi delle malattie delle piante si è diffusa una nuova tecnica molecolare: l'amplificazione isoterma mediata da loop (LAMP), che consente di amplificare gli acidi nucleici a temperatura costante (isoterma) con un'elevata sensibilità e specificità.

Gli strumenti impiegati nella LAMP sono tipicamente di piccole dimensioni (Figura 2) e trasportabili, dando la possibilità di essere utilizzati anche in condizioni di pieno campo. Si basano su un sistema termostato in grado di generare cicli termici associato ad un lettore di fluorescenza Real-Time in grado di rilevare il frammento di DNA amplificato. Un interfaccia user-friendly guida l'operatore nello svolgimento delle operazioni da eseguire, consentendo l'analisi simultanea di molti campioni. Lo strumento esegue tutti i passaggi operativi necessari per il completamento dell'analisi in un tempo compreso tra 30 e 60 minuti.

Una delle peculiarità della LAMP è che la reazione di amplificazione non necessita di particolari attenzioni per l'estrazione di acidi nucleici totali (DNA o RNA). Per il successo dell'analisi è sufficiente utilizzare piccole quantità di un campione vegetale tritato, ed aggiungere un buffer opportuno che consente la lisi cellulare e la conseguente liberazione in soluzione delle molecole di acidi nucleici. In caso di presenza nel campione dell'RNA del PPV, la reazione isoterma consente l'amplificazione specifica di un frammento virale che viene rilevato dallo strumento.

In conclusione, il vantaggio della LAMP è di mettere a disposizione una tecnologia semplice nel trattamento del campione, che consente di effettuare molteplici test molecolari ad elevata sensibilità e specificità, con tempistiche ridotte. Inoltre, essendo facilmente trasportabile, la LAMP può essere utilizzata in attività di controllo o ispettive sia in laboratorio (Figura 3) sia in campo o nei vivai in condizioni operative di monitoraggio. Il sistema può essere collegato ad un sistema *cloud* con la possibilità di seguire da remoto la reazione in tempo reale e scaricare direttamente i risultati.

Pasquale Domenico Grieco

ALSIA - Metapontum Agrobios

Maria Giuseppina Morano

ALSIA - Metapontum Agrobios

Giancarla Taddonio

ALSIA - Metapontum Agrobios

Francesco Cellini

ALSIA - Metapontum Agrobios



Figura 1. Sezione longitudinale di frutto di albicocco infetto da PPV. Si evidenziano sul nocciolo le tipiche lesioni anulari depigmentate caratteristiche della Sharka.

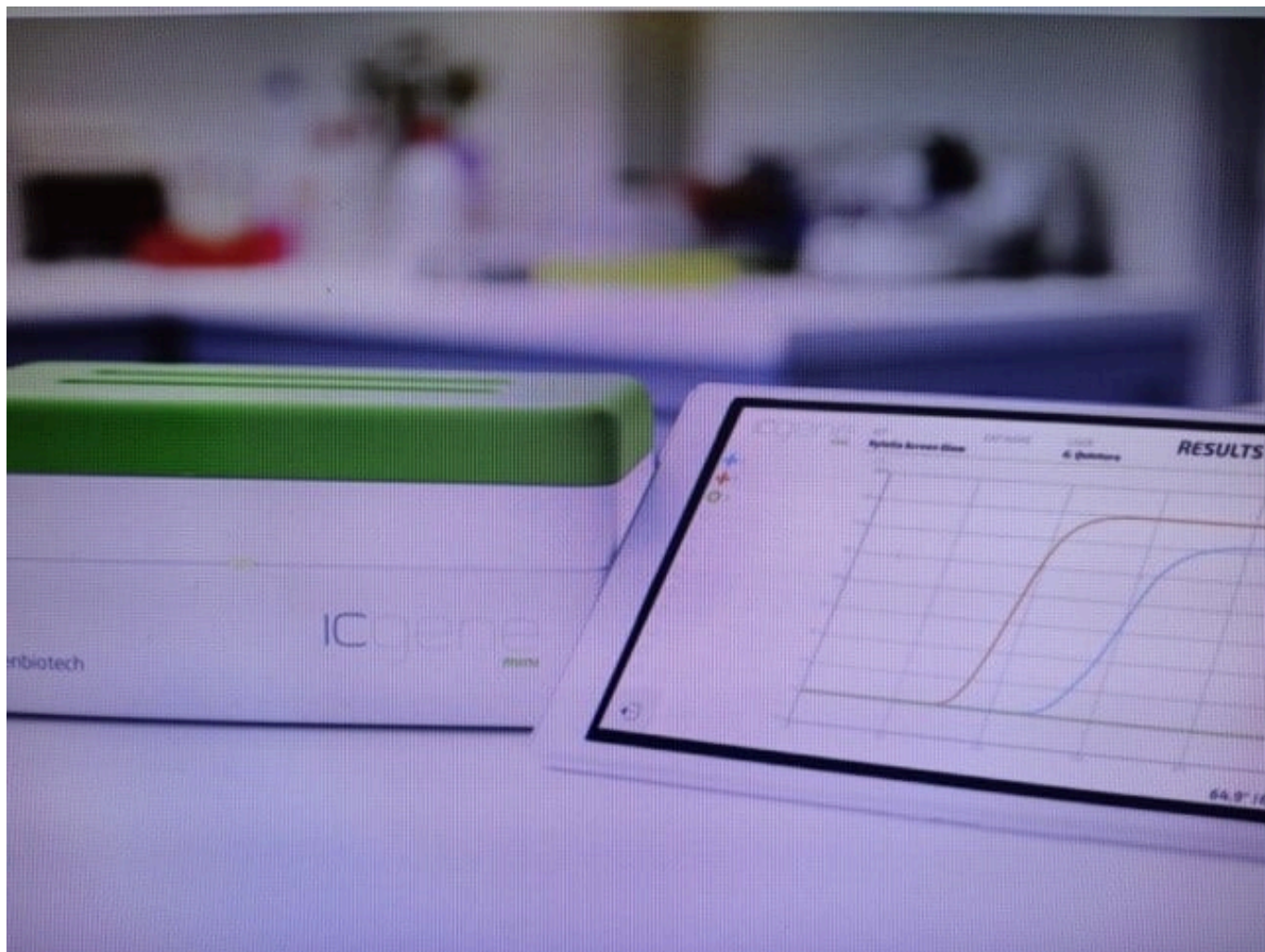


Figura 2. Strumento per l'analisi LAMP, in dotazione al laboratorio di diagnostica fitopatologica di ALSIA – Centro Ricerche Metapontum Agrobios.

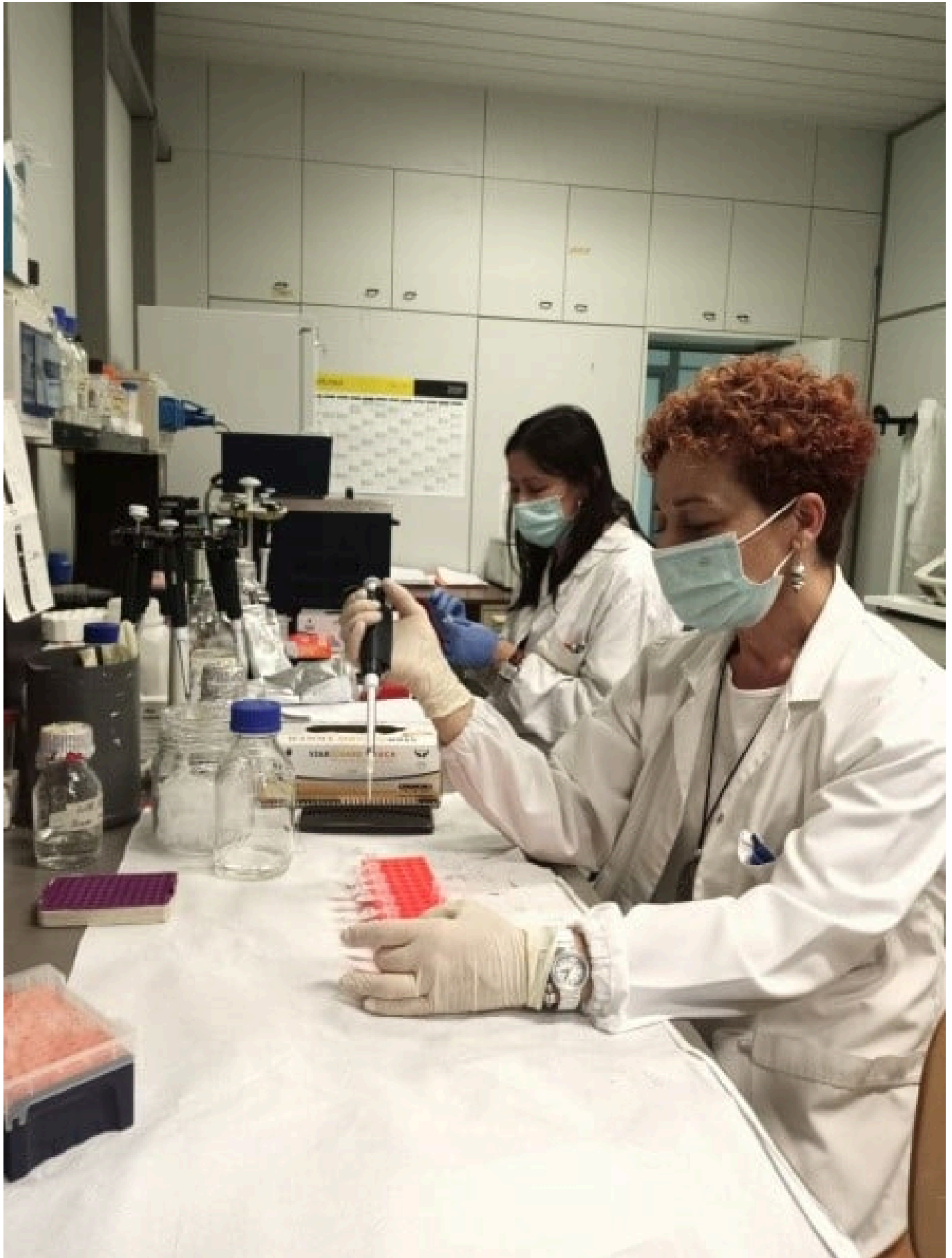


Figura 3. Ricercatrici di ALSIA in azione per la diagnosi del PPV.



AGRIFOGLIO
Periodico dell'ALSIA

Direttore Responsabile: Sergio Gallo
Reg. Tribunale di Matera n. 222 del 24-26/03/2004
ISSN 2421- 3268
ALSIA - Via Annunziatella, 64 - 75100 Matera
www.alsia.it - urp@alsia.it