



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLE PRODUZIONI AGRARIE E ALIMENTARI
SEZIONE FITOPATOLOGIA E GENETICA VEGETALE

DOTTORATO IN SCIENZE E TECNOLOGIE TROPICALI E SUBTROPICALI

GAETANO IACONO

**Indagini, sequenziamento e studio del flusso genico del
PepMV in Sicilia e nuovo metodo diagnostico**

TESI DI DOTTORATO

COORDINATORE

Chiar.mo Prof. Salvatore Cosentino

TUTOR

Chiar.mo Prof. Mario Davino

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE

1.1.	I virus vegetali	pag. 5
1.1.1.	Componenti	pag. 6
1.1.2.	Morfologia	pag. 8
1.1.3.	Struttura del capside	pag. 11
1.1.4.	Le proteine strutturali	pag. 13
1.1.5.	Organizzazione genomica	pag. 15
1.2.	Interazione virus pianta	pag. 16
1.3.	Sintomatologia	pag. 17
1.4.	Ciclo infezione	pag. 20
1.5.	Trasmissione attraverso i vettori	pag. 24
1.6.	Virus del mosaico del pepino	pag. 26
1.7.	Tassonomia, organizzazione genomica e caratteristiche dei <i>Flexiviridae</i>	pag. 30
1.8.	Organizzazione genomica del PepMV e funzione genica	pag. 35
1.9.	Processo di infezione e replicazione dei <i>Flexiviridae</i>	pag. 38
1.10.	Caratteristiche biologiche del PepMV	pag. 39
1.10.1.	Trasmissione	pag. 39
1.10.2.	Sintomi della malattia in piante di pomodoro	pag. 41
1.10.3	Piante ospiti	pag. 46
1.10.4.	Diagnosi ed individuazione del PepMV	pag. 51

1.10.5	Controllo del PepMV	pag. 61
1.10.6.	Prevenzione	pag. 62
1.10.7.	Monitoraggio della coltivazione	pag. 66
1.10.8.	Mezzi chimici	pag. 69
1.10.9.	Mezzi fisici	pag. 70
1.10.10.	Pratiche colturali	pag. 71
1.10.11.	Meccanismi di resistenza	pag. 72
1.10.12.	Protezione crociata	pag. 75

2. MATERIALI E METODI pag. 78

2.1.	Scopo della tesi	pag. 78
2.1.1.	Indagini di campo sull'infezione e diffusione di PepMV nell'area della provincia di Ragusa	pag. 79
2.1.2.	Prova di trasmissione di PepMV mediante Bombi	pag. 80
2.1.3.	Indagini sulla presenza di PepMV su specie diverse (coltivate e spontanee)	pag. 81
2.1.4.	Saggi per accertare la presenza di PepMV nei semi di pomodoro	pag. 82
2.1.5.	Prove di trasmissione in piante di pomodoro attraverso il seme	pag. 83
2.1.6.	Individuazione dei più importanti virus a RNA che infettano le piante di pomodoro	pag. 86
2.1.7.	Sequenziamento di un isolato di PepMV riscontrato in Sicilia	pag. 89

2.1.7.1.	Fonte del materiale vegetale	pag. 89
2.1.7.2.	Estrazione dell'RNA e genotipo RT-PCR	pag. 90
2.1.7.3.	Sintesi del DNA, clonaggio e sequenza	pag. 92
2.1.8.	Studio del flusso genico e della dispersione di Pepino Mosaic Virsu in Sicilia	pag. 94
2.1.9.	Diagnosi del PepMV attraverso un nuovo metodo di rilevamento basato sull'ibridazione di flusso di imponte su membrana	pag. 98
2.1.9.1.	Virus e materiale vegetale saggiato	pag. 98
2.1.9.2.	Preparazione del campione	pag. 99
2.1.9.3.	Ibridazione molecolare	pag. 100

3. RISULTATI pag. 102

3.1.	Indagini di campo sull'infezione e diffusione di PepMV su piante di pomodoro	pag. 102
3.2.	Prova di trasmissione di PepMV mediante Bombi	pag.103
3.3.	Indagini sulla presenza di PepMV su specie diverse - coltivate e spontanee	pag. 104
3.4.	Saggi per accertare la presenza di PepMV nei semi di pomodoro	pag. 107
3.5.	Prove di trasmissione in piante di pomodoro attraverso il seme	pag.108
3.6.	Individuazione dei più importanti virus a RNA che infettano le piante di pomodoro	pag. 109

3.7.	Sequenziamento di un isolato di PepMV riscontrato in Sicilia	pag. 113
3.7.1.	Genotipizzazione mediante RT-PCR	pag. 114
3.7.2.	Il sequenziamento degli isolati italiani	pag. 114
3.7.3.	Analisi filogenetica e omologia di sequenza	pag. 115
3.8.	Studio del flusso genico e della dispersione di PepMV in Sicilia	pag. 118
3.9.	Diagnosi del PepMV attraverso un nuovo metodo di rilevamento basato sull'ibridazione di flusso di imponte su membrana	pag. 125
3.9.1.	Specificità dell'ibridazione di flusso	pag. 125
3.9.2.	Rilevazione di membrane con impronte di diversi ospiti e di campioni di PepMV	pag. 126
 4. CONCLUSIONI		 pag. 128

LETTERATURA CITATA

1. INTRODUZIONE

1.1. I VIRUS VEGETALI

Un virus è per definizione un'entità biologica costituita da una o più molecole di RNA o DNA (a seconda del virus) che servono da stampo per lo sviluppo di nuove molecole di acido nucleico, hanno la funzione di fornire l'informazione per la sintesi delle proteine virali e sono racchiuse da un involucro proteico o lipoproteico.

Il virus è un parassita intracellulare obbligato perché non ha una organizzazione cellulare, non riesce a immagazzinare energia libera e non è attivo al di fuori della cellula ospite, ed è visibile solo al microscopio elettronico.

Il termine virus, che in latino significa veleno e in greco sostanza maleodorante velenosa, fu usato per la prima volta alla fine del XIX secolo per indicare particelle microscopiche filtrabili.

L'esistenza dei virus è stata accertata solo nel 1892, quando lo scienziato russo *D. I. Ivanovskij*, studiando le foglie delle piante di tabacco che manifestavano una nuova patologia chiamata *mosaico*, dimostrò che essa era provocata da particelle patogene più piccole dei batteri conosciute in seguito come virus del mosaico del tabacco. L'estratto ottenuto da queste foglie rimaneva infettivo anche dopo il passaggio attraverso filtri a candela di Chamberland in grado di trattenere le cellule batteriche.

Nel 1898 il botanico olandese *M. W. Beijerinck* attribuì per la prima volta il termine virus, riprendendo le osservazioni di *Ivanovskij*, alle

particelle che erano in grado di infettare una pianta sana di tabacco e di moltiplicarsi nei suoi tessuti, specialmente quelli in attiva crescita.

Nel 1935, il biochimico *Stanley* riuscì a cristallizzare il virus del mosaico del tabacco e a dimostrare che la struttura fosse costituita solo da un involucro proteico contenente un acido nucleico, l'RNA. Nei successivi anni '40 si svilupparono tecniche quali la microscopia elettronica e l'ultracentrifugazione ad alta velocità, che permisero la visualizzazione dei virus e il loro isolamento dal materiale vivente. L'avvento della biologia molecolare portò alla scoperta delle caratteristiche fisiche, chimiche e genetiche della maggior parte dei virus riuscendo a dare informazioni molto importanti in ambito patologico e tassonomico.

I virus vegetali possono causare gravi danni alle piante, non minori di funghi e batteri, sono molto difficili da controllare con le normali pratiche agronomiche e in media durano più a lungo degli altri patogeni, apportando anche notevoli perdite di produzione.

La Virologia vegetale è un campo in espansione ed è diventata una branca della Virologia generale.

1.1.1. COMPONENTI

I virus sono costituiti da una struttura molto semplice: il genoma che è formato da un acido nucleico che si replica all'interno di cellule viventi e che utilizza le vie metaboliche dell'ospite – causando la sintesi di elementi specializzati che possono trasferire il genoma virale ad altre cellule (Luria *et al.*, 1978). Nel genoma è contenuta tutta l'informazione genetica di un virus e, quindi, anche le proprietà infettive; esso è

composto da DNA o RNA, a singola o doppia elica, racchiuso in un involucro proteico o lipoproteico definito *capside* a formare la particella virale completa o *virione*.

A sua volta il capsid è formato da tante proteine strutturali denominati capsomeri, quindi l'insieme dei capsomeri costituiscono il capsid.

Nella maggior parte dei casi, i virus vegetali sono composti da RNA a singola elica (ssRNA) a polarità negativa o positiva, così da essere utilizzato direttamente come RNA messaggero (mRNA).

Minore è il numero dei virus con RNA a doppia elica (dsRNA) e con DNA a singola e doppia elica (ssDNA, dsDNA).

Le proteine del capsid, oltre alla funzione protettiva dell'acido nucleico, determinano le caratteristiche antigeniche di un virus, regolano la sua trasmissione tramite vettori, in alcuni casi è alla base della specificità del virus nei riguardi della sua gamma di ospiti.

A differenza di altri microorganismi patogeni (funghi, batteri), la replicazione non avviene per scissione binaria, ma attraverso l'assemblaggio delle varie componenti grazie alle informazioni contenute nel materiale genetico virale e sfruttando totalmente il complesso sintetizzatore di proteine dell'ospite. Per questa ragione e per il fatto che non hanno un loro metabolismo al di fuori delle cellule ospiti i virus sono parassiti subcellulari.

1.1.2. MORFOLOGIA

Tassonomicamente i fitovirus vengono classificati in base al tipo di acido nucleico presente (DNA o RNA), alla presenza e forma del capsido.

Esistono diverse tipologie di involucro capsidico (Figura 1):

– Virus allungati con forme bastoncellari rigide (es. *Tobamovirus*). Oppure filamentose e flessuose (es. *Capillovirus*, *Closterovirus*). Un modello di questo tipo di virus è rappresentato dal TMV (*Tobacco mosaic virus*), costituito da un'unica molecola di ssRNA+ disposta ad elica, attorno alla quale si dispongono le molecole proteiche; la struttura che ne risulta è un bastoncino rigido di 300 nm di lunghezza con un diametro di 18 nm e un canale interno di 4 nm.

– Virus tondeggianti sferoidali grandi e con involucro (es. *Tospovirus*).

– Virus icosaedrici (detti anche isometrici o poliedrici). Le proteine sono raggruppate in capsomeri distinguibili al microscopio elettronico e, disposti secondo le facce, i vertici e gli spigoli di un icosaedro regolare, un poliedro di venti facce triangolari equilatero (es. *Cucumovirus*, *Nepovirus*). L'acido nucleico dei virus icosaedrici si presenta come un gomitolo all'interno del capsidio, con diramazioni che si insinuano tra le proteine del capsidio stesso.

– Virus bacilliformi piccoli e grandi (es. *Rhabdovirus* e *Alfamovirus*), caratterizzati da una membrana lipoproteica che riveste il capsidio.

– Virus dalla forma geminata costituiti da due particelle icosaedriche legate insieme (es. *Geminivirus*).

Alcuni virus sono composti da una singola particella contenente una sola molecola di acido nucleico (virus monocomponenti), mentre altri hanno il genoma diviso in due o più particelle (virus multicomponenti), necessarie per avere un'infezione completa. Esistono anche casi in cui l'acido nucleico virale è suddiviso in più porzioni, tutte contenute in un'unica particella (virus monocomponenti a genoma diviso).

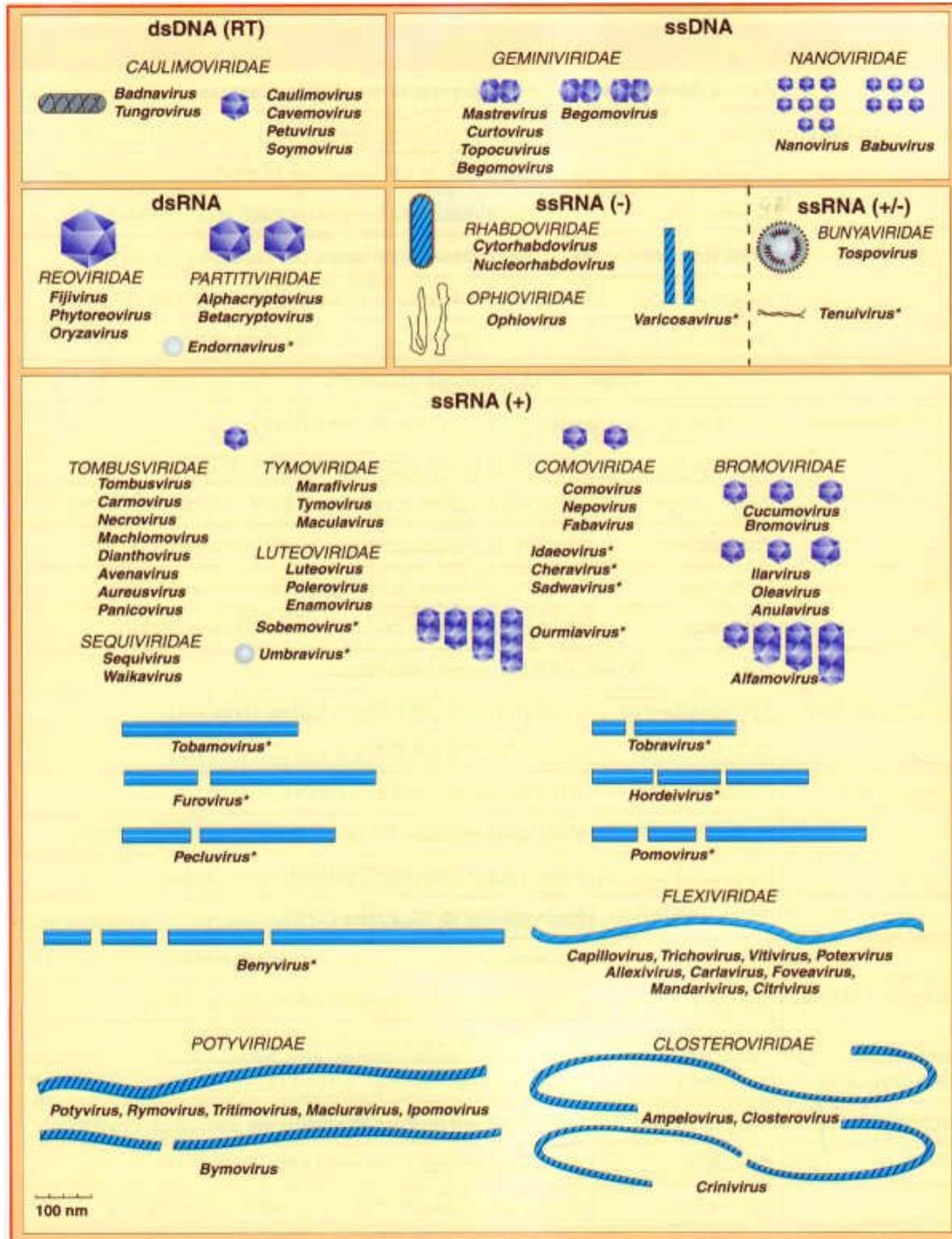


Fig. 1 – Rappresenta la forma, la dimensione relativa e il numero di particelle contenenti differenti segmenti di acido nucleico necessari per il completo processo infettivo dei virus delle piante riuniti in famiglie e generi. Simboli: ds, acido nucleico a doppio filamento; ss, acido nucleico a singolo filamento; RT, virus che si replicano tramite l'enzima trascrittasi inversa; (+), RNA di polarità positiva direttamente tradotto dai ribosomi; (-), RNA di polarità negativa non direttamente traducibile, che deve essere prima trascritto in RNA (+) per codificare la sintesi di proteine; (+/-), RNA di polarità ambisenso; *, generi non ancora inquadrati in famiglie.

1.1.3. STRUTTURA DEL CAPSIDE

La struttura del capsido è costituita da tante *subunità proteiche* di peso molecolare compreso fra i 20 e i 60 kilodalton (kD), possono essere identiche le une alle altre e prendono il nome di monomeri, oppure di pochi tipi e si chiamano oligomeri, e sono disposte regolarmente attorno a un asse.

Il modo con cui le subunità proteiche si associano tra loro nel capsido determina la *struttura quaternaria* di una particella virale, e il capsido dei virus di uno stesso genere contiene il medesimo numero di subunità proteiche organizzate con la stessa simmetria.

La peculiarità dei virus di formare il capsido con subunità proteiche uguali o di pochi tipi ripetute parecchie volte è legata alla ridotta dimensione del loro genoma e quindi alla sua limitata capacità di codificare proteine diverse. Tale tipo di costruzione del capsido riduce l'informazione genetica necessaria per la sintesi delle molecole proteiche che compongono il capsido e diminuisce la possibilità di errore nella sintesi delle molecole proteiche. Il danneggiamento di una o più subunità proteiche può far diventare quelle particolari subunità non funzionanti, ma di rado distrugge l'infettività della particella virale.

Nella maggior parte dei fitovirus le subunità proteiche si aggregano le une alle altre secondo la simmetria di rotazione *cubica*, tipica dei virus con particelle sferiche, o *elicoidale*, caratteristica dei virus con particelle di forme tubolare; vi sono, altresì, alcuni virus con una organizzazione strutturale *complessa*, ad esempio, le particelle bacilliformi le quali presentano una struttura simile a metà icosaedro alle estremità e la parte tubolare costituita da subunità organizzate in un reticolo esagonale,

mentre quelle degli *ourmiavirus* presentano le estremità coniche, apparentemente con una struttura emi-icosaedra, e la parte tubulare

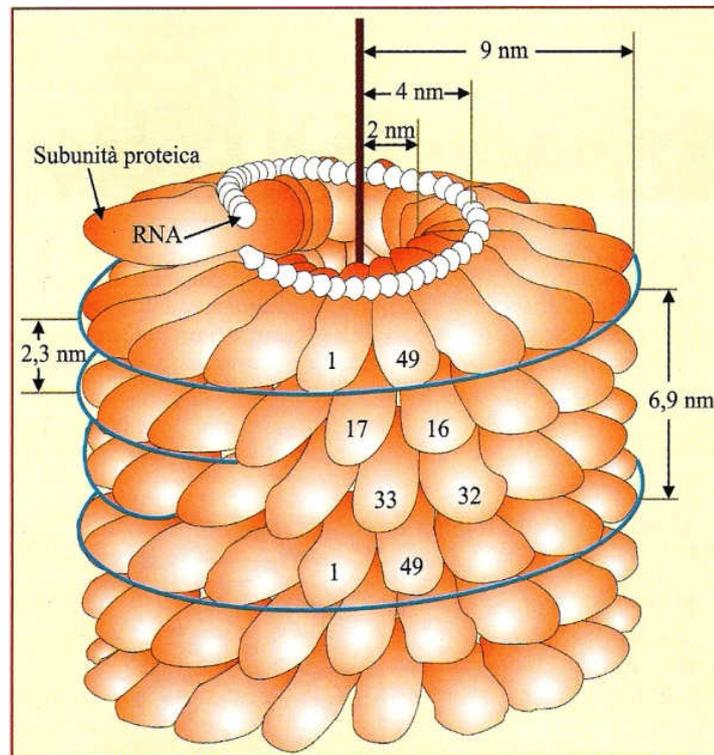


Fig. 2 – Modello di una porzione di particella di TMV che mostra la disposizione elicoidale delle subunità proteiche e la loro relazione con l'RNA. Le particelle di questo virus hanno la forma bastoncini rigidi, di 300-310 nm di lunghezza predominante e di circa 18 nm di diametro, con una cavità centrale di 4 nm di diametro. Il capsido è costituito da circa 2130 subunità proteiche chimicamente uguali tra loro, con una conformazione leggermente allungata, formate da 158 amminoacidi (p.m. 17,5 kDa), disposte secondo una spirale destrorsa. Per effetto della simmetria elicoidale, la subunità 1 ne incontra un'altra nella medesima posizione dopo tre giri dell'elica. Il passo tra le due subunità è di 6,9 nm mentre quello tra due spire successive è di 2,3 nm. L'RNA a singola elica, di polarità positiva, costituito da 6,4 kb³ (p.m. 2000 kDa), rappresenta il 5% della particella virale ed è inserito in un solco elicoidale situato tra due spire di subunità proteiche adiacenti dell'involucro e posto a circa 4 nm dall'asse verticale della particella.

costituita da una serie di due, tre o sei doppi dischi, a seconda del tipo di particella virale.

I membri della famiglia *Geminiviridae* hanno particelle cosiddette geminate, costituite da due *icosaedri incompleti*, ciascuno formato da 22 capsomeri. I virus delle famiglie *Rhabdoviridae* (virus con particelle bacilliformi a RNA a singola elica di senso negativo) e *Bunyaviridae* (virus con particelle sferiche a RNA a singola elica ambisenso) possiedono un involucro lipoproteico bistratificato, detto *envelope*, che circonda il nucleocapside, e delle piccole sporgenze di natura glicoproteica, dette *glicole* o *peplomeri*.

1.1.4. LE PROTEINE STRUTTURALI

Le proteine che costituiscono le particelle virali prendono il nome di *proteine strutturali* o *capsidiche*, contengono una o più regioni che formano domini a carattere globulare caratterizzati da una discreta rigidità e con una configurazione spaziale stabile; inoltre, hanno segmenti detti bracci o giunture con un aspetto disteso e una configurazione flessibile, i quali formano strutture definite solo quando interagiscono con altre catene peptidiche nei virioni. Il termine dominio viene utilizzato per indicare una regione in cui la catena peptidica presenta ripiegamenti che sono indipendenti dal resto della catena e che conferiscono alla proteina un assetto compatto. I domini sono costituiti da 120-200 residui amminoacidici e loro configurazione è determinata dal modo in cui gli elementi che definiscono la struttura secondaria di una proteina, quali le cosiddette α *eliche* e i *foglietti* β si impacchettano

insieme. Nella struttura ad α elica la catena polipeptidica si avvolge regolarmente su se stessa in una spirale. La forma dell'elica è stabilizzata da legami idrogeno che si instaurano tra l'ossigeno di un gruppo carbossilico di un residuo amminoacidico e l'idrogeno del gruppo amminico di un altro residuo amminoacidico situato a quattro residui di distanza lungo la catena (figura 3A). La struttura a foglietto β è determinata dal ripiegamento su se stessa, avanti e indietro, secondo una linea a zigzag, di una catena polipeptidica o anche dall'allineamento tra loro di due o più catene adiacenti. Le porzioni adiacenti della stessa catena polipeptidica o di due o più catene sono collegate trasversalmente da legami idrogeno in modo da formare ripiegamenti simili a quelli di un foglio pieghettato (figura 3B).

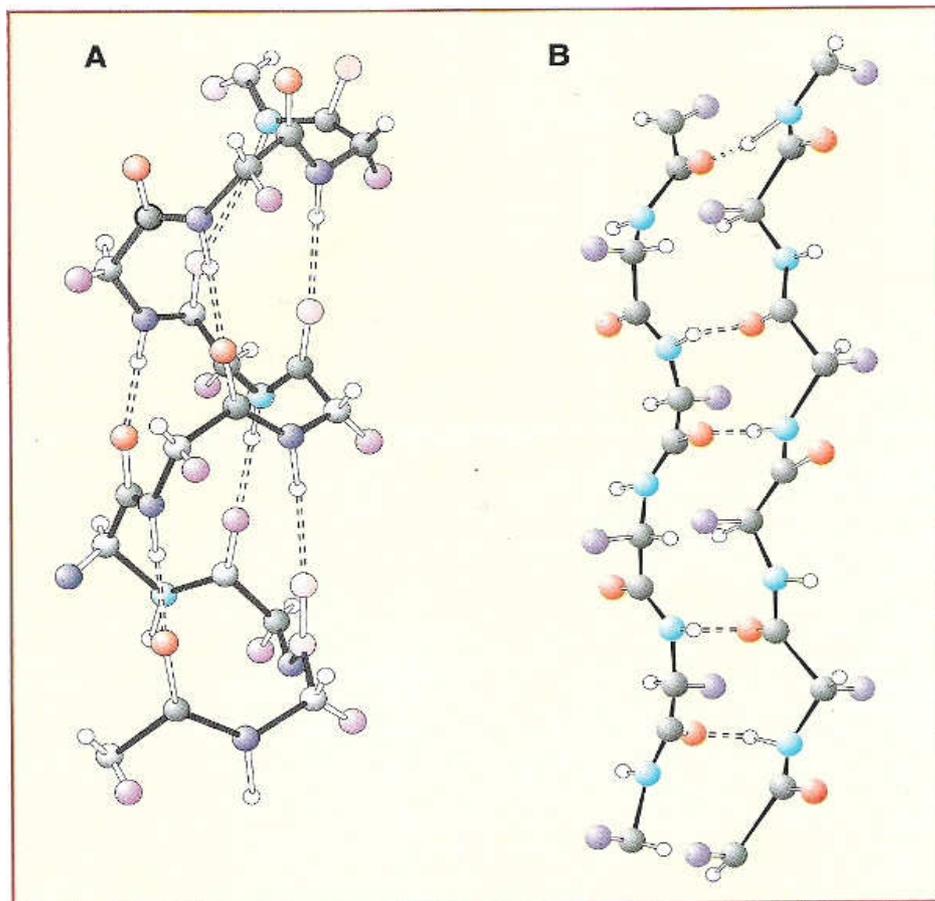


Fig. 3 – Modello A: struttura ad α elica. Modello B: struttura a foglietto β . Le linee tratteggiate rappresentano i legami idrogeno.

1.1.5. ORGANIZZAZIONE GENOMICA

Il genoma virale, come abbiamo detto in precedenza è formato da un solo tipo di acido nucleico, ha una taglia molto ridotta con sequenze codificanti ravvicinate che possono anche sovrapporsi parzialmente (es. *Furovirus*, *Tombusvirus*) o completamente (es. *Geminivirus*) in diverse fasi di lettura (Open Reading Frame). A differenza dei geni eucariotici che presentano introni e sono monocistronici, quelli virali non hanno introni e sono policistronici (ogni mRNA contiene più ORF).

Le regioni codificanti esprimono proteine necessarie per il ciclo d'infezione virale, il movimento nella pianta, le interazioni con l'ospite vettore e il movimento tra ospiti; mentre quelle non codificanti controllano l'espressione e la replicazione del genoma.

Per rendere il proprio genoma accessibile ad un sistema eucariotico e superare le restrizioni da esso imposte, i virus hanno sviluppato nel corso dell'evoluzione diverse strategie trascrizionali:

divisione del genoma in più molecole di acido nucleico, genomi multipartiti,

– produzione di RNA subgenomici attraverso l'esposizione di codoni di inizio interni;

– produzione di poliproteine attraverso la traduzione dell'intero genoma come una singola ORF, successivamente tagliata in differenti prodotti finali da specifiche proteasi virali;

– presenza di proteine *read through*, in cui un codone di terminazione debole permette ad alcuni ribosomi di proseguire la traduzione fino al successivo codone di terminazione. In questo modo due ORFs adiacenti possono fondersi producendo due proteine diverse, una derivante dalla ORF al 5' e l'altra dalla fusione di entrambe le ORF;

– presenza di proteine *trans-frame* che permettono la produzione di più proteine a partire dallo stesso codone di inizio attraverso un meccanismo di slittamento del modulo di lettura.

In molti casi i virus presentano anche dei segnali regolativi e di riconoscimento delle loro attività a tutte e due le estremità. Al 5' possiamo trovare:

– cap simili a quelli della maggior parte dei mRNA eucariotici e coinvolti nella stabilità dell'RNA e nell'efficienza della traduzione;

– proteine a basso peso molecolare covalentemente legate all'RNA virale, Vpg (*Viral protein genome linked*), coinvolte nell'induzione alla replicazione.

Al 3' invece possiamo trovare strutture simili a RNA transfer (*tRNA like*) importanti per la replicazione oppure code poliadenilate analoghe a quelle presenti nei messaggeri eucariotici e probabilmente correlate alla stabilità dell'RNA virale.

1.2. INTERAZIONE VIRUS PIANTA

In generale le piante risultano essere resistenti alla maggior parte dei virus, per cui l'infezione è un evento molto particolare con caratteristiche distintive per ogni interazione ospite-patogeno.

Le piante, in seguito all'inoculazione dell'agente patogeno, possono comportarsi come «non ospiti» se il virus non si replica all'interno delle cellule; questo fenomeno è definito immunità.

Le piante in cui il virus si replica all'interno delle cellule e l'infezione viene trasmessa in modo sistemico, sono dette ospiti e il fenomeno è

definito suscettibilità; queste possono essere classificate a seconda dell'intensità dei sintomi in:

- sensibili se presentano sintomi più o meno gravi;
- tolleranti se presentano sintomi lievi o assenti, ma il virus è presente in modo latente (Matthews R.E.F., 1991).

Ci sono anche le piante resistenti:

- quelle in cui il virus non riesce a diffondersi nelle cellule adiacenti a quelle inoculate, questo fenomeno è detto infezione subliminale o ipersensibilità estrema;
- quelle che hanno una reazione di ipersensibilità, in cui la pianta circoscrive la diffusione del virus a cellule adiacenti a quelle infettate grazie alla produzione di polifenolo-ossidasi che creando zone necrotiche di contenimento bloccano l'espansione sistemica.

1.3. SINTOMATOLOGIA

La sopravvivenza del virus è legata a quella della pianta per cui è difficile che ne causi il decesso. Su alcuni ospiti inoltre i virus possono non indurre malattia evidente ma possono aggravarne i sintomi in caso di infezione mista con un altro virus o patogeno.

I sintomi più comuni dell'infezione sono malformazione nello sviluppo della pianta (nanismo o gigantismo), alterazioni della pigmentazione delle parti verdi (mosaico, bandature, striature, variegature, ingiallimenti) o del fiore (decolorazione, variegature), malformazioni di organi (arricciamento, arrotolamenti), necrosi.

I sintomi della malattia che si manifestano macroscopicamente sono derivati da una cascata di eventi a livello citologico che coinvolge

l'intera cellula: nel suo metabolismo ossidativo, fotosintetico, nel ciclo del carbonio, nel bilancio idrico e nella crescita (Matta, 1996).

– SINTOMI LOCALI

Si tratta di lesioni localizzate che si sviluppano vicino al punto di ingresso del patogeno nell'ospite. Sono importanti per la valutazione dei saggi biologici, infatti dal numero di lesioni locali è possibile risalire alla concentrazione virale.

Le cellule infette possono perdere clorofilla e altri pigmenti, dando origine a lesioni locali clorotiche. In alcuni casi (TBSV = *Tomato Bushy Stunt Tombusvirus*) le lesioni trattengono più clorofilla rispetto ai tessuti circostanti e risultano di colore verde intenso. In molte combinazioni virus-ospite, le cellule infettate, a livello di lesione locale vanno incontro a necrosi e morte.

– SINTOMI SISTEMICI

L'infezione sistemica è dovuta alla diffusione del virus all'interno dell'ospite, che passa attraverso 2 fasi fondamentali: il trasferimento a breve distanza (da cellula a cellula attraverso i plasmodesmi) e il trasferimento a lunga distanza (attraverso il floema).

Il più evidente sintomo sistemico che si può avere è la riduzione della taglia della pianta, a volte accompagnato ad una riduzione della presenza di clorofilla. In generale essa è quasi interamente dovuta a cause di tipo fisiologico, soprattutto alle alterazioni a carico del metabolismo.

– INGIALLIMENTI

I virus che causano questo sintomo sono numerosi e sono tutti floematici, come i *Luteovirus* e i *Closterovirus*. Alcuni hanno una notevole

importanza economica per i danni provocati alle colture, come, ad esempio il virus che causa l'ingiallimento delle barbabietole (*Beet Pseudo-Yellow Virus*), l'accartocciamento fogliare giallo di pomodoro (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus*, TYLCV), o il virus della tristezza degli agrumi (*Citrus Tristeza Virus*).

– MOSAICO E SINTOMI CORRELATI

A seconda della combinazione virus-ospite si possono sviluppare differenti effetti a mosaico. L'effetto a mosaico sulle foglie della pianta infetta è dovuto ad un'alternanza di aree verde scuro e aree verde chiaro che si differenziano nei diversi tipi di piante. La presenza di bande o settori di tessuto con colore diverso dal normale è dovuta alla perdita di antocianine. I fiori infetti sono frequentemente più piccoli, deformi e possono sfiorire prematuramente.

Nelle monocotiledoni, il mosaico si manifesta con striature del tessuto più chiare rispetto al resto della foglia, con colori che variano dal verde pallido al giallo o bianco. A questa striatura si accompagna molto frequentemente la variegatura del colore dei petali dei fiori.

Nelle dicotiledoni le aree coinvolte hanno contorni irregolari e assumono colore verde scuro e verde-giallo. Inoltre il mosaico può variare in base all'età delle foglie o svilupparsi principalmente lungo le nervature fogliari.

– MODIFICAZIONI A LIVELLO CITOLOGICO

I sintomi macroscopici indotti dai virus si riflettono in cambiamenti istologici quali necrosi, iperplasia e ipoplasia che possono manifestarsi singolarmente o in combinazione.

La necrosi può essere confinata in particolari organi e tessuti e può essere localizzata. In genere si manifesta in combinazione con altri cambiamenti istologici e può presentarsi come primo visibile effetto oppure come ultimo stadio della malattia. Ad esempio, piante di pomodoro infette da TMV possono presentare necrosi interne nei frutti immaturi.

L'ipoplasia si manifesta frequentemente nelle aree gialle delle foglie con mosaico. La lamina è più fine rispetto alle aree verde scuro e le cellule del mesofillo sono meno differenziate, con un ridotto numero di cloroplasti e spazi intercellulari ridotti o assenti.

L'iperplasia si manifesta con cellule più grandi del normale a causa di una variazione degli spazi intercellulari, oppure con una divisione anormale delle cellule del cambio o con la divisione di cellule differenziate (Hull, 2002).

La neoplasia infine si manifesta nella pagina inferiore delle foglie; si formano escrescenze crestiformi, dette anche enazioni, localizzate in prossimità delle nervature in cui le cellule sono andate incontro a frequenti divisioni, ma mantengono l'organizzazione fogliare. Un esempio sono le foglie di vite, pisello e mais infette dal (*Maize Rough Dwarf Virus*) *virus del nanismo ruvido del mais*.

1.4. CICLO D'INFEZIONE

Il ciclo tipico di infezione virale si può suddividere in diverse fasi successive: entrata nella pianta ospite, replicazione ed espressione del genoma virale, diffusione all'interno dell'organismo ospite, trasmissione ad un nuovo ospite.

Poiché i virus non sono in grado di penetrare attraverso la cuticola intatta delle piante, l'ingresso meccanico nell'organismo ospite può avvenire:

- per contatto (in corrispondenza di ferite nei tessuti);
- per moltiplicazione vegetativa di piante infette;
- per seme;
- per polline;
- per vettori animali (insetti, acari, nematodi);
- per vettori vegetali (funghi, fanerogame parassite).

Una volta penetrato all'interno dell'ospite il virus subisce una sequenza di modificazioni che portano alla costituzione di nuove particelle.

Il *disassemblaggio* o decapsidazione del virione avviene all'interno della cellula vegetale in modo da esporre totalmente o parzialmente l'acido nucleico virale all'ambiente cellulare (è la fase in cui si ha la scissione tra proteina di rivestimento ed acido nucleico).

Il pH e la concentrazione di alcuni ioni intracellulari (es. Ca^{2+}) sono importanti per l'integrità e la stabilità della particella virale.

Quando il genoma virale si trova libero all'interno del citoplasma cellulare può avvenire la *sintesi proteica* utilizzando i meccanismi dell'ospite, può quindi avvenire l'espressione delle proteine virali con passaggi intermedi diversi a seconda del materiale genomico di partenza: RNA o DNA.

I virus con genoma formato da ssRNA⁺ sono tradotti (*traduzione*) direttamente dai ribosomi della cellula vegetale, mentre quelli a ssRNA⁻ o a dsRNA devono prima trascrivere il loro genoma e produrre mRNA. Questi ultimi virus si avvalgono di un complesso di replicazione formato

da RNA polimerasi RNA-dipendente di origine virale. La trascrizione è probabilmente un fenomeno precoce nel ciclo di infezione poiché la polimerasi coinvolta è una delle proteine strutturali.

Il genoma dei virus a DNA deve essere prima trasportato nel nucleo per essere trascritto dall'apparato di trascrizione dell'ospite (genoma a dsDNA dei *Caulimovirus*) oppure replicato e trascritto in mRNA (genoma a ssDNA dei *Geminivirus*). Segnali di localizzazione nucleare (NLS) sono stati evidenziati in alcune delle proteine di queste specie.

Per quello che riguarda l'espressione genica dei virus si possono distinguere gli *immediate early genes* o geni immediatamente espressi indispensabili per la replicazione, gli *early genes* o geni precoci che sono espressi nelle prime fasi di infezione e possono attivare la trascrizione di altri geni e i *late genes* o geni tardivi che vengono espressi nelle fasi finali dell'infezione virale e che codificano per la maggior parte per proteine strutturali.

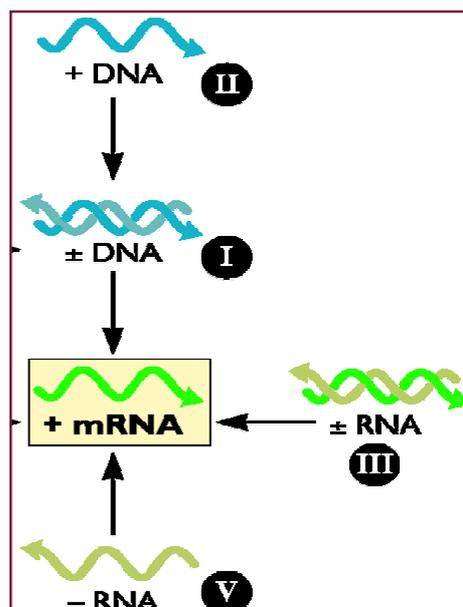


Fig. 4 – Schema degli intermedi che si devono formare prima della traduzione dell'mRNA per ogni tipo di genoma virale.

Il genoma virale si replica nel citoplasma o nel nucleo, ma l'*assemblaggio* (cioé l'unione tra proteine formatesi e filamento di acido nucleico al fine di costituire le nuove particelle) del virione è un evento che avviene nel citoplasma, spesso ubicato sulle membrane dei cloroplasti, dei mitocondri o del reticolo endoplasmatico.

Le particelle virali si possono diffondere poi nelle cellule adiacenti propagando l'infezione con un movimento a breve distanza. Questo avviene attraverso i plasmodesmi o tramite la formazione di strutture tubulari intercellulari; si tratta di un processo attivo mediato da specifiche proteine virali (proteine di movimento). Il limite di esclusione dei plasmodesmi è di 1,5 nm, quindi molto inferiore alle dimensioni dei virioni (10-80 nm). Si è dimostrato in alcuni casi che durante l'infezione le proteine di movimento inducono profonde modifiche a carico dei plasmodesmi.

Ad esempio, nel *Compea Mosaic Virus*, le proteine di movimento (MP) si assemblano nel citoplasma e si associano ai plasmodesmi allungandosi al loro interno. I virioni completi attraversano queste strutture tubulari formate, almeno in parte, da un prodotto virale (Kasteel *et al.*, 1997).

Esistono gruppi di virus (es. Fam. *Partitoviridae*) che non hanno capacità di muoversi da cellula a cellula in quanto privi di proteine con funzioni di movimento; essi si trasmettono da una cellula all'altra soltanto per divisione di cellule infette.

Il trasporto da cellula a cellula permette ai virus di spostarsi fino al raggiungimento del sistema vascolare, generalmente il floema, attraverso il quale il virus si può diffondere in modo sistemico in tutta la pianta. Il

movimento nel floema viene definito a lunga distanza. Le proteine che determinano il trasporto a lunga distanza sembrano distinte da quelle che governano il movimento da cellula a cellula.

Il ciclo di infezione si chiude con la trasmissione ad un nuovo ospite suscettibile. Essendo i virus parassiti obbligati questa è una tappa importante per la loro sopravvivenza.

1.5. TRASMISSIONE ATTRAVERSO I VETTORI

La trasmissione attraverso vettori risulta il metodo prevalente in natura (Conti, 1997), gli insetti costituiscono il gruppo più importante di vettori di virus, sia per il numero sia per l'importanza dei virus trasmessi.

In generale l'insetto vettore con apparato boccale pungente-succhiante acquisisce il virus nutrendosi su una pianta infetta e trasferisce l'inoculo nutrendosi successivamente su una pianta sana. La trasmissione si compie in più fasi:

1. Fase di *acquisizione*. È il periodo di tempo necessario affinché il vettore acquisisca il virus dalla pianta infetta alimentandosi su di essa; è indicato con AAP (*acquisition access period*).

2. Fase di *latenza*. È il periodo di tempo che intercorre tra la fase di acquisizione e la prima manifestazione dell'infettività; è indicato con LP (*latent period*).

3. Fase di *inoculazione*. È il periodo di tempo necessario affinché l'insetto trasmetta il virus ad una pianta alimentandosi su di essa; è indicato con IAP (*inoculation access period*).

Il periodo in cui il vettore conserva la capacità di trasmettere il virus dopo l'acquisizione, può variare notevolmente a seconda del virus e dell'insetto, si parla in questo caso di ritenzione d'infettività.

In base alle caratteristiche fino ad ora descritte possiamo classificare tre tipi di trasmissione: *non-persistente*, *persistente* e *semi-persistente*. Si noti che una singola specie vettrice può trasmettere, anche contemporaneamente, alcuni virus in modo *non-persistente* ed altri secondo la modalità *persistente*, mentre una specie virale è trasmessa con un'unica modalità, da una o più specie o da diversi biotipi della stessa specie.

Caratteristica della trasmissione *non-persistente* è la sua rapidità: acquisizione e inoculazione avvengono in pochi secondi senza fase di latenza (es. *Abutilon Mosaic Virus*, *Cucumber Mosaic Virus*). Questo tipo di trasmissione è effettuata esclusivamente da Afidi, perché pungono assaggiando in rapida successione per selezionare le piante; in questo modo trasmettono i virus in modo molto rapido.

Nella trasmissione *semi-persistente*, non vi è latenza né traslocazione nell'emocele e nelle ghiandole salivari, ma, prolungando il periodo di acquisizione, si aumenta la ritenzione di infettività per saturazione nei siti di assorbimento. Questo tipo di trasmissione è effettuata da Afidi e alcuni Aleuroidi, Cicaline e Cocciniglie. Con questa modalità vengono trasmessi i generi *Caulimovirus* e *Closterovirus*.

Nella trasmissione *persistente*, acquisizione e inoculazione richiedono tempi molto lunghi e l'infettività aumenta con la durata. La trasmissione persistente può essere *circolativa* o *propagativa*.

Nella trasmissione *persistente-circolativa*, il virus, acquisito attraverso l'apparato boccale, supera il rivestimento cellulare del canale alimentare e, tramite l'emocele, giunge alle ghiandole salivari da cui può essere reinoculato attraverso gli stiletto boccali. Questo tipo di trasmissione è

effettuata da Afidi (es. *Potato Leaf Roll Virus*), e da Aleuroidi (*TYLCV* trasmesso da *Bemisia tabaci*).

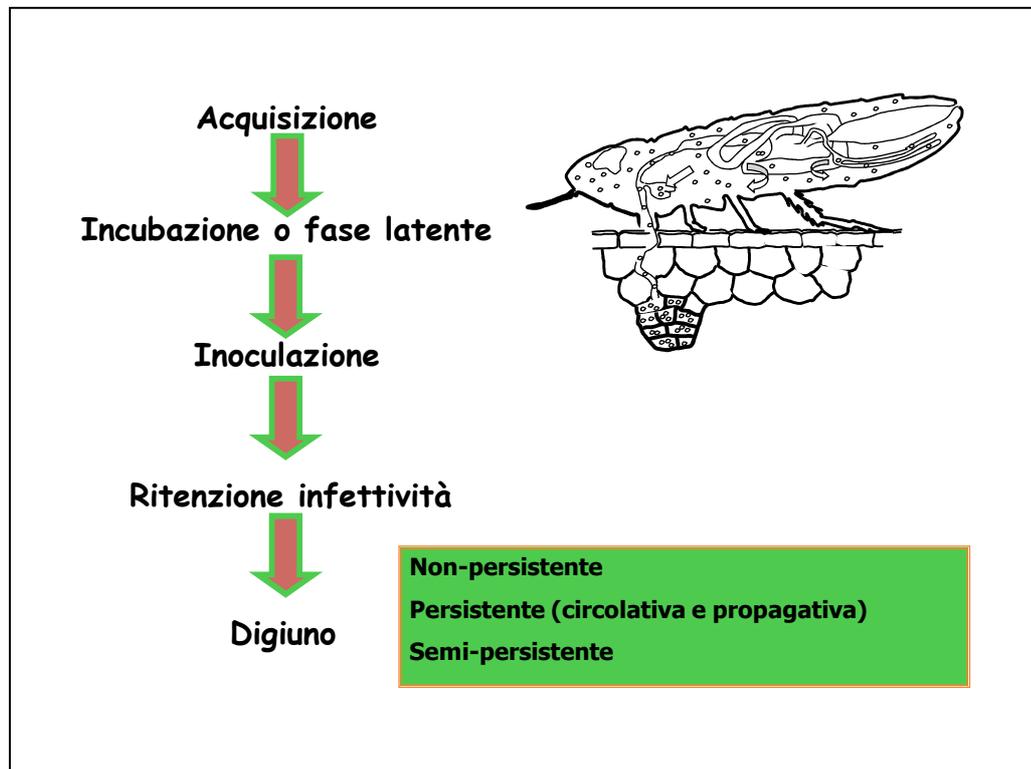


Fig. 5 – Trasmissione dei virus mediante vettori.

Nella trasmissione *persistente-propagativa*, il virus effettua un percorso simile a quello sopra descritto e, inoltre, si moltiplica nelle cellule di vari tessuti dell'insetto (epitelio intestinale, muscoli, etc.). Questo tipo di trasmissione è effettuato da Tripidi (es. *Tomato Spotted Wilt Virus*) e Omotteri auchenorrhinchi.

1.6. VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO

Il virus del mosaico del pepino (*Pepino mosaic virus*- PepMV) è una malattia causata da un virus appartenente al genere dei *Potexvirus*, famiglia *Flexiviridae*. Questa malattia è stata riscontrata per la prima volta in Perù nel 1974 in piante di pepino (*Solanum muricatum* Aiton.) (figura 6 e 7) ma è stata descritta nel 1980 (Jones *et al.*, 1980).



Fig. 6 – Pianta di pepino (*Solanum muricatum*) (foto di Kumar A.).



Fig. 7 – Frutti di pianta di pepino (*Solanum muricatum*) (foto di Kumar A.).

Successivamente il patogeno è stato riscontrato nel 1999 su piante di pomodoro nel Nord America (French *et al.*, 2001) ed in Europa nei seguenti paesi: Gran Bretagna (Mumford e Metcalfe, 2001), Olanda (Van der Vlugt *et al.*, 2000), Germania (Lesemann *et al.*, 2000), Spagna (Jordà *et al.*, 2001), Francia (Cotillon *et al.*, 2002; Maroon-Lango *et al.*, 2005), Austria (Verhoeven *et al.*, 2003). Negli ultimi anni il virus è stato riscontrato anche in Siria (Fakhro *et al.*, 2010), Sud Africa (Carmichael *et al.*, 2011), Croazia (Milanovic *et al.*, 2011), Grecia (Efthimiou *et al.*, 2011), Cipro (Papayannis *et al.*, 2012) e in Messico (Ling *et al.*, 2011) (figura 8).

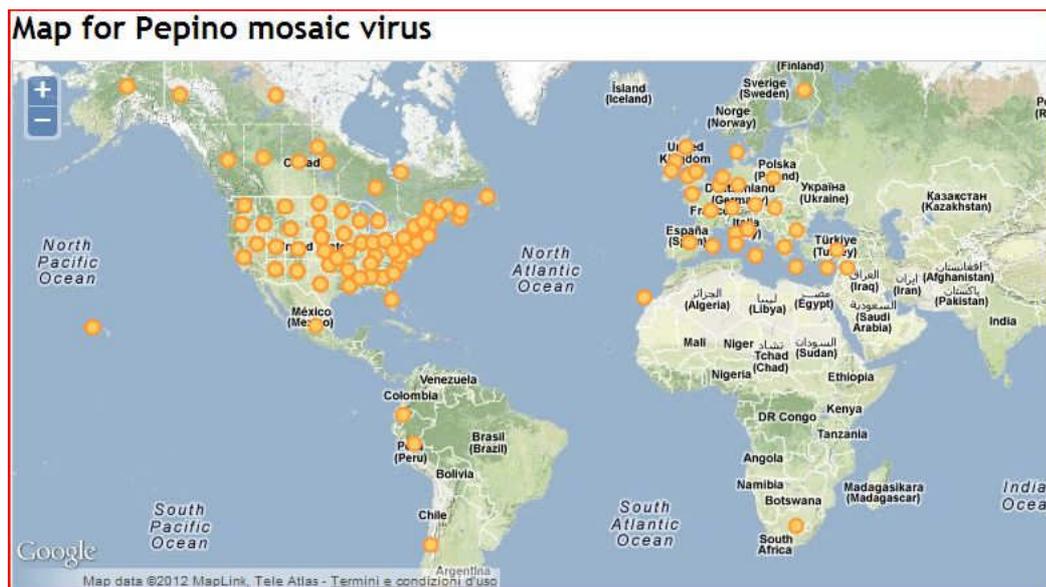


Fig. 8 – Diffusione globale del PepMV (EPPO).

In Italia (Roggero *et al.*, 2001) il virus è stato osservato per la prima volta in Sardegna nel mese di Ottobre del 2000 su poche piante infette, mentre nel mese di Marzo del 2001 la percentuale di piante infette era del 40%.

Nel 2006 il virus è stato riscontrato in coltivazioni di pomodoro in serra nel comune di Vittoria (RG) (Davino *et al.*, 2006). Successive indagini svolte in Sicilia dall'Osservatorio per le Malattie delle Piante (O.M.P.) di Acireale (CT), consolidate da specifiche ricerche effettuate dal Laboratorio di Virologia vegetale del Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA) sez. di Fitopatologia e Genetica Agraria dell'Università degli Studi di Catania, hanno messo in evidenza che la vera emergenza fitosanitaria è costituita oggi dalle gravi infezioni causate dal virus del mosaico del pepino (PepMV) che ha determinato una consistente perdita di produzione per le vistose macchie che si formano sulle bacche e rendono non commerciabili i frutti.

Una indagine per accertare la diffusione e i ceppi di PepMV in Italia è stata effettuata di recente (Tiberini *et al.*, 2010).

In alcuni paesi dell'Unione Europea (Regno Unito, Olanda, Germania, Francia) sulla scorta dei dati scientifici disponibili sono state effettuate delle analisi preliminari del rischio fitosanitario e hanno evidenziato che il virus ed i suoi effetti nocivi possono risultare molto preoccupanti per le produzioni di pomodoro in ambiente protetto. Il PepMV è stato recentemente (2012) inserito nella *A2 List* dell'EPPO (European Plant Protection Organization) come patogeno da quarantena già presenti nelle regioni dell'EPPO ma non largamente diffuso. Il virus è soggetto a norme fitosanitarie tendenti ad impedirne l'introduzione, dove non presente e la propagazione nei territori dell'Unione Europea in base alla Decisione 2004/200/CE della Commissione (27-02-2004).

1.7. TASSONOMIA, ORGANIZZAZIONE GENOMICA E CARATTERISTICHE DEI FLEXIVIRIDAE

La famiglia dei *Flexiviridae*, chiamata così perché presenta membri con virioni flessuosi, include i generi *Alexvirus*, *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Potexvirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus* e *Mandarivirus*. Le principali caratteristiche dei membri della famiglia delle *Flexiviridae* sono quelle di avere un virione di lunghezza oscillante tra i 400 e gli 800 nm con un diametro di 12-13 nm, un genoma monopartito (cioè di essere formato da una sola molecola di acido nucleico), avente senso positivo e costituito da ssRNA che presentano un numero di ORF (Frammenti di lettura aperti-*Open Readig Frame*) variante da 2 a 6.

La diffusione dei *Flexiviridae* in natura avviene principalmente per trasmissione meccanica, qualche genere ad esempio gli *Alexvirus* possono essere trasmessi da insetti e acari, oppure il genere *Carlavirus* trasmesso dagli afidi in modo non persistente.

Al genere *Mandavirus*, appartengono virus costituiti da un virione flessuoso costituito da un filamento di circa 650 nm di lunghezza e 13 nm di diametro, ed hanno una forma elicoidale. Il genoma è monopartito, ha una dimensione di 7,6 kb ed è un singolo filamento di RNA (ssRNA). Questi sono virus che comprendono sei frammenti di lettura aperta (ORF) presumibilmente trascritti da un RNA subgenomico. In natura le piante infette principalmente da questo genere di virus sono gli agrumi; la loro trasmissione non avviene attraverso gli insetti, infatti non esiste un vettore noto, ma avviene attraverso l'innesto, dove il virus rimane persistente nel materiale di propagazione. È trasmissibile anche meccanicamente in alcuni legumi e *Chenopodium* spp. La specie più rappresentativa appartenente a questo genere è il virus della maculatura anulare indiano (*Indian citrus ringspot virus - ICRSV*).

Le specie del genere *Alexvirus*, sono dei virus filamentosi e flessuosi che presentano una forma elicoidale, una lunghezza di 800 nm e un diametro di 12 nm. Il loro genoma è un ssRNA ed ha una dimensione di circa 9,0 kb, comprende 6 frammenti di lettura aperti (ORF), le prime due proteine di un triplo blocco gene (TGB) per il movimento virale tra le cellule, RNA-polimerasi RNA diretta (RDRP), serina ricca di proteine ed un rivestimento proteico di 26-29 kDa. I virus appartenenti a questo genere sono trasmessi attraverso gli acari, il materiale di propagazione dove rimane persistente, può essere trasmesso anche meccanicamente su *Allium* spp. e in alcuni casi anche a *Chenopodium murale*. I principali virus appartenenti a questo genere sono i *Garlicvirus*.

Carlavirus è un genere a cui appartengono dei virus aventi virioni filamentosi flessuosi di lunghezza variabile tra i 610-700 nm e un diametro che varia tra i 12 e 15 nm. Il suo genoma ha una dimensione di 7,4-7,9 kb, è un ssRNA che comprende 6 ORF, RNA polimerasi, triplo gene (TGB), un rivestimento proteico di circa 31-36 kDa, acidi nucleici con regolatori proteici. Le specie vegetali infette da questi virus sono poche. La maggior parte delle specie sono trasmesse da afidi in modo non-persistente, ma abbiamo ad esempio il virus della maculatura lieve della vigna (*Cowpea mild mottle virus* - CPMMV) che viene trasmesso dalla mosca bianca orti (*Bemisia tabaci* Gennadius). Al contrario dei virus che vengono trasmessi dagli insetti che sono non persistenti, quelli che infettano il materiale di propagazione, riescono a persistere su di esso. Tra i virus più importanti che infettano le cultivar di legumi troviamo: il virus della striatura necrotica del pisello (*Pea Streak Virus* - PSV), il virus del mosaico striato del trifoglio (*Red clover vein mosaic virus*- RCVMV) e CPMMV. La maggior parte delle specie appartenenti a questo genere sono trasmessi meccanicamente ed hanno una vasta gamma di ospiti.

Al genere *Foveavirus* appartengono delle specie di virus che hanno come caratteristica principale un virione filamentoso flessibile di lunghezza variabile da 800 fino a oltre i 1000 nm, un diametro di 12-15 nm ed ha una simmetria elicoidale. Il genoma di questo genere è costituito da ssRNA di dimensioni tra gli 8,7 ed i 9,3. Essi hanno la caratteristica di avere 5 ORF, il blocco gene triplo (TGB), RNA polimerasi ed un rivestimento proteico di circa 28-44 kDa. Le specie appartenenti a questo genere sono poche ed abbiamo: la butteratura del tronco del melo (*Apple stem pitting virus* - ASPV), il virus latente dell'albicocco (*Apricot latent virus* - ALV) e i virus associati alla scanalatura del legno della vite (*Rupestris stem pitting-associated virus*-

RSPaV). Nessuno di queste tre specie è trasmessa da insetti, infatti la loro infezione avviene tramite innesti, il virus rimane persistente nel materiale di propagazione. ASPV è trasmissibile meccanicamente, ma con qualche difficoltà su la *Nicotina occidentalis* e le sue sottospecie.

Capillovirus è un genere caratterizzato da virus con genoma ssRNA che hanno una dimensione di 6,5-7,4 kb, il loro filamento è flessuoso e può avere una lunghezza variabile di 640-700 nm con un diametro di 12 nm. Questo è un genere costituito da due ORF, dove il secondo si trova all'interno del primo ORF e da origine ad un rivestimento proteico di 24-27 kDa. La trasmissione di questo genere avviene tramite innesto o materiale di propagazione, dove il virus rimane persistente. Le specie di virus appartenenti al genere sono: il virus della scanalatura del tronco del melo (*Apple stem grooving virus* - ASGV), questo virus può essere trasmesso pure meccanicamente in piante di *C. quinoa* e aglio; il virus A del ciliegio (*Cherry virus A* - CVA); LiCLV (*Lilac chlorotic leafspot virus*).

Nel genere *Vitivirus* troviamo virus che hanno una forma elicoidale, costituiti da filamenti flessuosi incrociati tra di loro che possono arrivare a lunghezze di 825 nm con un diametro di 12 nm. Il suo genoma è un ssRNA costituito da 5 ORF, dove abbiamo la replica delle proteine, una proteina di 19 kDa di cui non è conosciuta la funzione, un rivestimento proteico di 22 kDa, una proteina di 10 kDa con nucleotide che presenta proprietà leganti. Il genere si trasmette principalmente meccanicamente, alcune specie come le *Grapevine* persistono nel materiale di propagazione e sono trasmessi anche per innesto. Il virus A della vite (*Grapevine virus A* - GVA) e il virus B della vite (*Grapevine virus B* - GVB) possono trasmettersi attraverso i semi e ad alcune specie di cocciniglie del genere *Pseudococcus*, *Planococcus* e *Neopulvinaria*.

Le specie del genere *Trichovirus*, sono dei virus caratterizzati da una forma elicoidale e che presentano un filamento flessuoso di circa 640-760 nm di lunghezza con un diametro variabile tra i 10-12 nm. Il loro genoma è un ssRNA con una dimensione di 7,6-8 kb, contenente tre ORF leggermente sovrapposti tra di loro, il più grande ORF è il primo che è coinvolto nella replica, mentre il secondo e terzo ORF sono tradotti da RNA sub genomico; il rivestimento proteico è 21,4 kDa. La trasmissione dei virus avviene meccanicamente, per innesto e attraverso il materiale di propagazione. Il virus T della patata (*Potato virus T* - PVT) viene trasmesso anche tramite i semi, mentre il virus della necrosi interna della bacca della vite (*Grapevine berry inner necrosis virus* - GINV), il virus della foglia macchiata del ciliegio (*Cherry mottle leaf virus* - CMLV) e il virus del mosaico del pesco (*Peach mosaic virus* - PcMV) possono essere trasmessi da acari del genere *Colomerus* e *Eriophes*.

Il genere *Potexvirus*, a cui appartiene PepMV, è un genere caratterizzato da virus privi di involucro, presentano dei filamenti di forma elicoidale e flessuosi con una lunghezza che varia tra i 450-580 nm ed un diametro di 13 nm.

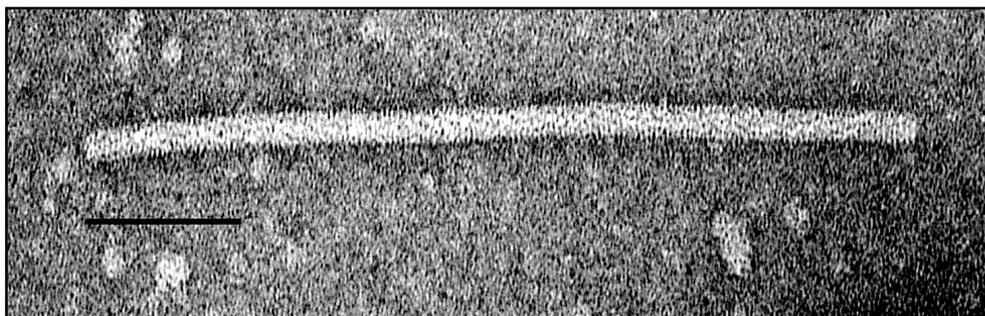


Fig. 9 – Particella virus del mosaico del pepino osservata al microscopio elettronico.

La sua struttura è costituita da un capside dove abbiamo un filamento di ssRNA positivo di dimensioni comprese tra 5,9-7,0 kb, comprende 5 frammenti di lettura aperti (ORF), dove avviene la replica delle proteine, il blocco del triplo gene (TGB), si ha un rivestimento proteico variabile da 18-27 kDa, il movimento del virus è favorito da proteine di movimento di 8-25 kDa. I virus appartenenti a questo genere si trasmettono quasi esclusivamente per via meccanica ed è difficile che si trasmettano attraverso insetti e per seme. Le sue piante ospiti sono principalmente le dicotiledoni, esso predilige un habitat con climi temperati e subtropicali. Per quanto riguarda la trasmissione per seme i risultati riportati in letteratura non concordano tra di loro. Gli unici dati certi sono che la trasmissibilità attraverso quest'organo di moltiplicazione è molto bassa (Ling, 2008).

1.8. ORGANIZZAZIONE GENOMICA DEL PEPMV E FUNZIONE GENICA

Il virus mosaico del pepino (PepMV) è un virus appartenente ad un gruppo di specie del genere *Potexvirus* della famiglia delle *Flexiviridae*. Esso è costituito da virioni non capsulati, che sono dei filamenti flessuosi di 508 nm di lunghezza e 13 nm di diametro (figura 10). Il genoma del virus è monopartito, cioè costituito da un singolo filamento molecolare, contenente acido ribonucleico (RNA), lungo circa 6,4 kb e costituito da cinque frammenti di lettura aperti (ORF), affiancato da 5' e 3' regione non tradotta (UTRs) con una coda 5'-cap e un 3'poly-A.

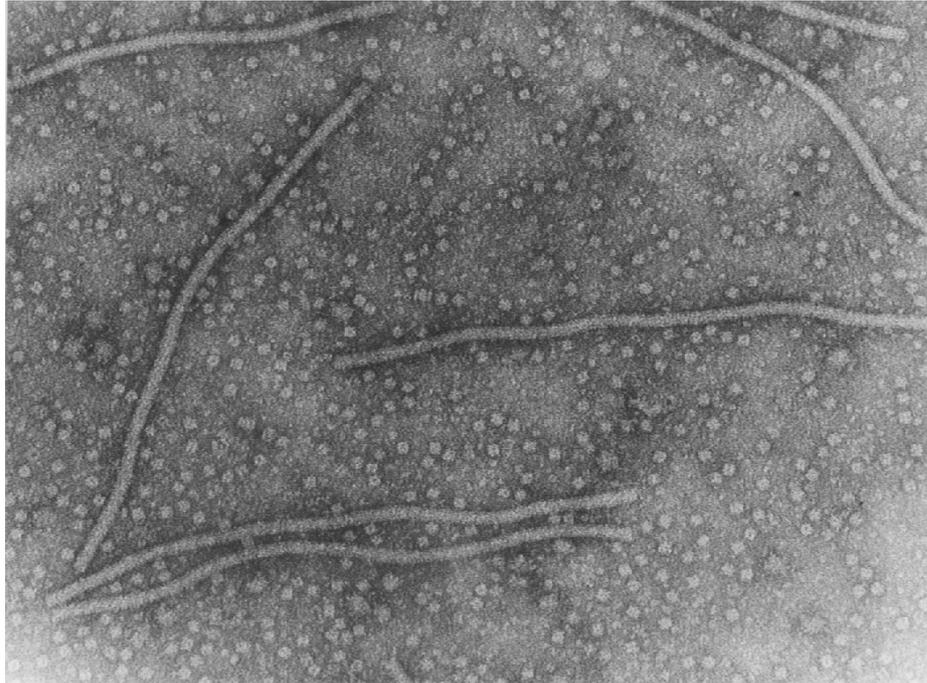


Fig. 10 – Virus del mosaico del Pepino osservato al microscopio elettronico.

Il quadro di lettura delle ORF è composto dall'ORF 1 che codifica 164 kDa RNA-dipendente RNA-polimerasi (RDRP), gli ORF 2-4 hanno tre triplo blocco gene (TGB), proteine chiamate TGBp1 (26 kDa), TGBp2 (14 kDa) e TGBp3 (9 kDa), mentre l'ORF 5 una proteina di rivestimento di 25 kDa. L'espressione genica del virus è tipica dei *Potexvirus* cioè la replicasi virale viene espressa da RNA genomico (gRNA) mentre le proteine TGB sono espresse da RNA subgenomico (sgRNAs) 1 e 2, e la proteina di rivestimento da RNA sub genomico 3 (sgRNA 3).

PepMV è un virus che possiede sei ceppi virali, uno originario del Perù, uno europeo, due sono stati scoperti negli Stati Uniti e due ceppi sono stati ritrovati in Cile.

I ceppi di PepMV ritrovati in Europa sulle colture di pomodoro tra il 2000 e il 2003 sono tutti uguali, infatti la loro sequenza nucleotidica è identica al 99%, ma messi a paragone con l'isolato originale che infetta il

pepino (Verhoeven *et al.* 2003), si differenziano chiaramente, visto che la loro sequenza nucleotidica è identica solo al 96%. Inoltre, mentre l'isolato originale di pepino è asintomatico sulle piante di pomodoro, l'isolato europeo ha causato una grande varietà di sintomi sui frutti e parti vegetali della pianta (van der Vlugt *et al.* 2000, French *et al.* 2001, Mumford e Metcalfe 2001, Cotillon *et al.* 2002, Aguilar *et al.* 2002). Così viste le differenze tra questi isolati ed il ceppo originale, si è deciso di designare il quest'ultimo come "ceppo europeo" di PepMV (Mumford e Metcalfe 2001; Pagà *et al.* 2006; Verhoeven *et al.* 2003). Dal 2005, nuovi genotipi che condividono solo l'80% delle sequenze di nucleotidi con il ceppo europeo, sono stati identificati su culture di pomodoro provenienti dagli Stati Uniti (US1 e US2) (Maroon-Lango *et al.* 2005) e da semi di pomodoro provenienti dal Cile (CH1 e CH2) (Ling, 2006).

Osservazioni condotte in Nord Americana hanno dimostrato che i quattro maggiori genotipi cioè PepMV EU, US1, US2 e Ch2 sono presenti (Ling *et al.*, 2008). Indagini sulla struttura genetica delle popolazioni di PepMv sono state effettuate anche in Spagna (Pàgan *et al.*, 2006).

Osservando la sequenza nucleotidica del ceppo US2 si è osservato che è un ricombinante dell'US1 e CH2, per questo è stato recentemente proposto di distinguere quattro genotipi di PepMV: il genotipo originale peruviano (PL), il genotipo europeo (UE), il genotipo americano US1 e il genotipo cileno CH2 (Hanssen *et al.*, 2010). Dopo il predominio iniziale del genotipo dell'UE nelle produzioni di pomodoro europeo, si è verificato uno spostamento della popolazione del genotipo CH2, che è stata segnalata in diversi paesi europei (Gòmez *et al.*, 2009). Recentemente, il genotipo LP è stato segnalato nelle produzioni di pomodoro belga ed il genotipo US1 è stato isolato in serre delle isole

Canarie dove si sono visualizzate su foglie vesciche e mosaico (Alfaro-Fernández *et al.*, 2008). La sequenza completa del genoma di PepMV riscontrata in Sicilia è stata pubblicata nel 2011 (Tiberini *et al.*, 2011). Recentemente è stato dimostrato che PepMV esiste come una quasi specie (Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2010).

Ad oggi in Europa sono stati segnalati isolati blandi ed isolati virulenti che causano gravi necrosi sulle piantine di pomodoro (Hascow – Jaraszewska e Borodynko, 2012).

1.9. PROCESSO DI INFEZIONE E REPLICAZIONE DEI FLEXIVIRIDAE

Il processo d'infezione dei *Flexiviridae* inizia quando il virus viene portato all'interno delle cellule epidermiche della pianta attraverso vettori, attraverso tessuti di piante già infette (ad esempio con l'innesto), oppure quando viene immesso attraverso microlesioni del rivestimento cuticolare. Una volta che il virus penetra all'interno delle cellule da subito inizio alla sua replicazione rilasciando il suo materiale genetico nel citoplasma, qui l'RNA virale sarà tradotto dall'RNA polimerasi, prodotto dalla pianta, come un mRNA così da origine all'RNA-dipendente RNA-polimerasi (RDRP), codificata dal 5' ORF. Avvenuto questo passaggio si avrà la formazione di un RNA complementare utilizzando l'RNA virale, il nuovo RNA ottenuto verrà sintetizzato utilizzando l'RNA negativo come modello. Intanto i promotori subgenomici sono utilizzati per la trascrizione del sgRNAs (RNA sub genomico), che servirà per la produzione delle proteine del capsido e del movimento. Finito questo

processo si avrà la formazione di nuove cellule virali che si diffonderanno in tutta la pianta.

1.10. CARATTERISTICHE BIOLOGICHE DEL PEPMV

1.10.1. TRASMISSIONE

Il virus PepMV è altamente contagioso e viene trasmesso principalmente per via meccanica attraverso attrezzi di lavoro, le scarpe, i vestiti, le mani ed il contatto tra pianta e pianta. I lavoratori delle serre trasmettono facilmente il virus. È sufficiente il semplice contatto tra le piante per avere la trasmissione. Il periodo di incubazione del virus (prima della comparsa dei sintomi) è di circa 10 giorni, tempo variabile anche in funzione delle condizioni ambientali e della quantità di virus inoculato. Il virus rimane infettivo per circa 14 giorni sugli attrezzi da lavoro, sugli indumenti utilizzati dagli operatori e sulle superfici con cui sono venute a contatto le piante infette e persino sulle mani degli stessi operatori. Il virus può rimanere vitale anche nelle strutture e nei residui vegetali secchi ad esempio le radici essiccate del pomodoro dov'è stato accertato che persiste per 4 settimane; con temperature che variano tra 18-21°C può rimanere infettivo anche per 90 giorni.

In alcuni Paesi europei sono stati effettuati degli esperimenti per osservare la trasmissione dei virus attraverso gli insetti, le specie utilizzate sono state larve di *Macrolophus caliginosus* (è un miride predatore di aleurodidi molto diffuso nel bacino del Mediterraneo) ed i bombi (*Bombus terrestris*) (figura n. 11) insetti imenotteri della famiglia delle

Apidae (Lacasa *et al.*, 2003; Davino *et al.*, 2010). I risultati hanno accertato che il virus può essere trasmesso anche da insetti impollinatori.



Fig. 11 – Bombo nella fase di prelevamento del polline su pomodoro (foto di Nelson DeBarros)

Si può avere anche una trasmissione del virus a lunga distanza attraverso semi di pomodoro infetti dove il virus si annida nella polpa dei frutti presente sul tegumento esterno del seme, però questo tipo di trasmissione può avvenire solo in presenza di semi non trattati né fisicamente né chimicamente e in casi molto rari (Hassen *et al.*, 2010).

Prove effettuate da Ling su 10.000 semenzali di pomodoro i cui semi erano stati prelevati da piante infette da PepMV ha dimostrato che nessuno di essi era infetto, mentre altri AA in prove analoghe portano una percentuale di infezione variabile dall'0,005% al 0,057%. La modesta % di piante infette ottenute attraverso il seme deve essere tenuto in massima considerazione e non è da trascurare in quanto il virus è molto contagioso per via meccanica quindi una sola pianta può infettare un'intera serra. Anche Ling riporta la presenza del virus sui tegumenti del seme quindi delle trasmissioni casuali potrebbero avvenire anche per questa via (Ling, 2008). Prove condotte da diversi ricercatori nell'ambito del progetto "Pepeira" hanno fatto emergere che la contaminazione delle piantule all'emergenza è solo su una percentuale bassissima di piantine (3 su 5.200 piantine e 2 su 8.200 rispettivamente).

La Comunità alla luce degli ingenti danni che può causare PepMV ha finanziato un Progetto denominato "Pepeira" da svolgere in 3 anni ove partecipano 17 Paesi europei: Belgio, Bulgaria, Cipro, Danimarca, Estonia, Francia, Germania, Grecia, Italia, Norvegia, Olanda, Polonia, Portogallo, Regno Unito, Slovenia, Spagna, Ungheria e 20 Istituzioni di ricerca (una Istituzione per Stato ad eccezione dell'Olanda che partecipa con tre Istituzioni e la Spagna con due).

Per l'Italia partecipa il CRA, Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma (Responsabile Dr L. Tomassoli) e durante il 3 anno è stato inserito per collaborare il Dipartimento "DEMETRA" dell'Università degli Studi di Palermo (Responsabile Dr S.W. Davino).

1.10.2. SINTOMI DELLA MALATTIA IN PIANTE DI POMODORO

Le piante di pomodoro che vengono infettate dal virus PepMV normalmente manifestano i sintomi dopo 2-3 settimane dall'infezione e si diffondono generalmente per contatto sulla fila, la sintomatologia può manifestarsi con modalità ed intensità differenti soprattutto nei periodi freddi come in inverno e in primavera ove i sintomi della malattia sono più accentuati rispetto ai periodi caldi dove invece i sintomi possono non manifestarsi e quindi rimanere latenti.

Nelle infezioni precoci le piante infette mostrano spesso nanismo, con foglioline a lembo ridotto e maggiormente inciso, tali da conferire all'apice un aspetto simile a quello dei danni provocati da erbicidi e/o ormonature.

Nelle foglie apicali o mediane a volte si possono osservare delle decolorazioni e macchie scure; nelle infezioni tardive i nuovi getti possono mostrare mosaico clorotico. Le foglie più basse evidenziano alterazioni brune o necrotiche simili a danni da repentini abbassamenti termici; altri sintomi fogliari consistono in smerlettatura del margine della foglia e bollosità (figura n. 12) oppure si possono osservare macchioline giallo pallido che evolvono in chiazze angolari giallo brillante (figura n. 13). Sul fusto si possono notare striature brune così come sul grappolo florale e sul palco fruttifero (figura 15). Le infezioni precoci causano malformazioni e riduzione dello sviluppo, mentre le infezioni tardive possono provocare sintomi anche sui frutti. Osservazioni sulla resa e qualità dei frutti sono stati effettuati nel Regno Unito (Spence *et al.*, 2006). Quest'ultimi mostrano butterature necrotiche e macchie decolorate di aspetto marmoreo e pertanto, appaiono irregolarmente maturi (figura n. 16). Il calice dei frutti infetti può mostrare vistosi arrossamenti (figura n. 17). La prima manifestazione è più evidente sui frutti della tipologia "cherry", mentre la seconda è più facilmente

riscontrabile nelle varietà cosiddette “a grappolo”. I sintomi possono manifestarsi solo sulle foglie o sui frutti, oppure possono mostrarsi solo su alcuni grappoli intermedi e non necessariamente in quelli che si formano in seguito. Sino ad oggi i sintomi del mosaico del pepino evidenziati nel territorio della fascia ragusana sono spesso associati alla contemporanea presenza del virus della clorosi infettiva del pomodoro (TICV). I danni e le perdite economiche causati da PepMV variano moltissimo e possono essere attribuite a differenti sintomatologie causati da differenti isolati di PepMV.



Fig. 12 – Smerlettatura del margine fogliare e bollosità causate dal virus del mosaico del pepino (PepMV).



Fig. 13 –Ingiallimenti e imbrunimenti irregolari su foglie di pomodoro.



Fig. 14 – Foglie con alterazioni necrotiche.



Fig. 15 – Striature brune sul grappolo.



Fig. 16 – Arrossamento dei sepali del calice di bacche di pomodoro.



Fig. 17 – Butterature e necrosi causate da infezioni miste del virus del mosaico del pepino e del virus della clorosi infettiva del pomodoro.

1.10.3. PIANTE OSPITI

È stato osservato che il virus del mosaico del pepino in natura è capace di infettare le piante di pomodoro (*Lycopersicum esculentum* Mill.) in qualunque parte del mondo, mentre infetta piante di amaranto (*Amaranthus retroflexus* L.), malva (*Malva sylvestris* L.), sonco (*Soncus oleraceus* L.), tabacco (*Nicotiana glauca* R. Grah.), erba morella (*Solanum nigrum* L.) solamente in Spagna, oltre al citato pepino (*Solanum muricatum* Aiton.). Le piante ospiti sperimentali, cioè quelle piante in cui vengono fatti esperimenti per osservare il comportamento del virus, sono

principalmente le *Solanaceae*. Gli isolati europei infettano sistematicamente le piante di pomodoro, melanzana (*Solanum melongena* L.), alcune cultivar di patata (anche in modo latente), pepino, stramonio comune (*Datura stramonium* L.), erba morella comune, alcune specie di tabacco (*Nicotiana sp.pl.*) quali *Nicotiana benthamiana* L. Differenti cultivar di tabacco sono risultate infettabili solo localmente. Non risultano suscettibili alcune cvv di peperone (*Capsicum annuum* L.), cetriolo (*Cucumis sativus* L.) e zucchini (*Cucurbita pepo* L.). Sono state riscontrate lievi differenze tra gli isolati di origine europea e con l'isolato peruviano del pepino. Recentemente alla lista degli ospiti (tabella n. 1) sono stati aggiunti il basilico (*Ocimum basilicum* L.) (figura 18) e petunia (*Petunia hybrida*) (figura 19) riscontrate in Sicilia (Davino *et al.*, 2009), aglio (*Allium sativum*), fava (*Vicia faba*) riscontrate in Germania (Fakhro *et al.*, 2011), crisantemo (*chrysanthemum segetum*) e calendula (*calendula arvensis*) (Lambros *et al.*, 2011). Le specie di *solanaceae* ove si riscontrano più danni sono il pepino ed il pomodoro.

Tabella 1 – Piante ospiti naturali di PepMv riscontrate in aree geografiche del mondo.

FAMIGLIA	SPECIE
<i>Aizoaceae</i>	<i>Tetragonia espansa</i>
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Amaranthus graecizans</i>
	<i>Amaranthus retroflexus</i>
	<i>Amaranthus viridis</i>
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium amaranti color</i>
	<i>C. murale</i>
	<i>C. quinoa</i>

<i>Compositae</i>	<i>Calendula arvensis</i>
	<i>Chysanthemum segetum</i>
	<i>Onopordum cyprium</i>
	<i>Sonchus asper</i>
	<i>S. olaraceus</i>
	<i>S. tenerriumus</i>
<i>Convolvulaceae</i>	<i>Convolvulus arvensis</i>
	<i>C. humilis</i>
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucumis sativus</i>
<i>Fabaceae</i>	<i>Vicia faba</i>
<i>Labiatae</i>	<i>Ocimum basilicum</i>
<i>Liliaceae</i>	<i>Allium sativum</i>
<i>Malvaceae</i>	<i>Malva neglecta</i>
	<i>M. nicaeensis</i>
	<i>M. parvi flora</i>
	<i>M. sylvestris</i>
<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago lagopus</i>
	<i>P. major</i>
<i>Solanaceae</i>	<i>Datura innoxia</i>
	<i>Capsicum annuum</i>
	<i>Lycopersicon chilense</i>
	<i>L. esculentum</i>
	<i>L. pipinellifolium</i>
	<i>Nicandra physaloides</i>
	<i>Nicotina degne</i>
	<i>N. glutinosa</i>
	<i>N. occidentalis</i>

	<i>N. megalosiphon</i>
	<i>N. rustica</i>
	<i>N. tabacum</i> “Samsun”
	<i>N. tabacum</i> “White Burley”
	<i>N. tabacum</i> “Xanthi” NC
	<i>Petunia hybrida</i>
	<i>Physalis floridana</i>
	<i>P. peruviana</i>
	<i>Solanum brachycarpum</i>
	<i>S. brevidens</i>
<i>Solanaceae</i>	<i>S. cardiophyllum</i>
	<i>S. chancayense</i>
	<i>S. curtilobum</i>
	<i>S. demissum</i>
	<i>S. demissum</i> × <i>S. Tuberosum</i>
	<i>S. dulcamara</i>
	<i>S. megistacrolobum</i>
	<i>S. melongena</i>
	<i>S. microdontum</i>
	<i>S. mochicense</i>
	<i>S. muricatum</i>
	<i>S. nigrum</i>
	<i>S. raphanifolium</i>
	<i>S. stentomum</i>
	<i>S. stoloniferum</i>
	<i>S. tuberosum</i>



Fig. 18 – Sintomi di PepMV su foglie di basilico.



Fig. 19 – Foglie di petunia con vistosi sintomi di PepMV.

1.10.4. DIAGNOSI E INDIVIDUAZIONE DEL PEPMV

I metodi di diagnosi del virus del mosaico del pepino non si possono basare esclusivamente sull'osservazione dei sintomi, perché essi si manifestano più chiaramente sui frutti o sulle foglie solo in determinati periodi dell'anno. Inoltre diversi genotipi di piante ospiti risultano asintomatiche. Buoni risultati di diagnosi sono stati raggiunti mediante i saggi DAS-ELISA, attraverso metodi molecolari (PCR), immunomicroscopia elettronica o trasmissione in ospiti suscettibili, quali specie diverse di tabacco, pepino, stramonio e diverse linee di patata. Attualmente esistono diversi antisieri poli e monoclonali o dei kit specifici (lateral flow) che ci consentono di effettuare la diagnosi in laboratorio o direttamente in campo.

Il metodo ELISA (*Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay*) ossia saggio immunologico con anticorpi legati ad enzima è un saggio sierologico, basato sul riconoscimento specifico della proteina di rivestimento del virus (capside) ad opera degli anticorpi prodotti da un animale a sangue caldo (generalmente coniglio) in laboratorio in cui è stata preventivamente iniettata una certa quantità del virus stesso.

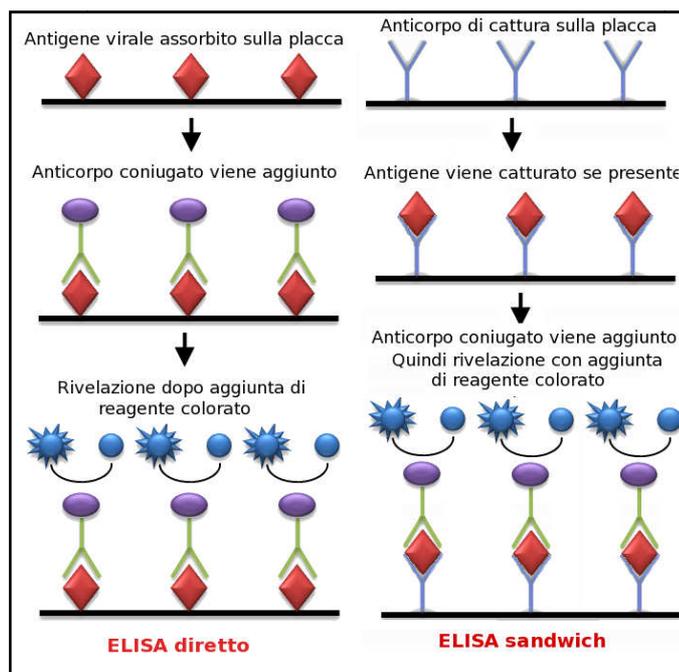


Fig. 20 – Schema test ELISA.

Il metodo utilizzato per il riconoscimento del PepMV è quello diretto o DAS, questo procedimento di diagnosi si sviluppa in diverse fasi:

1) **Coattazione della piastra a 96 pozzetti:** si prepara una sospensione di IgG, diluendolo in soluzione tampone di coattazione (coating buffer). Si riempiono quindi le pozzette delle piastre con 200 ml di sospensione di IgG e si lascia incubare per qualche ora a 30-35°C per circa 4 ore, coprendola con un coperchio (al fine di limitare l'evaporazione). Durante questo periodo di incubazione una certa quantità di anticorpi, per un fenomeno di adsorbimento specifico, aderisce alle pareti e al fondo del pozzetto, rimanendo saldamente attaccata per tutta la durata della prova.

2) **Lavaggio:** in questa fase si effettua lo svuotamento ed il lavaggio dei pozzetti con soluzione tampone (wash buffer) per

mezzo di una spruzzetta. Dopo quattro lavaggi la piastra viene asciugata sulla carta bibula. A questo punto la piastra contiene solo gli anticorpi adsorbiti durante la precedente operazione.

3) Preparazione e distribuzione dei campioni: il materiale vegetale su cui si effettua la prova è generalmente costituito da foglie, fiori, porzioni di fusto, ecc. Questo materiale viene schiacciato per mezzo di mortai o triturato con l'aggiunta di soluzione tampone (extraction buffer).

Ottenuto l'estratto vegetale per ogni campione se ne metteranno 200 ml in ogni pozzetta della piastra, servendosi di una micro pipetta.

Estratti ottenuti da piante sicuramente sane, ed altri da piante sicuramente infette, dovranno essere distribuiti in alcune pozzette, in modo da avere dei testimoni sani e infetti che confermino rispettivamente l'assenza o la presenza di reazione al termine della prova. Uno o due pozzette verranno riempiti solo di soluzione fisiologica per valutare l'intensità della reazione del substrato in assenza di succo vegetale.

A questo punto la piastra verrà posta in un frigorifero e lasciata a riposo fino al giorno successivo (14-16 ore). Durante questo periodo le eventuali particelle virali omologhe rispetto agli anticorpi specifici verranno trattenute, come incollate alla superficie degli anticorpi che già aderivano alle pareti delle pozzette.

4) Lavaggio: anche in questo caso si effettuano una serie di quattro lavaggi come descritto prima. Al termine di questi lavaggi, sulla superficie delle pozzette che contenevano estratto

infetto, saranno presenti, oltre agli anticorpi specifici, anche le particelle del virus omologo che si sta cercando.

5) Preparazione e distribuzione del “coniugato”: appena terminato il lavaggio della piastra, si diluisce opportunamente il coniugato in soluzione tampone (conjugate buffer) a secondo delle diluizioni indicate dalla ditta produttrice e si distribuiscono 200 ml per ogni pozzetta a secondo dal numero dei campioni da analizzare. La piastra viene quindi chiusa come al solito e tenuta a 30-35°C per 4 ore. Durante questo periodo le particelle di coniugato aderiscono, tramite la loro porzione anticorpale, alle particelle di virus eventualmente presenti e anche le molecole di enzima, che in precedenza erano state legate chimicamente agli anticorpi.

6) Lavaggio: viene eseguita come descritto al punto 2.

7) Preparazione e distribuzione del substrato: subito dopo aver terminato il lavaggio, si scioglie il *p-nitrofenilfosfato* alle concentrazioni riportate in precedenza in soluzione tamponata per substrato (substrate buffer), ottenendo una soluzione incolore. Il substrato andrà rapidamente distribuito nelle pozzette della piastra.

La piastra si pone su un visore a temperatura ambiente, controllandola periodicamente per una, due ore o comunque fino a reazione avvenuta. Questa reazione consiste nella idrolisi del *p-nitrofenilfosfato* a *p-nitrofenolo*, catalizzata dall'enzima e rivelata dal colore giallo che acquista la soluzione.

8) Bloccaggio della reazione: viene eseguita aggiungendo a tutte le pozzette 50 ml di soluzione di bloccaggio, al termine della reazione. Ciò è necessario soltanto se la lettura viene

rimandata oppure se la lettura viene effettuata mediante un lettore per piastre ELISA.

9) Valutazione dei risultati: nelle pozzette dov'è presente il virus, si noterà entro un ora, dalla distribuzione della soluzione del substrato, un progressivo ingiallimento della stessa, mentre in quelle con il testimone sano o in assenza di virus la soluzione rimane incolore. Solo in casi sporadici si può osservare verificare l'ingiallimento delle pozzette del sano, ciò è causata da un errore nella procedura o da contaminazioni dei campioni e dei substrati.

Se i controlli sono regolari (pozzette del testimone infetto gialle, pozzette del testimone sano e quelle contenenti soluzione fisiologica incolore) si può passare all'esame dei campioni.

Questi saranno considerati infetti se più o meno corrispondenti a quelli del testimone infetto, sani, se incolore, dubbi, se leggermente gialli. Per una valutazione più precisa, oltre il visore, si può usare utilizzare un lettore per piastre ELISA.

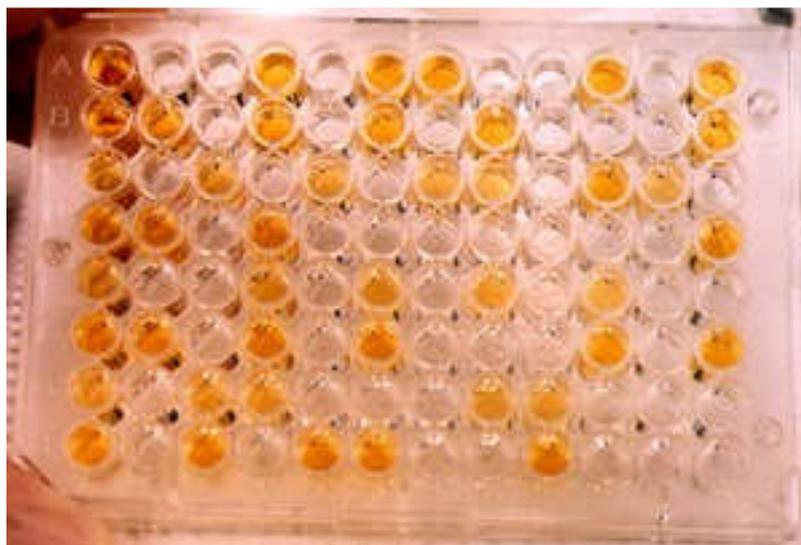


Fig. 21 – Piastra sviluppata del test ELISA.

L'immuno-microscopia elettronica o metodo I.S.E.M. (dall'inglese: immuno-sorbent-electron-microscopy) è un metodo di diagnosi basato sulla reazione fra anticorpo e antigene, dove l'avvenuta reazione è osservata al microscopio elettronico.

Un metodo che a differenza dei due precedenti, che devono essere effettuati in strutture adeguatamente attrezzate ed effettuate da personale specializzato, può essere svolto direttamente in pieno campo. Questo metodo è stato studiato nell'università di Torino e si basa su una tecnica già utilizzata nell'ambito medico, si tratta del Lateral Flow (LF) (figura n. 22, 23 e 24).

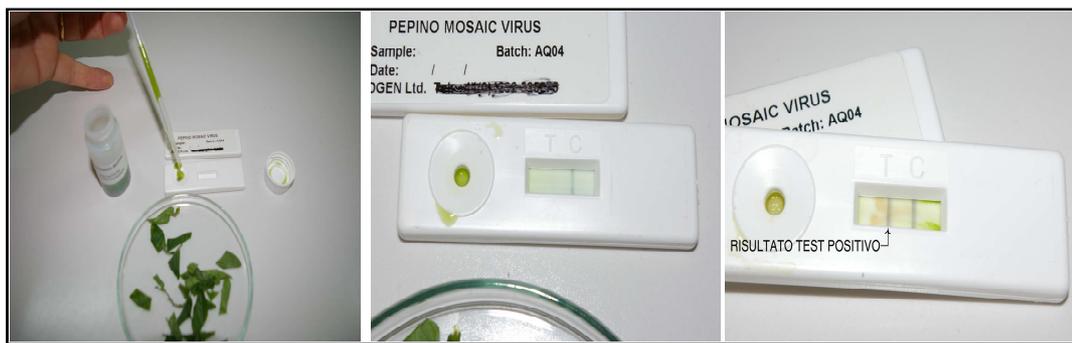


Fig. 22 – Test lateral flow.

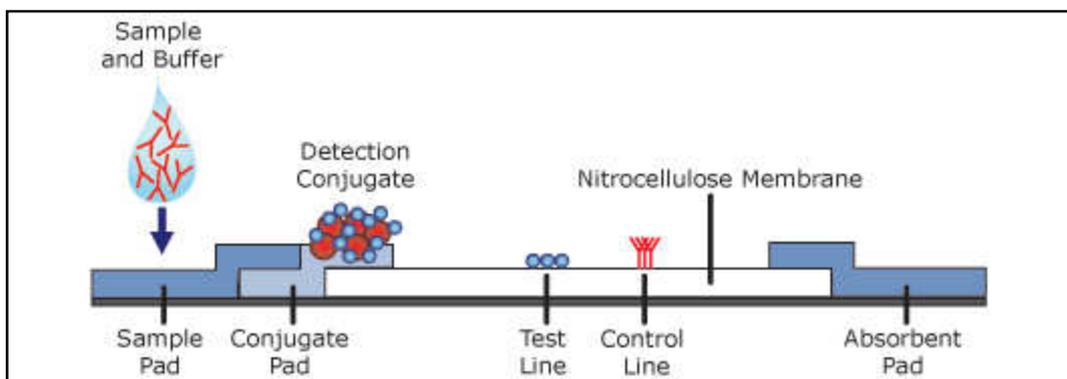


Fig. 23 – Schema test Later Flow.

Il dispositivo consiste in una membrana cromatografica inserita tra due supporti in plastica. Sulla faccia superiore sono presenti un pozzetto per il caricamento dell'estratto vegetale da analizzare ed una finestra per la lettura del risultato, contrassegnata dalle lettere T (Test) e C (Controllo). Sotto la zona di deposizione del campione (*sample pad*) è collocato un reagente rivelatore, ottenuto coniugando anticorpi anti-virus con oro colloidale (rosso) essiccato su fibra di vetro (*conjugate pad*). Gli stessi anticorpi sono immobilizzati sulla membrana formando una linea perpendicolare alla direzione di flusso in corrispondenza della lettera T. Anticorpi di capra anti-coniglio o anti-topo sono immobilizzati a formare un'altra linea in corrispondenza della lettera C. Una zona assorbente (*absorbent pad*) situata all'estremità opposta del *sample pad* favorisce il flusso del campione lungo la membrana per capillarità. La diagnosi viene effettuata omogeneizzando manualmente una piccola quantità di tessuto vegetale in un adeguato tampone di estrazione, in rapporto di circa 1:20 peso/volume, e 3-4 gocce dell'estratto vengono depositate nell'apposito foro. Il coniugato rivelatore viene solubilizzato e forma un complesso con il virus se presente. Il complesso si diffonde lungo la membrana per capillarità e, non appena raggiunge la linea di anticorpi di cattura (T), il complesso viene trattenuto secondo uno schema a "sandwich". Le particelle in eccesso si continuano a diffondere sino alla linea di controllo, dove sono nuovamente bloccate. I campioni positivi danno luogo alla formazione di due linee colorate; quelli negativi invece formano una sola linea quella di controllo. L'intensità della colorazione rossa è proporzionale (in un determinato intervallo) alla concentrazione di virus nel campione. I risultati vanno valutati entro 10 minuti (Roggero *et al.*, 2002).

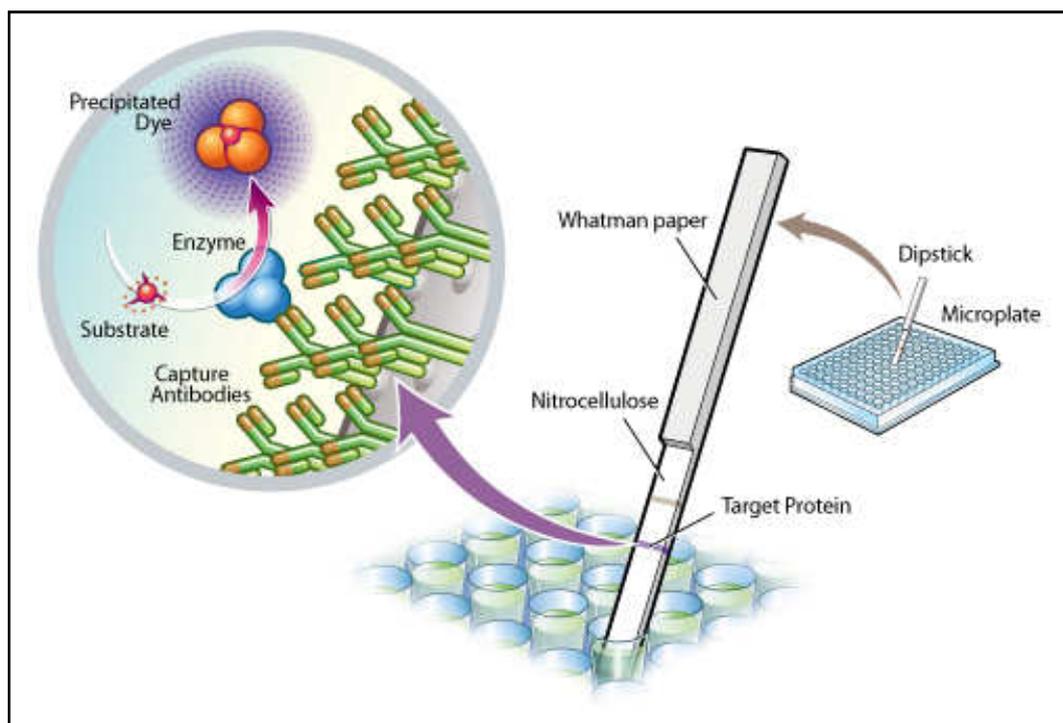


Fig. 24 – Test lateral flow modello Dipstick.

Uno dei metodi molecolari più utilizzati per la diagnosi del PepMV è la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) reazione a catena della polimerasi. Questa tecnica biomolecolare permette di ottenere la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici (DNA e RNA) dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. Questo processo viene svolto da un enzima (DNA-polimerasi), ottenuto da un batterio termofilo (*Thermus aquaticus*) denominato Taq polimerasi, in grado di sintetizzare nuove catene di DNA ad alta temperatura (72°C), figura n. 25.

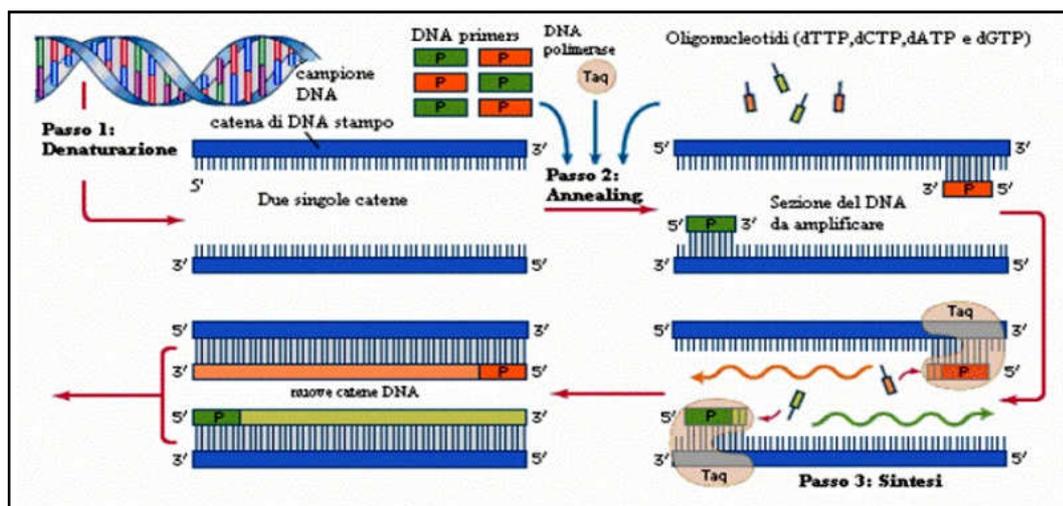


Fig. 25 – Reazione a catena della polimerasi (PCR).

I componenti essenziali della miscela di reazione della PCR sono:

- ✓ il DNA bersaglio (sequenza da amplificare);
- ✓ Taq polimerasi (polimerasi termo-resistente);
- ✓ Primer "inneschi", (brevi sequenze di DNA oligonucleotidici complementari uno all'estremità 3' e l'altro all'estremità 5' del segmento di DNA che si vuole amplificare);
- ✓ Deossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs) da polimerizzare;
- ✓ Ioni magnesio (indispensabili per il corretto funzionamento della DNA polimerasi);

La reazione di amplificazione prevede tre fasi:

1. Denaturazione (separazione): il ds-DNA bersaglio (DNA a doppia catena) è denaturato alla temperatura di circa 95°C viene scisso in DNA a singola catena .
2. Appaiamento ("annealing"): i primer oligonucleotidici complementari alle due estremità 3' della sequenza da amplificare

ibridano con i due filamenti denaturati ad una temperatura di 40-55°C;

3. Estensione: i primer oligonucleotidici, alla temperatura di 65-72°C, in presenza dei quattro deossinucleotidi trifosfati e della Taq polimerasi, vengono estesi ognuno in direzione dell'altro ma su due diverse catene complementari portando alla sintesi di due molecole di ds-DNA copie della regione bersaglio delimitata dagli inneschi.

Il ciclo può essere ripetuto anche fino a 60 volte, portando all'amplificazione esponenziale del DNA bersaglio (DNA target) e quindi alla formazione del cosiddetto “prodotto di amplificazione” o amplicone.

Dopo che tutti i parametri della reazione sono terminati si è in grado di rilevare la presenza di un patogeno a partire da poche copie del suo acido nucleico, infatti è noto che, in un estratto perfettamente purificato sono sufficienti pochi frammenti di DNA per avviare una reazione di amplificazione con le normali tecniche elettroforetiche (gel di agarosio o di poliacrilammide). Fra gli enzimi di modificazione conosciuti fino ad ora non esistono polimerasi in grado di sintetizzare ex novo frammenti di acido nucleico utilizzando come stampo una molecola di RNA; quindi per l'individuazione di un virus ad RNA come il PepMV viene utilizzata una trascrizione preliminare, detta retro-trascrizione (RT, reverse transcription), dove si formerà una molecola di DNA, denominata DNA complementare (cDNA) utilizzata come stampo per la successiva PCR. La combinazione delle due reazioni viene chiamata RT-PCR e può partire dalla produzione di un cDNA specifico dello stampo oppure può basarsi sulla sintesi di un pool di cDNA dai quali, nella PCR successiva, verrà amplificato il frammento di gene

successivo. Nel primo caso la molecola di cDNA si ottiene grazie all'azione di innesco di un primer specifico per il virus mosaico del pepino. Nel secondo caso invece viene sintetizzata una misura di cDNA, in quanto viene utilizzata, come innesco per la retro-trascrizione, una miscela di esanucleotidi aventi sequenze differenti, così da ottenere la sintesi di frammenti di DNA diversi tra loro; l'aggiunta di primer specifici permetterà l'amplificazione solamente del cDNA complementare relativo al patogeno.

Attualmente sono state messe a punto diverse tecniche per la diagnosi di ceppi diversi di PepMV (Ling *et al.*, 2007; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2009).

In Spagna hanno messo a punto una nuova tecnica RT-PCR che riesce ad evidenziare mediante un unico saggio tre distinti gruppi di PepMV (Alfaro-Fernández *et al.*, 2009). Molte tecniche sono state sviluppate per la diagnosi de virus una delle ultime messa a punto anche per PepMV denominata “metagenomic analysis” che non richiede conoscenza dell'ospite e del patogeno (Adams *et al.*, 2009). Recentemente è stata messa a punto una nuova tecnica di diagnosi per accertare contemporaneamente infezioni di PepMV ed altri 6 virus che infettano il pomodoro (Panno *et al.*, 2012); Prigemyslaw e Obrepalska – Steplowska, 2013) o infezioni di PepMV ed altri 3 virus (Beibei *et al.*, 2013). Un'altra tecnica denominata Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) è stata messa a punto per la diagnosi del virus (Haslòw – Jaroszevska e Borodynko, 2013; Ling *et al.*, 2013).

1.10.5. CONTROLLO DEL PEPMV

Le strategie di controllo del virus PepMV, sono come per tutte le virosi, delle strategie preventive perché non esistono in commercio prodotti in grado di controllare e bloccare la malattia. Esse vengono distinte nei seguenti mezzi di difesa: mezzi chimici, mezzi fisici, pratiche colturali, mezzi tecnologici (che vengono distinti in mezzi tradizionali e mezzi biotecnologici). Molto importanti però sono le misure di prevenzione ed i continui monitoraggi degli ambienti protetti per evitare in caso di comparsa del virus l'espansione della malattia in tutta la serra (Davino *et al.*, 2009).

1.10.6. PREVENZIONE

La prevenzione è un insieme di azioni che vengono svolte per impedire la diffusione dei virus tra i vari Stati del mondo o all'interno delle strutture produttive. Per questo sono stati diffusi dei protocolli dalla Commissione Europea, per evitare il diffondersi del patogeno all'interno degli Stati membri e sono state create apposite norme da rispettare rigorosamente per gli addetti alle operazioni colturali all'interno delle strutture di produzione.

Il virus del PepMV è stato inserito recentemente tra gli organismi della *A2 list* dell'EPPO (European Plant Protection Organization), considerato un virus da quarantena. Esso è soggetto a norme fitosanitarie tendenti ad impedirne l'introduzione, dove non presente, e propagazione nei territori dell'Unione Europea in base alla Decisione 2004/200/CE della Commissione (27/02/2004).

Questa decisione ha portato alla formazione di sei articoli e due allegati qui di seguito citati:

Articolo 1

Sono vietati l'introduzione e il trasporto nella Comunità Europea di sementi di pomodoro, (*Lycopersicon lycopersicum* L.) contaminate dal virus del pepino.

Articolo 2

Le sementi di pomodoro originarie di paesi terzi possono essere importate nella Comunità Europea soltanto se soddisfano le condizioni di cui al punto 1 dell'allegato. Esse sono ispezionate e se necessario, sottoposte al controllo al loro ingresso nella Comunità per individuare la presenza del virus del mosaico del pepino, confermate all'articolo 13, del paragrafo 1, punto i), della direttiva 2000/29/CE, mutatis mutandis.

Articolo 3

1. Le sementi di pomodoro originarie della Comunità Europea possono essere trasportate al suo interno unicamente se soddisfano le condizioni stabilite al punto 2 dell'allegato.

2. Il paragrafo 1 non si applica al trasporto di sementi destinate alla vendita a consumatori finali che non si occupano della produzione di vegetali a titolo professionale, purché l'imballaggio delle stesse o altro dispositivo indicano chiaramente tale destinazione.

Articolo 4

Gli stati membri effettuano studi ufficiali per individuare la presenza del virus del mosaico del pepino negli impianti adibiti alla produzione di vegetali di pomodoro compresi i frutti.

Fatte salve le disposizioni di cui, rispettivamente, all'articolo 16, paragrafo 2, e articolo 13 quater, paragrafo 8, della direttiva 2000/29/CE, i risultati di cui al paragrafo 1 nonché le risultanze delle

ispezioni e dei controlli di cui all'articolo 2 sono notificati alla Commissione e agli altri Stati membri entro il 30 novembre 2004.

Articolo 5

La Commissione riesamina l'applicazione della presente decisione entro il 31 dicembre 2004.

Articolo 6

Gli Stati sono destinatari della presente decisione.

Allegato

Condizioni stabilite agli articoli 2 e 3

1. Le sementi di pomodoro originarie dei paesi terzi sono accompagnate dal certificato fitosanitario di cui l'articolo 13, paragrafo 1, punto II, della direttiva 2000/29/CE attestante che esse sono state ottenute con idoneo metodo di estrazione mediante acido e che:

a) dette sementi provengono da zone indenni dal virus del mosaico del pepino;

b) nessun sintomo del virus del mosaico del pepino è stato osservato sui vegetali nel luogo di produzione durante un ciclo vegetativo completo;

c) le sementi sono state oggetto di un controllo ufficiale per individuare la presenza del virus del mosaico del pepino, effettuato su un campione rappresentativo con metodi adeguati, e sono risultate indenni dal virus suddetto.

2. Le sementi di pomodoro originarie della Comunità possono essere trasportate al suo interno unicamente se sono state ottenute con un idoneo metodo di estrazione mediante acido se:

a) dette sementi provengono da zone indenni dal virus del mosaico del pepino;

b) nessun sintomo del virus del mosaico del pepino è stato osservato sui vegetali nel luogo di produzione durante un ciclo vegetativo completo;

c) le sementi sono state oggetto di un controllo ufficiale per individuare la presenza del virus del mosaico del pepino, effettuato su un campione rappresentativo con metodi adeguati, e sono risultate indenni dal virus suddetto.

Le forme di prevenzione nei confronti del virus sono da estendere oltre che per gli operatori delle serre anche ad eventuali visitatori, esse servono per prevenire l'insorgere della malattia. Le norme preventive per gli operatori sono elencate di seguito:

- i lavoratori devono indossare vestiti puliti, nuovi o disinfestati, così come le scarpe ed i guanti. In alternativa si consiglia l'uso di materiali usa e getta;
- disporre di una stuoia con materiale disinfettante all'entrata del vivaio e verificare che il disinfettante sia attivo per tutto il periodo di coltivazione;
- disinfettare le mani usando dispenser localizzati presso tutte le entrate della serra;
- riporre i guanti e gli indumenti in contenitori speciali all'uscita della serra;
- sostituire gli attrezzi di lavorazione (coltelli, cesoie, etc.) o disinfettarli, prima di passare da una zona infetta ad una non infetta, immergendoli per qualche minuto in candeggina commerciale o in fosfato trisodico al 10% per 30 minuti, si può utilizzare per la disinfezione anche il latte intero o un disinfestante viricida;

- disinfettare sia i carrelli per la raccolta che le cassette o altri dispositivi per gli imballaggi, nebulizzando candeggina commerciale oppure utilizzando fosfato trisodico al 10% per 30 minuti;
- lavorare nell'area infettata sempre alla fine, prima di lasciare la serra.

Per i visitatori le norme da rispettare all'interno di una serra sono disposte nel seguente elenco:

- bagnare le scarpe con disinfettanti freschi prima di entrare in ogni serra;
- disinfettare le mani usando dei disinfettanti a dispenser strategicamente disposti ad ogni entrata della serra;
- bisogna stare nei passetti e non entrare all'interno della coltivazione;
- all'uscita depositare gli stivali ed i guanti in appositi contenitori messi per tale scopo;
- assicurarsi che i vestiti siano lavati prima di entrare in altre coltivazioni;
- se il virus è presente all'interno della coltivazione bisogna avvisare i visitatori della sua presenza per evitare una facile trasmissione. diffusione della malattia.

1.10.7. MONITORAGGIO DELLA COLTIVAZIONE

Un regolare monitoraggio della coltura è una pratica molto importante, all'interno delle serre, per individuare precocemente

l'eventuale comparsa dei sintomi e quindi consentire un tempestivo intervento degli operatori e per evitare gravi eradicazioni.

In caso di individuazione della malattia bisogna eseguire delle operazioni qui sotto elencate:

- bloccare e segnare la fila dove la pianta infetta è stata riscontrata;
- non toccare le piante infette mentre si lavora lungo le file;



Fig. 26 – Misura di profilassi.

- rimuovere le piantine che mostrano i sintomi ponendo molta attenzione a non mettere a contatto le piante infette con quelle adiacenti e porle in un robusto contenitore;
- estirpare circa 3-6 piante (in Europa sono raccomandate un minimo di 20 piante) situate accanto alle piante infette o l'intera fila delle piante con sintomi e deporle in un robusto contenitore;

- tenere le piante infette sempre nei contenitori ed assicurarsi che queste ultime non presentino buchi;
- quando si portano all'esterno della serra le piante infette, bisogna non toccare le altre piante;
- distruggere le erbe infestanti attorno alle serre (potrebbero fungere da serbatoio per il virus);



Fig. 27 – Presenza di erbe spontanee dentro la serra.

- bruciare il materiale infetto o trasportarlo immediatamente in luoghi di deposito distanti;
- mai lasciare come rifiuti il materiale infetto sul campo o interrarlo sotto terra in campo;
- rimettere a posto il substrato nelle aree dove le piante sono state rimosse e disinfettare gli irrigatori se a contatto con la piante;
- disinfettare le cassette, i carrelli, ruote comprese, usati per la raccolta e l'imballaggio;

- durante l'infezione non assegnare contemporaneamente i lavoratori addetti alle pratiche colturali alle operazioni di imballaggio;

- informare gli operatori sui sintomi da monitorare all'interno delle serre e sulle operazioni da adottare per la prevenzione.

Dopo l'estirpazione è consigliabile lavare la struttura con potenti getti d'acqua a pressione o acqua calda o acqua con disinfettante viricida. Nonché disinfettare le attrezzature e gli arnesi da lavoro utilizzati all'interno della serra. La serra deve essere lasciata incolta per almeno tre settimane, per garantire la perdita di infettività del virus presente nei residui eventualmente rimasti in serra o in alternativa si potrà impiantare una coltura non suscettibile al PepMV.

1.10.8. MEZZI CHIMICI

Il controllo delle infezioni del virus del mosaico del pepino, può essere effettuato sul controllo chimico della popolazione del vettore, cioè mediante prodotti che utilizzano principi attivi, organici o inorganici. Gli insetticidi vengono utilizzati per tentare di frenare la trasmissione del virus da parte del vettore. Per ridurre la popolazione con questo metodo di lotta, si deve fare uso continuo e massiccio di insetticidi e questo provoca gravi danni di natura ambientale, quale l'eliminazione degli eventuali limitatori naturali del vettore e favorisce la comparsa di popolazioni resistenti ai principi attivi utilizzati. Sulla base di queste informazioni questo tipo di lotta è difficilmente praticata. Prove di lotta

con prodotti chimici diversi sono stati effettuati mediante trattamenti al seme (Còrdoba-Sellés *et al.*, 2007).

1.10.9. MEZZI FISICI

I mezzi fisici possono essere impiegati per il controllo dei vettori, per questo scopo vengono utilizzate delle reti a maglia fitta poste su tutte le aperture della serra, per evitare il contatto tra il vettore e la pianta. Questo tipo di misura preventiva però risulta utile solo per le serre di nuova concezione che sono dotate di adeguati sistemi di aereazione. Infatti nelle serre tradizionali, tipiche dell'orticoltura della Sicilia sud-orientale, nei periodi estivi in cui si hanno elevate temperature, l'impiego di reti a maglie fitte non permette un'adeguata ventilazione, perché riduce i ricambi d'aria all'interno della serra causando un surriscaldamento dell'ambiente che va ad alterare il ritmo di sintesi di sostanza secca delle piante a scapito della produzione, ed inoltre l'elevata temperatura ed umidità favorisce l'insorgenza di funghi dannosi, in particolare della muffa grigia.

Tra i mezzi di difesa meccanici sono anche da ricordare, l'impiego di film riflettenti e film plastici. Questi ultimi servono a filtrare la luce ultra violetta (UV) all'interno della serra, il principio che regola il controllo del virus è basato sull'interferenza con il processo di visione dell'insetto, che gli provoca delle difficoltà negli spostamenti, dovuti all'assenza di luce ultra violetta.

Tra i mezzi fisici, ancora, possiamo ricordare il trattamento dei semi con calore umido, soprattutto efficace per quei virus che si localizzano nelle parti più superficiali di questi organi.

La solarizzazione del terreno non riesce a fornire risultati soddisfacenti, in quanto i virus essendo patogeni che si diffondono in modo sistemico su tutta la pianta spesso si trovano ad elevate concentrazioni anche nell'apparato radicale. A fine coltivazione le piante spesso vengono semplicemente tirate e parte dell'apparato radicale, posto a profondità anche di 40 cm, rimane nel terreno, costituendo una notevole fonte d'inoculo. La solarizzazione alla profondità indicata non sempre riesce a raggiungere le temperature necessarie alla denaturazione dei virioni di diversi virus. A tal proposito è importante ricordare che il punto di inattivazione termica di molti virus è superiore ai 50° C.

1.10.10. PRATICHE COLTURALI

La conoscenza dell'epidemiologia del PepMv permette di gestire adeguatamente le coltivazioni di pomodoro. Infatti, conoscendo il periodo in cui aumenta l'incidenza dell'infezione, possiamo stabilire qual è l'epoca di trapianto più opportuna per limitare l'infezione, nel caso del virus del mosaico del pepino bisogna posticipare l'epoca di trapianto estivo.

All'interno delle serre, come nei pressi dei campi, si può avere la presenza di piante spontanee, che possono favorire la proliferazione dei vettori del virus oppure possono essere le piante stesse riserva d'inoculo del virus. Per questo è opportuno eliminare tutte le forme di piante spontanee attorno alle nostre colture.

È molto importante non tenere all'interno della serra piante ornamentali o piante da hobby, perché esse potrebbero fungere da ospiti secondari del virus e quindi dare inizio ad infezioni all'interno delle serre.

Nei casi in cui le specie commerciali sono il principale focolaio d'infezione di un virus, un'adeguata rotazione colturale che evita il sovrapporsi dei cicli biologici delle specie sensibili (magari con intervalli di 20-30 gg.), associata naturalmente alla totale eliminazione dei residui della coltura precedente, può comportare la rottura del ciclo d'infezione, abbassando notevolmente la carica d'inoculo, specie nelle condizioni siciliane. Particolarmente utile potrebbe risultare la creazione del cosiddetto "vuoto biologico" cioè far sì che in una determinata area e per un preciso periodo dell'anno non sia presente né l'ospite primario (spesso una specie coltivata) che gli ospiti secondari, rappresentati spesso dalle erbe spontanee.

1.10.11. MECCANISMI DI RESISTENZA

In natura solo dopo secoli di selezione spontanea si ottengono piante resistenti geneticamente ad alcuni virus, ma oggi grazie all'ingegneria genetica abbiamo la possibilità di ricercare nelle piante i meccanismi che possono rendere le piante resistenti o tolleranti ad un virus e introdurli nel corredo genetico delle piante commerciali che ne sono sprovviste, per realizzare in breve tempo quello che la natura otterrebbe in tempi molto lunghi. Per resistenza, nel caso di interazione ospite virus, in gergo tecnico intendiamo la capacità genetica della pianta ospite di sintetizzare, a livello metabolico, prodotti che impediscono del tutto l'infezione virale, quindi le sue cellule non sono idonee alla

colonizzazione da parte dei virus. Mentre, per tolleranza si intende la capacità della pianta di sopportare, senza subire gravi alterazioni dei suoi normali processi biologici, la presenza delle particelle virali all'interno delle sue cellule. I programmi di miglioramento genetico, sono basati quindi all'introduzione, nelle piante di pomodoro coltivato, di geni di tolleranza o resistenza riscontrati sulle specie selvatiche di *Lycopersicon*, o utilizzare dei microrganismi che inducono resistenza (Hinoyosa *et al.*, 2002).

Attraverso gli studi effettuati, oggi abbiamo a disposizione piante che riescono ad essere tolleranti al PepMV (Ling *et al.*, 2007; Soler – Alexander *et al.*, 2007) La tolleranza è stata ottenuta attraverso dei fattori di resistenza acquisiti da piante di *Lycopersicon peruvianum* L., che consentono di avere nelle piante un ritardo nella manifestazione dei sintomi e hanno una bassa carica virale, da piante di *S. chilense* che presenta una bassa carica virale e un limitato movimento a lunga distanza. I fattori di resistenza più promettenti sono stati ritrovati su tre selezioni (LA-1731, LA-2156 e LA-2167).

Oggi attraverso l'ingegneria genetica si riesce a rendere le piante resistenti alle infezioni virali; uno dei metodi più importanti e più utilizzati è quello della produzione di piante transgeniche, queste sono piante in cui viene inserito nel proprio genoma un gene specifico di resistenza, proveniente da piante che hanno manifestato l'opposizione al virus che interessa.

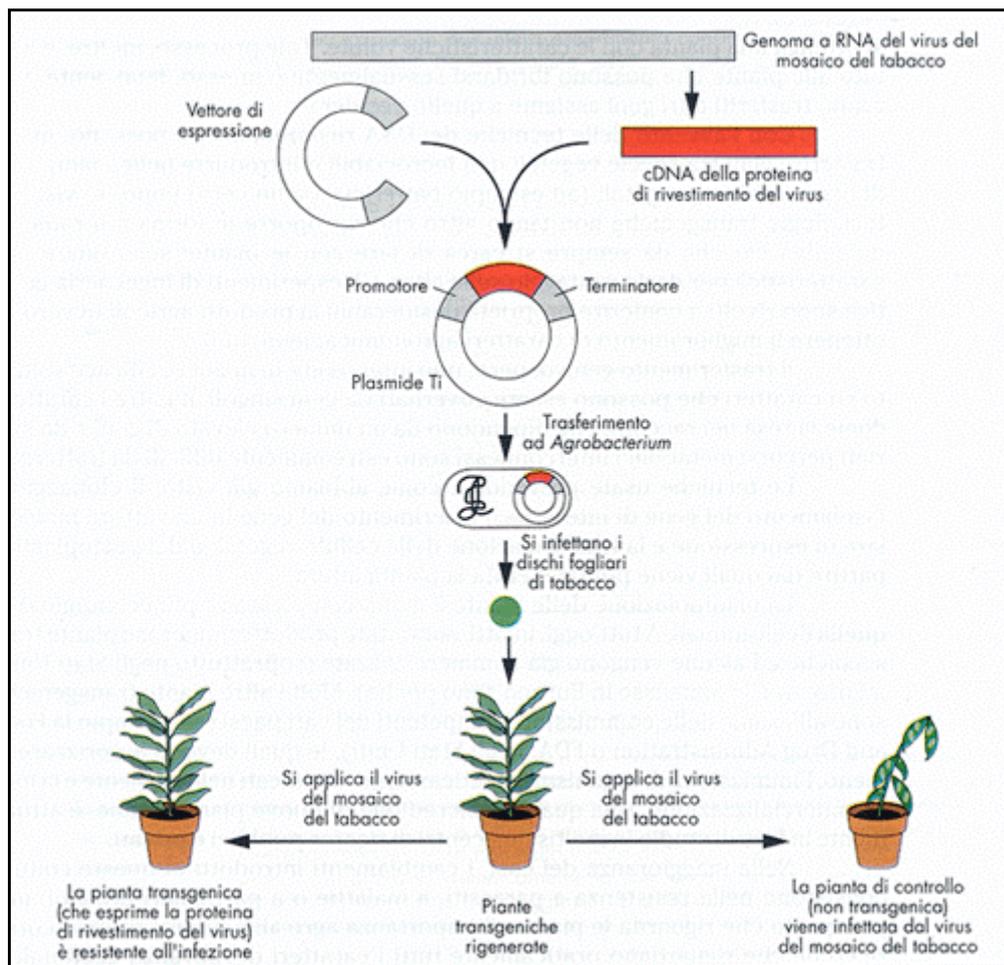


Fig. 28 – Processo costituzione piante transgeniche.

Nel caso del PepMV si è osservato il gene Rx della patata, può conferire resistenza non solo contro il PVX (Virus X della patata) ma anche contro altri *Potexvirus*. Per valutare il potenziale di questo gene contro il virus del mosaico del pepino è stata effettuata una Rx-transgenica su piante di pomodoro. I risultati ottenuti indicano che il gene Rx è attivo contro il PepMV, nonostante il suo rivestimento proteico (CP) è molto diverso da quello della PVX, però al contrario di quello che avviene nel virus X della patata dove la resistenza del gene rimane stabile, nel PepMV la resistenza offerta dal Rx è instabile a causa delle continue mutazioni del rivestimento proteico del virus.

1.10.12. PROTEZIONE CROCIATA

La protezione crociata è una vera e propria “vaccinazione”. È stato da tempo accertato che l’infezione naturale o artificiale con ceppi virali blandi proteggono le piante da ceppi molto virulenti. La tecnica viene adottata già da molti anni per proteggere le piante da virus con particolarmente dannosi quali il virus della tristezza degli agrumi, il virus del mosaico del tabacco ecc (Pennazio *et al.*, 2001).

Prove preliminari effettuati con ceppi blandi di PepMV hanno fornito buoni risultati (Martijn *et al.*, 2010; Chewachong, 2013).

Prove condotte in Olanda (Schenk *et al.*, 2010) hanno dimostrato che la perdita di produzione su piante di pomodoro affette da ceppi di PepMV diminuisce dal 8 al 24% mentre in piante preimmunizzate con due ceppi blandi la produzione di diminuisce rispetto alla pianta sana tra lo 0 ed il 3%. Anche l’intensità dei sintomi diminuisce nelle piante preinoculate con i due ceppi blandi.

Nell’ultimo decennio diverse malattie da virus emergenti sono state riportate in tutte le aree del mondo ove si coltivano piante di pomodoro che stanno provcando gravissimi danni economici (Hansen *et al.*, 2010). Nel Bacino del Mediterraneo ed in altre aree subtropicali i seguenti sette virus sono stati descritti come i più importanti del pomodoro:

1) Virus del Mosaico del cetriolo (CMV), il membro tipo del genere *Cucumovirus* della famiglia *Bromoviridae* che infetta una vasta gamma di ospiti la cui trasmissione avviene mediante afidi (Palukatis e Garcia – Arenal, 2003);

2) Virus dell’avvizzimento maculato del pomodoro (TSWV), membro tipo del genere *Tospovirus* della famiglia dei *Bunyaviridae* che è trasmesso da tripidi (Adkins, 2000);

3) Virus del mosaico del pomodoro (ToMV) un membro del genere *Tobamovirus* della famiglia *Virgaviridae* che infetta molte specie di solanacee e che è in grado di sopravvivere nei residui delle piante secche e che può essere trasmesso mediante il seme o per contatto (Broadbunt, 1976);

4) Virus della clorosi del pomodoro (ToCV) membri del genere *Crinivirus* della famiglia *Closteroviridae* che hanno una limitata gamma di ospiti (Martelli *et al.* 2002). ToCV è trasmesso da *Trialeurodes vaporariorum*, *T. abutilanea* e *Bemisia tabaci* A e B (Wisler *et al.*, 1998) mentre TICV è trasmesso solo da *T. vaporariorum* (Duffs *et al.*, 1996);

5) Virus del mosaico del Pepino (PepMV) genere *Potexvirus*, famiglia *Alphaflexviridae* che aveva inizialmente una ristretta gamma di ospiti (Jones *et al.*, 1980) mentre oggi il numero di ospiti sta sempre aumentando (Fakhro *et al.*, 2011; Davino *et al.*, 2009; Jordà *et al.*, 2011; Papyiannis *et al.*, 2012), che si trasmette per contatto (Jones *et al.*, 1980; Mumford e Metcalf, 2001) e mediante bombi (Davino *et al.*, 2010; La Casa *et al.*, 2003).

6) Virus torrado del pomodoro (ToTV), membro tipo del genere *Torradovirus* della famiglia *Secoviridae* (Verbeek *et al.*, 2007) che ha una ristretta gamma di piante ospiti incluse specie di solanacee ed è trasmesso da *Bemisia tabaci* e *T. vaporariorum* (Amari *et al.*, 2008).

La più importante strategia per controllare queste malattie virali nel pomodoro è basata nel prevenire l'introduzione e la diffusione in vivaio ed in pieno campo e l'eradicazione delle piante infette appena si accerta

la malattia. Questo approccio richiede sorveglianza usando specifici, sensibili e rapidi metodi di diagnosi.

2. MATERIALI E METODI

2.1. SCOPO DELLA TESI

Dal 2009 ad oggi diverse sono state le osservazioni e le segnalazioni di piante di pomodoro in serra affette da sintomi riferibili ad infezioni da virus del mosaico del pepino. Il virus è stato riscontrato per la prima volta in Sicilia in provincia di Ragusa nel Comune di Vittoria, su piante di pomodoro in infezioni miste con il virus della clorosi infettiva del pomodoro (Davino *et. al.*, 2008). L'area maggiormente interessata dalla presenza del patogeno è la provincia di Ragusa (Vittoria, Scicli, Acate), la quale ha i più elevati investimenti in serre. Nell'inverno del 2009 molte segnalazioni sono giunte all'Osservatorio per le Malattie delle Piante della sezione di Vittoria che per la diagnosi del virus del mosaico del pepino si è avvalsa del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Fitosanitarie dell'Università di Catania.

Lo scopo della mia tesi di dottorato ha interessato i seguenti punti:

1. Indagini di campo sull'infezione e diffusione di PepMV nell'area della provincia di Ragusa;
2. Prova di trasmissione di PepMV mediante Bombi;
3. Indagini sulla presenza di PepMV su specie diverse (coltivate e spontanee);
4. Saggi per accertare la presenza di PepMV nei semi di pomodoro;
5. Prove di trasmissione in piante di pomodoro attraverso il seme.

6. Individuazione dei più importanti virus a RNA che infettano le piante di pomodoro.
7. Sequenziamento di un isolato di PepMV riscontrato in Sicilia.
8. Studio del flusso genico e della dispersione di PepMV in Sicilia.
9. Diagnosi del PepMV attraverso un nuovo metodo di rilevamento basato sull'ibridazione di flusso di impronte su membrana.

2.1.1. INDAGINI DI CAMPO SULLA DIFFUSIONE DI PEPMV SU PIANTE DI POMODORO

Dal 2009 ad sino al mese di aprile del 2012 è stata svolta un'attività di indagine e monitoraggio per verificare la presenza e la diffusione del virus del mosaico del pepino. Il monitoraggio ha interessato aziende agricole e vivai localizzate nella provincia di Ragusa (figura 19). Durante le visite nelle varie aziende sono stati prelevati campioni di tessuti e frutti di pomodori che presentavano sintomi riferibili ad infezioni da PepMV e anche campioni asintomatici. Sono state monitorate aziende partendo dal Comune di Gela (Caltanissetta) sino ad arrivare ai confini con la provincia di Siracusa. Ogni 15 giorni (da gennaio ad aprile venivano prelevati i campioni di foglie e frutti con sintomi riferibili a PepMV o asintomatiche che venivano saggiate mediante test ELISA.

L'antisiero utilizzato è stato acquistato presso la Ditta Loewe Sauerlach (Germania). Si tratta di un antisiero policlonale che in prove

precedenti aveva mostrato una buona sensibilità nei confronti di isolati di PepMV presenti in provincia di Ragusa.

Durante il periodo delle prove sono stati saggiati campioni di pomodoro (foglie e bacche), che venivano portati da diversi agricoltori, provenienti dalla provincia di Siracusa e qualche campione dalla provincia di Messina (Milazzo).



Figura 19 – Area della provincia di Ragusa dove sono state effettuate le nostre indagini per le infezioni da PepMV.

2.1.2. PROVA DI TRASMISSIONE DI PEPMV MEDIANTE BOMBI

Prove per accertare la trasmissione di PepMV sono state effettuate in una serra ricadente nel comune di Scicli (Ragusa). Le varietà di pomodoro utilizzati per la prova erano Genio e Shiren che mostravano gravi sintomi sulle foglie e butterature sulle bacche, Piccadilly con sintomi fogliari abbastanza tipici ma meno intensi delle precedenti varietà

e blandi sulle bacche e Belize che mostravano solo sintomi fogliari. Le prove sono state effettuate in due serre limitrofe della stessa azienda. In una serra erano utilizzati come impollinatori n. 70 bombi per 1.000 mq (Tesi A) ed in un'altra n. 150 bombi sempre in 1.000 mq (Tesi B). All'inizio delle osservazioni in ambedue le serre risultavano infette circa il 10% delle piante presenti in ogni serra. Le serre sono state controllate mensilmente per valutare il numero di piante infette nel tempo. In ogni serra sono state saggiate per accertare infezioni di PepMV il 10% delle piante presenti. Le prove sono iniziate ai primi di dicembre del 2009 e le osservazioni sono proseguite fino alla fine di marzo del 2010. Le osservazioni e i saggi per accertare il numero delle piante infette sono stati effettuati ogni 30 giorni prelevando germogli e bacche di pomodoro in una parcella composta da 500 piante ciascuna. In totale in numero di campioni saggiati sono risultati 2.000 piantine. Tutti i campioni raccolti nelle due serre venivano saggiati mediante saggi sierologici per accertare le infezioni di PepMV.

2.1.3. INDAGINI SULLA PRESENZA DI PEPMV SU SPECIE DIVERSE (COLTIVATE E SPONTANEE)

Durante le indagini per la diffusione di PepMV nelle serre del ragusano sono state condotte anche delle prove per accertare infezioni del virus su ospiti diversi. Quindi ogni qualvolta si effettuavano i prelievi delle piante di pomodoro per le prove precedenti venivano prelevati anche campioni di tutte le piante coltivate e spontanee che si trovano all'interno della serra esaminata. Questi campioni sono stati saggiati

mediante saggi ELISA e i campioni risultati positivi a PepMV sono stati risaggiati mediante RT-PCR.

2.1.4. SAGGI PER ACCERTARE LA PRESENZA DI PEPMV NEI SEMI DI POMODORO

Bacche di pomodoro sono state prelevate nel mese di gennaio, in un'azienda nella provincia di Ragusa (Scicli) dove era accertata un'elevata presenza di PepMV. Sono stati prelevati frutti da 4 diverse varietà di pomodoro: Genio, Shiren, Piccadilly e Belize. Durante il campionamento sono state fatte le seguenti osservazioni: Shiren e Genio mostravano sintomi fogliari e sulle bacche evidenti sintomi di PepMV, cioè numerose butterature sulle bacche; Piccadilly sintomi fogliari più blandi e qualche lieve butteratura sulle bacche, mentre su Belize si osservano sintomi fogliari molto blandi e non erano evidenti i sintomi sulle bacche. Le piante da cui sono state prelevate le bacche di pomodoro presentavano sintomi evidenti del virus su tutta la pianta e sono state prelevate in serre che mostravano percentuali di infezioni di oltre l'80%. I semi appena prelevati solo dai frutti con evidenti sintomi di infezioni da PepMV (Fig. 14) o da piante con frutti asintomatici ma che erano risultati positivi ai saggi ELISA, sono stati lavati almeno 4 volte con acqua distillata. Subito dopo sono stati messi in contenitori contenenti 1 litro di acqua distillata e posti ad agitare per 60 min per favorire il distacco di eventuali frammenti di polpa ancora aderente sui semi sulla quale potevano essere presenti particelle virali. Quest'ultima operazione è stata ripetuta per 4 volte.

Questi semi sono stati mantenuti in laboratorio a temperatura ambiente per circa 7 mesi e saggiati mediante saggi ELISA nei mesi di gennaio, febbraio, marzo, aprile e luglio.



Figura 20 – Bacche di pomodoro con evidenti sintomi di PepMV

2.1.5. PROVE DI TRASMISSIONE IN PIANTE DI POMODORO ATTRAVERSO IL SEME

I semi di pomodoro utilizzati in questa prova appartengono alle seguenti varietà: Genio, Shiren, Piccadilly, Belize, provenienti da piante che presentavano evidenti sintomi di infezione sulle foglie e le prime due anche sulle bacche (tabella n. 2). Questi sono stati saggiati mediante test ELISA al fine di accertare infezioni da PepMV.

Tab. 2 - Prelievo campioni per prova di trasmissione attraverso i semi

Riferimento	Data prelievo	Tipologia campione	Varietà
1	20/04/2010	Foglie e frutti	Genio
2	20/04/2010	Foglie e frutti	Shiren
3	20/04/2010	Foglie e frutti	Piccadilly
4	20/04/2010	Foglie e frutti	Belize

Per ogni varietà, le bacche sono state manualmente pulite e recuperati i semi privi di polpa raccolti in contenitori ove è stato aggiunto 1 litro di acqua distillata e sottoposti ad agitazione per circa un ora per eliminare eventuali residui di tessuti affetti da PepMV. Questo trattamento è stato ripetuto per altre 3 volte.

Successivamente parte di semi dei diversi lotti sono stati filtrati e trattati con acido cloridrico e TPS.

- Il 50% dei semi delle 4 varietà sono stati trattati con acido cloridrico (HCl) al 2,7% per circa 30 minuti e poi con TPS (fosfato trisodico) al 10% per 2 ore (SEMI CONCIATI)
- Il restante 50% dei semi sono stati lasciati in agitatore solo con acqua distillata per 2 ore e 30 min.

Il Fosfato trisodico è utilizzato come conciate per eliminare eventuali infezioni da virus come TMV ed altri virus presenti su semi di pomodoro infetti.

Successivamente, i semi sono stati recuperati per filtrazione, risciacquati con acqua posti su fogli di carta bibula e fatti asciugare per 24-48 ore a temperatura ambiente.

Per determinare la trasmissione, semi infetti di ciascun lotto sono stati seminati in contenitori alveolari di polistirolo sterili riempiti con substrato e vari fertilizzanti sterilizzati. Sono stati posti a dimora 1 seme per alveolo. I contenitori alveolari sono stati posti all'interno di una camera di crescita a 22 ° C, 16 ore di luce, e il 60% di umidità a chiusura ermetica per evitare l'ingresso di eventuali insetti che potessero fungere da vettore di PepMV o altri virus.

Temperature di 18°C sono state mantenute dopo il primo mese di allevamento delle piantine di pomodoro in modo tale da rendere le condizioni ambientali favorevoli alla replicazione del virus. Come è noto dalla letteratura PepMV predilige temperature al di sotto dei 20°C, infatti si riscontra in serre ed in pieno campo da dicembre ad aprile. Le piantine sono state irrigate individualmente con soluzione nutritiva. Misure igieniche rigorose sono state adottate per prevenire la contaminazione esterna delle sementi e delle piantine. Durante tutto il periodo della prova le piante sono state attentamente controllate per accertare eventuali sintomi fogliari riferibili ad infezioni da PepMV.

Dopo due mesi dalla semina il 50% delle piantine sono state estratte dagli alveoli con tutto il pane di terra, poste in una vaschetta di acqua in modo tale da separare delicatamente la terra dalle radici. Le piantine sono state saggiate interamente, non solo foglie e fusto ma anche le radici in quanto se la trasmissione avveniva attraverso il virus poteva trovarsi nelle prime fasi di sviluppo nella parte basale della piantina.

Tutti i campioni sono stati analizzati per la presenza di PepMV mediante il saggio ELISA. L'1% degli estratti di piante sono state saggiate anche mediante RT-PCR. Dopo 1 mese il resto delle piantine sono estratti dagli alveoli trattati come i precedenti e saggiati mediante

saggi ELISA e l'1% anche mediante RT-PCR. In totale, sono state saggiate tutte le 1600 piantine ottenute dalla semina e cioè 400 per varietà.

2.1.6. INDIVIDUAZIONE DEI PIÙ IMPORTANTI VIRUS A RNA CHE INFETTANO LE PIANTE DI POMODORO

La diagnosi dei virus a RNA nelle piante di pomodoro è generalmente effettuata mediante i tradizionali saggi sierologici usando anticorpi policlonali, ma spesso il basso titolo riscontrato nelle piantine in vivaio o durante le prime fasi di infezioni virali può produrre dei falsi risultati negativi (Jacobi *et al.*, 1998). Inoltre, non ci sono spesso antisieri commerciali disponibili per saggi ELISA per le specie più importanti di virus che infettano il pomodoro, come ad esempio per i casi di ToCV, TICV e ToTV. Per tale motivo vi è una elevata necessità di incrementare e realizzare nuovi metodi diagnostici aventi elevata sensibilità e specificità per la diagnosi del materiale vegetale. Durante la mia tesi di Dottorato una nuova procedura basata su due saggi di multiplex RT-PCR è stata messa a punto e successivamente saggiata in materiale vegetale per la individuazione di infezioni di CMV, TSWV, ToMV, ToCV, PepMV, ToTV e TIV.

Per disegnare appropriati iniziatori (*primers*) compatibili con una reazione multiplex, sono state recuperate dal database NCBI “GenBank” le sequenze nucleotidiche dei differenti isolati di ciascuna specie virale.

Le sequenze sono state allineate usando il programma Clustal W (Larkin *et al.*, 2007) implementato nel software Geneious Pro 5.4.6 (Biomatters, Nuova Zelanda). Al fine di discriminare in elettroforesi i differenti virus i primers sono stati disegnati in modo da sintetizzare un

prodotto di dimensioni differenti per ciascun virus visualizzabile in agarosio. I primers sono stati disegnati e provati in silico mediante Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, USA) e Vector NTI 9.0 (Invitrogen, USA). Le sequenze nucleotidiche, la posizione genomica e la dimensione degli ampliconi ottenuti è riportata nella tabella n. 3.

Tab. 3 – Primer disegnati, sequenze nucleotiche e dimensioni degli ampliconi per ogni specie virali

Primer	Virus	Nucleotide sequence (5'-3')	GenBank (accession number)	Genomic position	Amplicon size
TICV 1	TICV	TTGGCTGTGAGTCAAGGAGGT	FJ815441	5414 RNA2	136
TICV 2		CTGATTTGATAGCCGATTCC		5528 RNA2	
ToTV 1	ToTV	TGGTGCTCAGAGTGCATCA	DQ388879	859 RNA1	189
ToTV 2		CACACTGCATCCACTTCTCCA		1026 RNA 1	
ToCV 1	ToCV	CATTCGGCTAATCCTAATCGA	AY903448	4461 RNA2	101
ToCV 2		CCCTAGTGGAGTGTACCTTCAATTC		4536 RNA2	
TSWV 1	TSWV	GCCATGCGTCTTCTTGATGAA	S48091	101 RNA M	451
TSWV 2		AGTTATTGTCCCTGACCCCTTC		595 RNA M	
CMV 1	CMV	ATTAAGCACCCACCTTTC	D10538	1413 RNA 3	480
CMV 2		TGGCAATGCGTTGGTGCTC		1872 RNA 3	
PepMV 1	PepMV	CATACTTCTGCACGGAATTCC	AF484251	4503	778
PepMV 2		TTCCGCTCTGATACTGACCA	HQ563892	5256	792
PepMV 3		TGCCGCTCTGATAATGGCCA	AF484251	5260	792
ToMV 1	ToMV	GATAAATTTGATTGAAGATGAAGCC	AF332868	5544	274
ToMV 2		CTCTACACCTTATAAACATGCCC		5895	

I primer sono stati testati in PCR singole utilizzando piante di pomodoro infettate artificialmente con i differenti virus e cresciute in screenhouse. Estratti di queste piante sono stati preparati pestando foglie 1:20 (P/V) in tampone PBS a pH 7,2 con l'aggiunta di DIECA al 2% e polivinilpirrolidone (PVP-10) in singoli sacchetti di plastica con una rete (Bioceba – Svizzera) per evitare contaminazioni tra i campioni. L'RNA totale è stato estratto da approssimativamente 100 mg di foglie di piante usando "Ultrachem Plant RNA isolation kit" (Mo Bio, USA) secondo le istruzioni riportate dalla casa commerciale.

Una RT-PCR singleplex è stata eseguita per ciascun virus usando un termociclatore a gradiente (Eppendorf, Germania) che permetteva l'inclusione di un range di temperatura da 50 a 60° C al fine di individuare le temperature di annealing ottimali dei rispettivi primers. Le reazioni di RT-PCR sono state eseguite in un volume di 25 µl contenenti

10 mM di tampone TRIS-HCL (pH 8,9), 50 mM di KCl, 0,3% di Triton x-100 (P/V), 1 μ M ciascun iniziatore (TICV1/TICV2 per l'individuazione di TICV; ToTV1/ToTV2 per ToTV; TSWV1/TSW2 per TSWV; CMV1/CMV2 per CMV e ToMV1/ToMV2 per TMV o 1 μ M di PepMV3; 0,5 μ M di PepMV1; 0,5 μ M di PepMV2 per PepMV, 250 μ M dNTPs, 0,25 unità di AMV-RT (Promega), 0,5 unità di GoTaq DNA polimerasi (Promega) e 5 μ l di RNA (templato da tradurre). La retro trascrizione è stata eseguita a 45° C per 30 e successivamente la PCR consisteva in 5 minuti a 95° C min per la denaturazione iniziale e 40 cicli di amplificazione (95° C per 30 sec, 50° a 60° C per 30 sec a 72° C per 30 sec), con una estensione finale di 72° C per 5 min. tutti i campioni hanno dato l'amplicone previsto con l'eccezione dei controlli negativi che non hanno dato nessun amplificato.

I prodotti ottenuti sono stati ligati in vettore pGen-T (Promega) e clonati in Escherichia coli JM-109. I trasformanti erano selezionati in base alla resistenza all'ampicillina e la presenza degli inserti era verificata mediante PCR usando specifici *primers*. I plasmidi sono stati estratti usando un kit "Ultraclean Standard Mini Plasmid Prep" (Mo Bio, USA). Le specifiche sequenze sono state confermate sequenziando in ambedue le direzioni usando un sequenziatore ABI PRISM DNA 377 (Perkin-Elmen, Boston, MA, USA). I plasmidi sono stati quantificati mediante uno spettrofotometro NanoDrop 2000 C (Thermo Scientific).

Successivamente 1 ng di ciascun plasmide (uno per ogni virus oggetto di studio) era usato per preparare una miscela di tutti i campioni. La multiplex PCR era preparata come descritto sopra ovviamente escludendo il preventivo passaggio di RT. Gli ampliconi sono stati visualizzati su gel di agarosio al 2% dopo colorazione con bromuro di etidio. Poiché è risultato impossibile amplificare e visualizzare

contemporaneamente tutti e sette i prodotti di PCR per problemi di incompatibilità dei *primers* si è deciso di dividere la multiplex PCR in ulteriori due reazioni: 1) una in grado di amplificare PepMV, TSWV, ToTV e ToCV; 2) una in grado di amplificare CMV, ToMV e TICV.

In aggiunta, per valutare la sensibilità teorica della multiplex PCR, 10 diluizioni seriali di ciascun preparato virale di plasmide bersaglio furono preparati, variando da 1 a 10^{-4} ng dimostrando di essere efficace fino a quanto un virus era 1000 volte meno concentrato degli altri.

Le due multiplex RT-PCR messe a punto sono state provate su campioni di campo provenienti da tutta la Sicilia, raccogliendo piante a presunta eziologia virale. In totale sono stati raccolti 45 campioni pomodoro provenienti da serra e pieno campo in diverse provincie della Sicilia nel 2011 (tabella 4) e i risultati erano comparati con i risultati dei saggi ELISA (tranne per ToCV, TICV e ToTV) e con RT-PCR singleplex già descritte in letteratura: (PepMV Mumford e Metcolfe, 2001), TSWV (Mumford *et al.*, 1994), ToTV (Prospieszny *et al.*, 2007), ToCV (Lauro *et al.*, 2000), CMV (Lin *et al.*, 2004), ToMV (Rumar *et al.*, 2011) e TICV (Vaira *et al.*, 2002).

2.1.7. SEQUENZIAMENTO DI UN ISOLATO DI PEPMV RISCONTRATO IN SICILIA

2.1.7.1. FONTE DEL MATERIALE VEGETALE

Nella primavera del 2009, campioni di foglie e frutti furono raccolti durante alcune indagini di campo in diverse serre della provincia di Ragusa in Sicilia ove il virus del mosaico era diffuso in forma endemica.

Le piante mostravano i tipici sintomi di PepMV sia sulle foglie che sui frutti. Circa 60 campioni con sospetti sintomi di PepMV furono raccolti in provincia di Ragusa. 19 campioni affetti da PepMV furono individuati mediante DAS-ELISA (Prime Diagnostics, The Netherlands). Come isolati di riferimento furono utilizzati due campioni denominati PepMV-Sar01 e PepMV-Sar09 forniti dalla Dott.ssa M. Ciuffo (IVV-CNT, Torino).

2.1.7.2. ESTRAZIONE DELL'RNA E GENOTIPO RT-qPCR

L'RNA totale è stato estratto da 50 mg di foglie e frutto fresco usando un kit commerciale (Real - Spagna). La resa dell'RNA totale e la qualità erano determinanti misurando l'assorbanza a 260 μm con uno spettrofotometro (NanoDrop Technologies, USA).

Due sonde Taq Man RT-qPCR sono state utilizzate per individuare i ceppi Ch2 ed EU-Tom. Iniziatori e sonde Taq Man (tabelle 5 e 6) erano disegnate usando Primers Express 2.0 software (Applied Biosystems, USA) nella regione RdRp e nella regione CP che differiscono la maggior parte nei due genotipi.

Tab. 5 – Sequenza e posizione genomica dei primer utilizzati per la genotipizzazione di PepMV mediante RT-qPCR

Primer	Sequence	Region	Isolate
COX F	5-CGTCGCATTCCAGATTATCCA-3	COX	Internal Control
COX RW	5-CAACTACGGATATATAAGRRCCRRAACTG-3	COX	Internal Control
PepMVCh2-1868F	5-TGGAATGCTTGGATCCCATT-3	ORF1	Ch2
PepMVCh2-1939R	5-CCATCTGGGCCGTATTGTA-3	ORF1	Ch2
PepMVTOM-2719F	5-CAATTTGGTGCCTCTCAAA-3	ORF1	TOM
PepMVTOM-2791R	5-CCAGCGTAGGTCATGGCTTT-3	ORF1	TOM
PepMVCP Ch2 290F	5-TCTTACTGCCATGGGTTTAGCA-3	CP	Ch2
PepMVCP Ch2 401R	5-GTGGCACCTATAAGTTGTGCAGAT-3	CP	Ch2
PepMVCP TOM 273F	5-GAAGCCCTAGCCAAAATCTTCA-3	CP	TOM
PepMVCP TOM 389R	5-CAGCTGTGCCGATTTAGAACTCT-3	CP	TOM

Tab. 6 – Sequenza e posizione genomica delle sonde TaqMan utilizzati per la genotipizzazione di PepMV mediante RT-qPCR

Probe	Sequence	Region	Target
COX1511T	TGCTTACCCTGGATGCAATCCCCT-VIC	COX	Internal Control
PepMVCh2-1889T	CTTAATGCACACGGCTTCAAAGGAGATCA-6FAM	ORF1	Ch2
PepMVTOM-2741T	AAGAAGAGTGCTATGCAAGACATAGGGCA-6FAM	ORF1	TOM
PepMVCh2-CP-318T	TGAGACCGGACCTGCCATGTGG-6FAM	CP	Ch2
PepMVTOM-CP-317T	TGAGACTGGTCCGGCCATGTGG-6FAM	CP	TOM

È stata disegnata anche una sonda ed un controllo interno sull'impronta del gene COX. La miscela di reazione RT-qPCR conteneva 12,5 µl di TaqMan 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), 0,625 µl di Multiscribe™ e RNA inibitore Mix (Applied Biosystems, USA), 0,75 µl di ciascun iniziatore (10 µM), 0,5 µl di ciascuna sonda (5µM) ed 1 µl di RNA totale, in un volume totale di 25 µl. Ciascun campione era saggiato in doppio. La reazione consisteva in 30

min a 48° C e 10 min a 95° C, seguito da 40 cicli di denaturazione per 15 sec a 95° C e annealing/estensione per 1 min a 60° C. La intensità dei segnali luminosi erano registrati e analizzati con un apparecchio Real Time ABI-Prisura 7500 (Applied Biosystem, USA) usando un software SDS. Un campione era considerato positivo se esso produceva un valore di soglia (threshold Ct) più basso di 40 a condizione che le contaminazioni nei controlli risultavano negative. Al contrario, un campione era negativo se il valore di Ct era 40 o più, e il saggio di riferimento risultava positiva.

2.1.7.3. SINTESI DEL DNA, CLONAGGIO E SEQUENZA

Due isolati siciliani delle indagini del 2009 che mostravano differenti sintomi sui frutti (PepMV-Sic 1.09 e PepMV-Sic 2.09) e i due isolati della Sardegna del CNR di Torino sono stati selezionati per la sequenza dell'intero genoma mediante primer walking strategy (Knippers e Alpert, 1999) usando i set di primer riportati in tabella n. 7. Due µl di RNA totale era sottoposto ad una fase di RT-PCR in un volume di 25 µl; la miscela di reazione conteneva 5 µl di tampone 5X (Promega, USA), 2,5 mM di ciascun dNTP, 0,5 di ciascun iniziatore, 20 U di RNase-OUT (Invitrogen, USA), 1,25 U di AMV RT-(Promega, USA), 0,75 U di Go-Taq polimerasi (Promega, USA). Tutti i saggi erano effettuati secondo il seguente protocollo: trascrizione inversa a 42° C per 30 min seguita da denaturazione a 95° C per 5 min, amplificazione per 35 cicli di 1 min a 94° C, 1 min a 58° C ed una fase di elongazione a 72° C per un tempo variabile con gli iniziatori utilizzati ed una estensione finale per 10 min a 72° C.

Tab. 7 – Sequenza e posizione genomica dei primer per il sequenziamento genomico mediante strategia del primer mobile

Primer	Sequence	Genome Position
PepMV-59F	GAAACAAAACATAACACATAATAATC	RdRp
PepMV-2516R	GTCTCATTGTTGGACTCATGATA	RdRp
PepMV-1742F	TACTAAAAACCCGTGAAAATTGAAGATATAG	RdRp
PepMV-3918R	TCAGTRTTDGCRTCRAARGT	RdRp
PepMV-3204F	CATCARCARGCVAAAAGAYGA	RdRp
PepMV-4249R	AAGCTAATTTCTCTAAGTTATTTCCATTTG	RdRp
PepMV-4084F	AACGCTGTACCCAAAACAGG	RdRp
PepMV-4498R	TCATTGTTGTGCACGGAATT	TGB1
PepMV-4249F	CAAATGGAAATAACTTAGAGAAATTAGCTT	RdRp
PepMV-5554 R	GGGTTAGAAGCTGTAGGTTG	TGB3
PepMV-5094F	VARRCTCASMATTGGBGAACTA	TGB1
PepMV-6051R	CTGTCTAACAGTATGTTCCAGACAATTTTT	CP
US2-37 5637F	CAACCTACAGCTTCTAACCC	IR-2
US2dF-6441	TTTTTTATTTAGTAGATTTAGATACTAAGG	3'-NTR

I prodotti amplificati erano sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio all'1,5% e visualizzati mediante colorazione con bromuro di etidio. Per ottenere le porzioni terminali 3' e 5' (UTR 3 e NCR 5) una amplificazione mediante RACE è stata eseguita (kit RACE Invitrogen, USA). Gli ampliconi sono stati clonati usando il Kit TA – Cloning system (Promega, USA), sequenziati (BioFab Research, Italia) e depositati in GenBank. Per costruire l'intera lunghezza delle sequenze dei 4 genomi virali, le sequenze ottenute sono state assemblate usando il vettore NTI 9.0.0. software (Informax, USA). Le analisi di sequenza e i confronti sono stati eseguiti con i programmi MEGA4 e EMBOSS-Needle. Il

modello comparativo della struttura proteica è stato ipotizzato mediante un “workspace” SWISS-MODEL.

2.1.8. STUDIO DEL FLUSSO GENICO E DELLA DISPERSIONE DI PEPINO MOSAIC VIRUS IN SICILIA

Durante gli anni 2011-2013 sono stati raccolti 1800 campioni di piante di pomodoro sintomatiche e asintomatiche nelle provincie di Ragusa, Siracusa, Caltanissetta, Agrigento, Trapani, Palermo che rappresentano le aree ove questa solanacea è diffusa. Ogni anno sono stati raccolti 100 campioni per provincia (600 anno, come riportato nella tabella n. 5).

Tab. 5 – Numero di piante prelevate nelle provincie nei mesi e negli anni

Province	Gennaio 2011	Gennaio 2012	Gennaio 2013
Agrigento	100	100	100
Caltanissetta	100	100	100
Palermo	100	100	100
Ragusa	100	100	100
Siracusa	100	100	100
Trapani	100	100	100
Totale	78	222	376

Tutti i campioni raccolti sono stati suddivisi in due sottocampioni che sono stati utilizzati uno per le analisi sierologiche e l'altro per le successive analisi molecolari. L'area ove veniva prelevato il campione è stato riportato su una mappa. I campioni sono stati analizzati mediante

DAS-ELISA usando un anticorpo policlonale della ditta Loewe-Phyodiagnostica Biochemica (Souerbach, Garwany) ed i campioni positivi erano utilizzati per la caratterizzazione biologica. Porzioni di foglie infette venivano utilizzate per i saggi di trasmissione su piante test erbacee. Il succo fresco per le inoculazioni era ottenuto pestando le foglie in un mortaio in presenza di tampone freddo a pH 7,0 contenente il 3% (p/v) glicole polietilenico (PEG mv 6.000). Le piante inoculate erano Chenopodio (*Chenopodium quinoa*), Nicotiana (*Nicotiana benthamiana*), *N. tabaci*, *N. clevelandii*, Datura (*Datura spp.*), Pomodoro (*L. esculentum*), Peperone (*Capsicum annuum*), Petunia (*Petunia hybrida*) e Basilico (*Ocimum basilicum*). Le piante inoculate tre per ogni specie sono state allevate in una serra a prova di afidi in terreno sterilizzato e con un fotoperiodo di 14 hrs di luce ed una temperatura variabile da 28 a 30° C.

Le piante sono state controllate ogni 3 giorni per osservare eventuali sintomi riferibili a infezioni virali e saggiate dopo 30 giorni dall'inoculazione. Circa il 10% delle piante proveniente dalle 1800 piante raccolte in campo risultate positive al test DAS-ELISA sono state utilizzate per le analisi molecolari. L'RNA totale è stato estratto dalle foglie giovani. Per ogni campione approssimativamente 100 mg di tessuto fogliare è stato omogeneizzato in tubo Eppendorf da 1,5 ml in presenza di 500 µl di tampone di estrazione (200 mM di tampone Tris a pH8,5; 1,5% di SDS; 300mM di LiCl; 1% di sodio desossicolato; 1% di Igepal CA-630; 10mM di EDTA), la miscela è stata incubata a 65° C per 10 min e successivamente dopo aver aggiunto 500 µl di potassio acetato a pH 6,5 è stata incubata in ghiaccio per 10 min. Dopo la centrifugazione per 10 min a 13 rcf, 650 µl di supernatante è stato trasferito in un nuovo tubo ove è stato aggiunto un egual volume di isopropanolo freddo. La miscela è stata incubata per 7 hrs a -80° C. Dopo la centrifugazione per

10 min a 13 rcf, il precipitato è stato lavato con etanolo al 70% e risospeso in 50 µl di H₂O DEPC. Il prodotto ottenuto è stato utilizzato come templatato per la successiva RT-PCR con i primers PepMV-TGB 5'-CACACCAGAAGTGCTTAAAGCA-3' e PepMV-UTR 5'-CTCTGATTAAGTTTCGAGTG-3', che include il gene della proteina di rivestimento (Mumford and Metcalfe, 2001). Successivamente, gli ampliconi ottenuti sono state sottoposti ad analisi mediante SSCP. La corsa è stata effettuata tecnica è stata effettuata (come descritto da Sambade *et al.*, 2002) in un gel non denaturato di poliacrilammide all'8% a 200 V a 4° C per 7 ore.

Tutti i campioni mostravano modelli semplici caratterizzati da due bande corrispondenti ai due filamenti di DNA, indicando che le popolazioni intra-isolati erano composte solo da una predominante variante genetica (aplotipo) che è stata sequenziata in ambedue le direzioni utilizzando un sequenziatore ABI PRIMS 3100 (Applied Biosystem).

Le sequenze ottenute sono state tagliate per rimuovere le zone TGB e UTR, lasciando solo i 714 nt del gene putativo della CP. Successivamente sono state recuperate dalla GenBank 180 sequenze provenienti da diversi Paesi geografici (i numeri di accesso sono riportati nella figura dell'albero filogenetico).

Diversi allineamenti di sequenze nucleotidica sono state eseguite con l'algoritmo CLUSTAL W versione 2.0 (Larkin et al., 2007). Per stimare il numero di sostituzioni nucleotidiche che si sono verificati, è stato necessario utilizzare un modello matematico considerando le frequenze nucleotidiche e il cambiamento di frequenza istantanea tra loro. Il modello di sostituzione che meglio si adatta a questi dati di sequenza è stato calcolato con il più basso criterio bayesiano di dati.

Relazioni filogenetiche sono state dedotte dal metodo della massima verosimiglianza (Kumar e Nei, 2000) con un bootstrap di 1000 replicazioni per stimare la significatività statistica di ciascun nodo (Efron *et al.*, 1996). Tutte queste analisi sono state eseguite utilizzando il programma MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011).

Successivamente, la distanza nucleotidica o la diversità della sequenza del gene CP-PepMV è stata stimata all'interno e tra diversi Paesi o regioni geografiche, che sono stati considerati sottopopolazioni. Per valutare la differenziazione genetica e il livello di flusso genico tra sottopopolazioni, tre test statistici basati sulla permutazione: K_s^* , Z^* e S_{nn} (Hudson *et al.*, 1992; Hudson, 2000) ed il test statistico F_{st} (Weir e Cockerham, 1984) sono state utilizzate. Tutti questi test sono implementati nel programma DnaSP 5.0 (Librado e Rozas, 2009).

Per studiare il ruolo della selezione naturale a livello molecolare, il tasso di sostituzioni sinonime per sito sinonimo (dS) e il tasso di sostituzioni non sinonime per sito non sinonimo (dN) è stato analizzato separatamente. Si presume che generalmente in una proteina solo modifiche non sinonime (che producono cambiamenti di aminoacidi) sono sottoposti a selezione in quanto possono alterare la funzione o la struttura proteica. La differenza tra dN e dS fornisce informazioni sul senso e l'intensità di selezione. Così $dN > dS$ indica selezione positiva o adattiva o Darwiniana, $dN < dS$ indica selezione negativa o depurativa e $dS \approx dN$ indica l'evoluzione neutra; maggiore è la differenza tra dN e dS, maggiore è la pressione selettiva. Questi valori sono stati stimati con il metodo Pamilo - Bianchi - Li (Pamilo e Bianchi, 1993), implementato nel programma MEGA 5.0. Successivamente selezionando i singoli codoni è stato studiato statisticamente la probabilità degli effetti fissi (FEL) e il

singolo conteggio della probabilità ancestrale (SLAC) con metodi disponibili dal server DATAMONKEY (<http://www.datamonkey.org>). Sono stati considerati solo i risultati concordanti utilizzando entrambi i metodi.

2.1.9. DIAGNOSI DEL PEPMV ATTRAVERSO UN NUOVO METODO DI RILEVAMENTO BASATO SULL'IBRIDAZIONE DI FLUSSO DI IMPRONTE SU MEMBRANA

2.1.9.1. VIRUS E MATERIALE VEGETALE SAGGIATO

Piante di pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) sono state raccolte dal 05 novembre 2012 al 11 gennaio 2013. Tutte le piante raccolte sono state saggiate per accertare la presenza di PepMV mediante saggi ELISA utilizzando un kit della Loewe. Successivamente sono state inoculate piantine di pomodoro con estratti di PepMV. Tutte le piantine inoculate sono state allevate in una cella termo condizionata ad una temperatura che oscillava dai 18 ai 24° C ed una luminosità di 16/8 hrs luce/buio. Dopo 30 giorni dall'inoculazione tutte le piante sono state saggiate mediante saggi ELISA. Le piante infette sono state mantenute nella cella termocondizionata per effettuare le prove, mentre le piante sane sono state eliminate.

Per sintetizzare la sonda, l'RNA totale di PepMV isolato da piante di pomodoro era usato come stampo per il cDNA mediante amplificazione di RT-PCR con i primer PepMV-TGB 5'–

CACACCAGAAGTGCTTAAAGCA-3'and PepMV-UTR 5'-
CTCTGATTAAGTTTCGAGTG-3'.

Le condizioni di PCR erano: 1 ciclo a 92° C per 2 min., seguito da 35 cicli a 94° C per 15 s, 55° C per 20 s e 72° C per 15 s e un passaggio di estensione finale di 72° C per 5 min. Il risultante cDNA era clonato in un vettore pGEM-T (Promega) è usato come stampo per la sintesi della sonda a digossigenina. Successivamente dai plasmidi è stata fatta una ulteriore PCR per ottenere gli ampliconi necessari per la sintesi della sonda. I prodotti ottenuti da PCR erano purificati con kit GFX PCR DNA (GE Healthcare) e usati come stampo per generare trascritti di RNA di senso negativo legati a digossigenina usando il kit Megascript T7 (Ambion) e miwlabeling DigRNA (Roche) seguendo le istruzioni del costruttore. Il Dig labeled trascritto era trattato con DNase esente da RNase (Roche) e purificato con il Rnaid w/Spin kit (Q-Bio gene). La sonda di RNA era denominata PepMV-CP1.

2.1.9.2. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

L'RNA totale era estratto da 0,5-3 g di tessuto fresco o essiccato usando un protocollo standard basato sull'estrazione mediante fenoli: cloroformio ed alcol isoamilico seguito da precipitazione con etanolo. I tessuti essiccati erano prima reidratati con acqua esente da RNase e frantumati con azoto liquido. Successivamente 500 µl di tampone di estrazione (Tris – HCl 0,2 M, EDTA 0,05M, NaCl 0,2 M, SDS 0,2%) e 2,5 µl di 2-B mercaptaetanololo erano aggiunti nel campione da omogeneizzare seguito da una incubazione per 5 min in ghiaccio.

Successivamente, 500 μ l di fenolo-cloroformio-alcol isoamilico nel rapporto 25:24:1 erano aggiunti seguiti da centrifugazione a 12000 rpm per 10 min a 4° C. La fase acquosa era trasferita in un tubo sterile e mescolata con 450 ml di fenolo-cloroformio-alcol isoamilico (25:24:1 - V:V:V) seguito da una centrifugazione a 12000 rpm per 15 min. Quindi, l'RNA era precipitato mescolando la fase acquosa con 3 volumi di etanolo e 0,1 volumi di sodio acetato 3M a pH 5,2 seguito da incubazione per 30 min a -80° C. Dopo una centrifugazione a 12.000 rpm per 30 min, il pellet contenente l'RNA era lavato con etanolo al 70% e dissolto in 25 μ l di acqua esente da RNase. 1 μ l di estratto era depositato in una membrana di nailon caricata positivamente. L'impronta era preparata (Roche) tagliando trasversalmente il picciolo fogliare e pressandolo sulle membrane. Ambedue i tipi di campione erano fissati sulle membrane di nailon irradiati con luce UV (250 mJ/cm²) in un forno da ibridazione.

2.1.9.3. IBRIDAZIONE MOLECOLARE

L'ibridazione molecolare era effettuata come descritto da Ferrer *et al.*, 2008, effettuando la pre-ibridazione e l'ibridazione a 68° C usando la sonda PepMV-CP1. L'ibridazione a flusso era effettuata usando un congegno Hybrimix (Hybririo Limited) che dava una pressione negativa usando una pompa da vuoto, cosicché tutte le soluzioni fluivano attraverso la membrana automaticamente. Solo piccoli volumi di queste soluzioni erano necessari (0,5 – 6 ml) appena sufficiente a coprire la membrana. La pressione del vuoto riduceva l'ibridazione a 30-60 sec. Preibridazione e ibridazione erano effettuate a 68° C usando 0,125 ml di

tampone ULTRAhyb (Ambion) per ogni cm² di membrana e 20 µg di sonda per ogni ml di tampone. Le membrane erano lavate 2 volte con 2 x SCS e 0,1% di SDS e altre 2 volte 0,1 x di SSC contenente lo 0,1 % di SDS a 68°; essi erano equilibrate con 10 mM di acido maleico, 150 mM di NaCl a pH 7,5, 0,3% (V/V) di Tween 20 e bloccate con tampone di bloccaggio [100 mM di acido maleico, 150 mM di NaCl a pH 7,5 e 1% (P/V) di reagente di bloccaggio (Roche)]. Anticorpi antidigossigenina – fosfati alcalina (Roche) erano successivamente aggiunti alla concentrazione di 150 mU/ml diluiti in tampone di bloccaggio e le membrane erano lavate 2 volte come nel precedente passaggio con 100 mM di acido maleico, 150 mM di cloruro di sodio, 0,3 % (V/V) di Tween 20 a pH 7,5 ed equilibrato per 2 min con 100 mM di Tris/HCl, 100 mM di cloruro di sodio a pH 9,5. La reazione era rilevata usando un substrato chemiluminescente CDP-star esponendo il film per 10 min a 37° C.



Fig. 24 - Schema di trattamento del campione per l'ibridazione molecolare convenzionale e di flusso (flow-through) per gli estratti di RNA (dot-blot) e di impronte vegetali (tessuto di stampa).

3. RISULTATI

3.1. INDAGINI DI CAMPO SULLA DIFFUSIONE DI PEPMV SU PIANTE DI POMODORO

Infezioni del virus del mosaico del pepino sono state riscontrate in tutta le aree da noi monitorate, cioè nella “fascia trasformata” della provincia di Ragusa che inizia da Gela sino ad arrivare a Pozzallo. Dei 1650 campioni saggiati n. 930 sono risultati infetti da PepMV (figura n. 15). Delle 930 risultanti infetti risultano affette anche da ToCV.

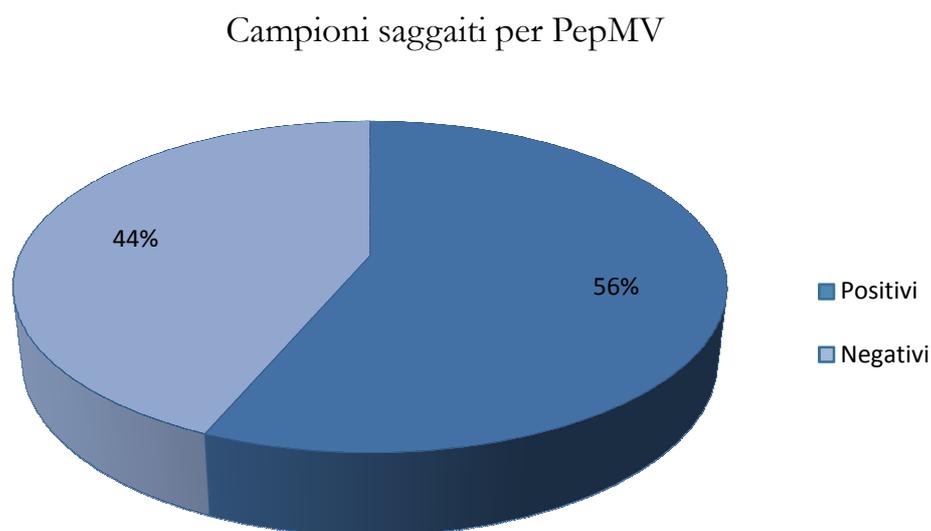


Figura 15 – Percentuale di piante riscontrate affette da PepMV su 1650 saggiate in diverse aree del ragusano.

Le piante infette sono state riscontrate in tutti i Comuni e le aree dove sono stati prelevati i campioni (figura n. 16). La percentuale di piante infette è risultata diversa nei Comuni monitorati. Infatti a Vittoria la percentuale di piante infetta era del 61% delle piante saggiate, a Scicli

del 32%, a Gela del 29%, a Ragusa del 25%, ad Acate del 40% e a Pozzallo del 6%. Durante le nostre indagini sono state riscontrate piante asintomatiche risultate positivi sia ai test Elisa che ai saggi mediante RT-PCR. Per quanto riguarda i saggi effettuati nella provincia di Siracusa e Messina il virus è stato riscontrato solo nelle aree di Pachino e Marzamemi.

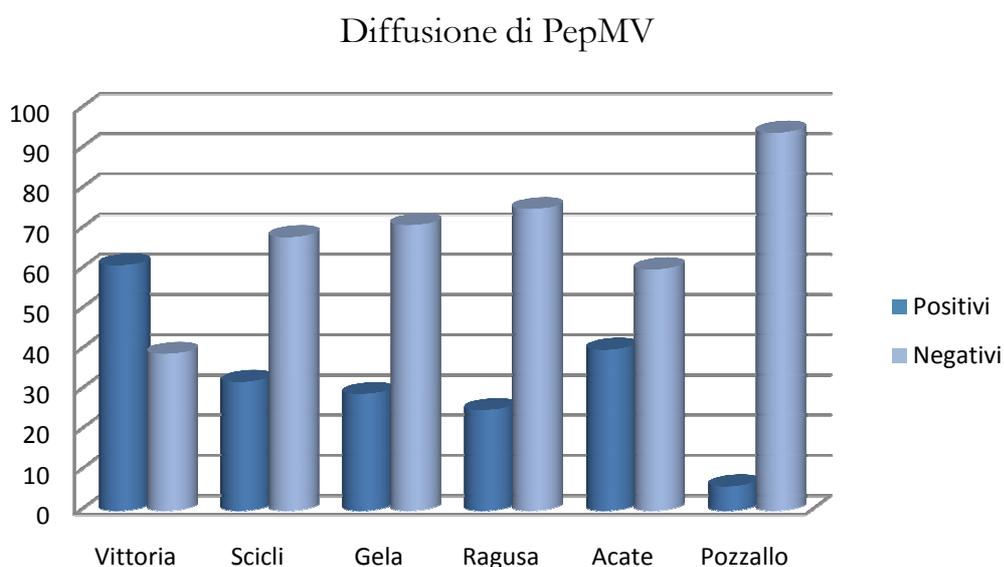


Figura 16 – Diffusione % di piante di pomodoro affette da PepMV a Gela (Caltanissetta) ed in alcuni Comuni della provincia di Ragusa.

3.2. PROVA DI TRASMISSIONE DI PEPMV MEDIANTE BOMBI

Come si evince dalla tabella n. 3 il numero di piante infette dal PepMV in ogni serra all'inizio delle prove era intorno a 10 %. I saggi effettuati alla fine di gennaio, febbraio e marzo hanno dimostrato un notevole incremento delle piante affette da PepMV. È importante sottolineare che nella serra dove erano stati utilizzati 70 bombi per 1.000 mq si è passati da una percentuale iniziale di piante infette intorno al

10% sino al 30% alla fine di Marzo. Nella serra dove erano stati utilizzati 150 bombi per 1.000 mq il numero di piante infette è aumentato da circa il 10% nel primo saggio sino ad arrivare quasi al 90% nel saggio effettuato a fine marzo. Come risulta chiaro nella tabella n. 3 nel tempo sono aumentate progressivamente il numero di piante infette.

Tabella 3 - Risultati prova trasmissione di PepMV mediante bombi.

	Tesi A: 70 bombi/1000mq					Tesi B: 150 bombi/1000mq				
	n. piante infette					n. piante infette				
Mese	Dic.	Gen.	Feb.	Mar.	% finale	Dic.	Gen.	Feb.	Mar.	% finale
Varietà										
Genio	58	112	122	152	30,4	62	197	302	442	88,4
Shiren	45	98	118	148	29,6	48	179	298	345	69,0
Piccadilly	49	79	105	138	27,6	47	169	272	345	63,0
Belize	43	68	101	129	25,8	41	137	224	279	55,8

3.3. INDAGINI SULLA PRESENZA DI PEPMV SU SPECIE DIVERSE - COLTIVATE E SPONTANEE

Come riportato nella tabella n. 4 sono state saggiate n.9 specie di piante spontanee e n.10 piante coltivate. Delle piante spontanee saggiate sono risultate infette da PepMV quelle di Malva per una percentuale complessiva del 80%, quindi delle 60 piante saggiate ben 48 sono risultate infette. Tra le piante coltivate sono risultate infette quelle di Basilico (figura n. 17), Pomodoro e Petunia hybrida. Circa l'80% delle piante di Pomodoro sono risultate infette da PepMV mentre per quanto

riguarda il basilico sono risultate positive il 50% delle piante saggiate e per Petunia circa il 30%.



Figura 17 – Pianta di basilico infetta da PepMV

Tabella 4 – Piante spontanee e coltivate saggate per infezioni del virus del mosaico del pepino.

PIANTE SAGGATE	GENNAIO	FEBBRAIO	MARZO
Basilico	+	+	+
Bromo	-	-	-
Cipolla	-	-	-
Erba medica arabica	-	-	-
Erigeron	-	-	-
Falsa ortica reniforme	-	-	-
Lattuga selvatica	-	-	-
Malva	+	+	+
Melanzana “gloria”	-	-	-
Ortica	-	-	-
Parietaria	-	-	-
Peperone	-	-	-
Petunia hybrida	+	+	+
Pomodoro “Belize”	+	+	+
Pomodoro “Ipparino”	+	+	+
Pomodoro “Ready”	+	+	+
Pomodoro “Snake”	+	+	+
Prezzemolo	-	-	-
Sonco	-	-	-

3.4. SAGGI PER ACCERTARE LA PRESENZA DI PEPMV NEI SEMI DI POMODORO

Tutti i semi prelevati dalle bacche di pomodoro delle varietà Genio, Shiren, Piccadilly e Belize sono risultati positivi al saggio per PepMV. Tutti i campioni saggiati nel mese di gennaio e febbraio e marzo hanno mostrato una elevata colorazione, mentre i saggi effettuati nel mese di Aprile hanno mostrato la stessa intensità di colorazione per la varietà Genio e Shiren (++) e una colorazione più bassa per quanto riguarda Piccadilly (+ ±) e nessuna colorazione per quanto riguarda Belize (tabella n. 5).

Questi dati dimostrano:

- che la quantità di virioni presenti era più elevata nelle prime due varietà;
- i risultati ottenuti per quanto riguarda le varietà Piccadilly e Belize effettuati nei mesi di aprile e luglio dimostrano una più bassa concentrazione virale e probabilmente una degradazione del capsido dei virioni.

Tab. 5 – Saggi per accertare la presenza di PepMV nei semi di pomodoro di linee diverse

	Gennaio				Febbraio				Marzo				Aprile				Luglio			
N. semi	4	8	16	32	4	8	16	32	4	8	16	32	4	8	16	32	4	8	16	32
Varietà																				
Genio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Shiren	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Piccadilly	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ -	+ -	+ -	+ -	-	-	-	-
Belize	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

3.5. PROVE DI TRASMISSIONE IN PIANTE DI POMODORO ATTRAVERSO IL SEME

Nessuna delle 1.600 piante utilizzate nella prova ha mostrato sintomi fogliari riferibili ad infezioni di PepMV pur allevando le stesse a temperatura intorno ai 20°C al fine di favorire la replicazione dei virioni.



Fig. 18 – Piantine in allevamento

Nessuna delle 800 piantine di 2 mesi di età ottenuta dai semi delle piante trattate con prodotti ad azione antivirali e non è risultata infetta da PepMV. I saggi ELISA sono stati ripetuti 800 sulle restanti piantine di tre mesi di età derivanti dai semi trattati e non, come le precedenti sono risultate negative a PepMV (figura n. 19).



Figura 19 – Preparazione campioni per il test ELISA.

3.6. INDIVIDUAZIONE DEI PIÙ IMPORTANTI VIRUS A RNA CHE INFETTANO LE PIANTE DI POMODORO.

I risultati ottenuti sono riportati nelle figure n. 21 e 22.

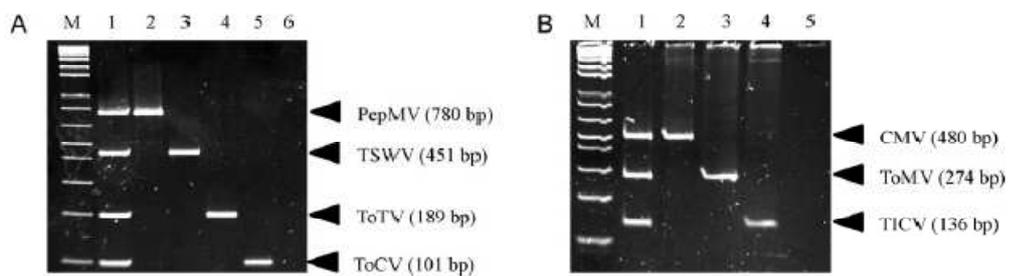


Fig. 21 – Panel (A) Multiplex PCR per la rilevazione di plasmidi bersaglio di PepMV, TSWV, ToTV e ToCV; corsia M, peso molecolare marcatore 1kb (Invitrogen); corsia 1, rilevazione simultanea di PepMV, TSWV, ToTV e ToCV; corsia 2, specifica individuazione di PepMV; corsia 3, rilevazione specifica di TSWV; corsia 4, l'individuazione specifica di ToTV; corsia 5, l'individuazione specifica di ToCV; corsia 6, controllo negativo di una pianta di pomodoro privo di virus.

Panel (B) Multiplex PCR per il rilevamento di CMV, ToMC, TICV; corsia M, marcatore di peso molecolare 1 kb (Invitrogen); corsia 1, rilevazione simultanea di

CMV, ToMV e TICV; corsia 2, l'individuazione specifica di CMV; corsia 3, l'individuazione specifica di ToMV; corsia 4, l'individuazione specifica di TICV; corsia 5, controllo negativo di una pianta di pomodoro privo di virus.

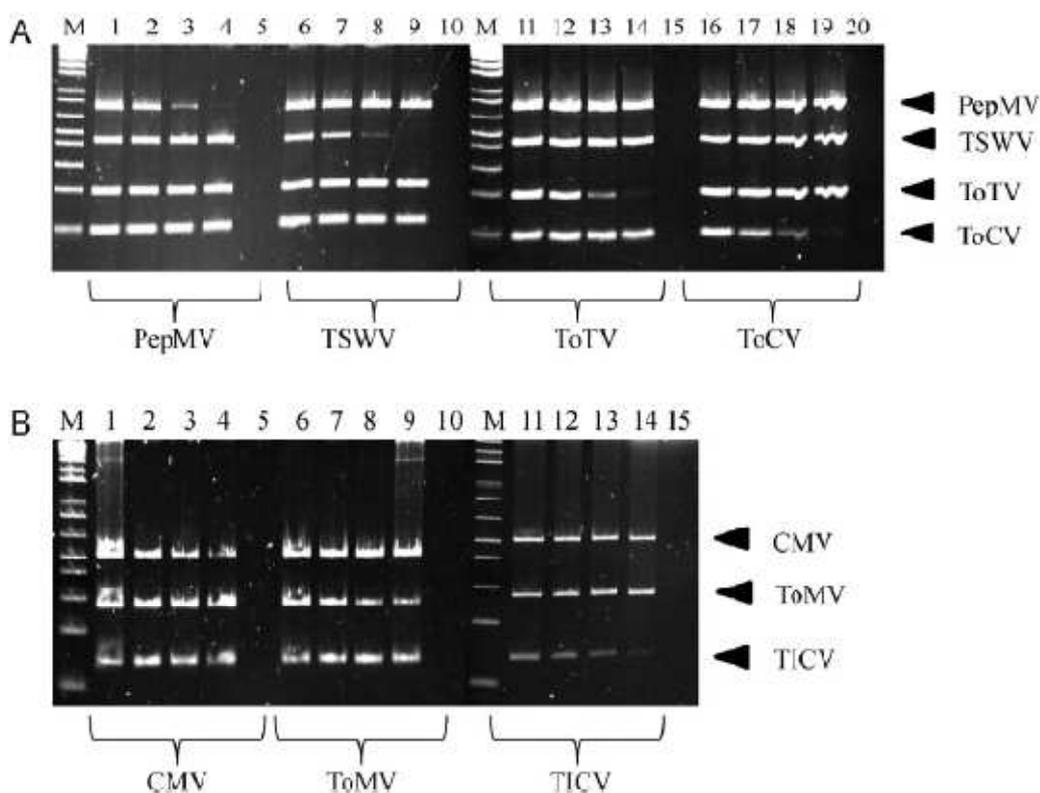


Fig. 22 – Panel (A) Multiplex PCR per la rilevazione di plasmidi bersaglio di PepMV, TSWV, ToTV e ToCV; corsia M, marcatore di peso molecolare 1 kb (Invitrogen), corsie 1-4, 10 diluizioni seriali del bersaglio PepMV (da 1 ng a 10^{-4} ng), mantenendo TSWV, ToTV, ToTV e ToCV a concentrazioni target da 1 ng; corsia 5, controllo negativo di una pianta di pomodoro privo di virus; lanes 6-9, 10 diluizioni seriali del bersaglio TSWV (da 1 ng a 10^{-4} ng), mantenendo le concentrazioni target PepMV, ToTV e ToCV a 1 ng; corsia 10, controllo negativo di una pianta di pomodoro privo di virus; corsie 11-14, 10 diluizioni seriali del bersaglio ToTV (da 1 ng a 10^{-4} ng), mantenendo le concentrazioni target PepMV, TSWV e TOCV a 1 ng; corsia 15, controllo negativo di una pianta di pomodoro priva di virus; corsie 16-19, 10 diluizioni seriali di destinazione ToCV (da 1 ng a 10^{-4} ng), mantenendo la PepMV, TSWC e concentrazioni target ToTV a 1 ng; corsia 20, controllo negativo di un pomodoro privo di virus.

Panel (B) Multiplex PCR per il rilevamento di CMV, ToMV, TICV; corsia M, marcatore di peso molecolare 1 kb (Invitrogen); corsie 1-4, in 10 diluizioni seriali di CMV (da 1 ng a 10^{-4} ng), mantenendo la concentrazione ToMV e TICV target a 1 ng; corsia 5, il controllo negativo di una pianta di pomodoro esente da virus; corsie 6-9, 10 diluizioni seriali del bersaglio ToMV (da 1 ng per 10^{-4} ng), mantenere le concentrazioni target di CMV e TICV a 1 ng; corsia 10, controllo negativo di una pianta di pomodoro esente da virus; corsie 11-14, 10 diluizioni seriali di TICV (da 1

ng a 10^{-4} ng), mantenendo CMV e ToMV a concentrazioni target di 1 ng; corsia 15, il controllo negativo di una pianta di pomodoro esente da virus.

Tutte le prove sono state ripetute con estratti di RNA di piante infette dando i risultati attesi, figura n. 23.

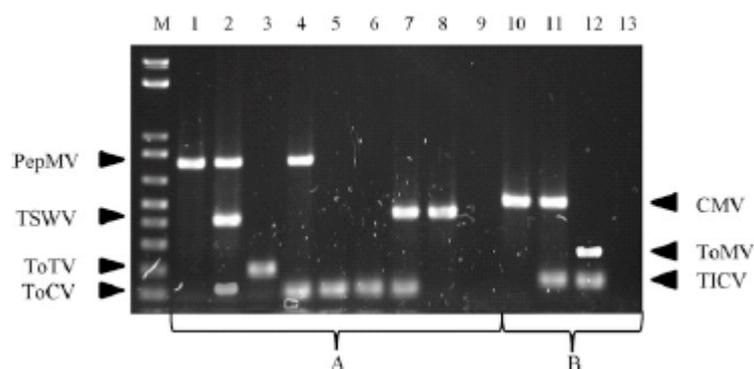


Fig. 23 – Multiplex RT-PCR risultata dall'analisi di piante di campo di pomodori raccolti in Sicilia; corsia M, marcatore di peso molecolare 1 kb (Invitrogen). Pannello (A) Multiplex RT-PCR per il rilevamento di PepMV, TSWV, ToTV e ToCV; corsia 1, il rilevamento di una singola infezione da PepMV; corsia 2, rilevamento di un'infezione mista da PepMV, TSWV e ToCV; corsia 3, rilevamento di una singola infezione da ToTV; corsia 4, il rilevamento di un'infezione mista da PepMV e ToCV; corsie 5 e 6, il rilevamento di infezioni singole da ToCV; corsia 7, la rilevazione di una infezione mista di TSWV e ToCV; corsia 8, il rilevamento di una singola infezione da TSWV; corsia 9, controllo negativo di una pianta di pomodoro esente da virus.

Pannello (B) Multiplex RT-PCR per il rilevamento di CMV, ToMV e TICV; corsia 10, il rilevamento di una singola infezione da CMV; corsia 11, rilevamento di un'infezione mista da CMV e TICV; corsia 12, rilevamento di un'infezione mista da ToMV e TICV; corsia 13, controllo negativo di una pianta di pomodoro esente da virus.

Al fine di capire se la tecnica sviluppata potesse avere un'efficacia tale da poter essere utilizzata in diagnosi tradizionale, prove di comparazione sono state effettuate tra la nostra tecnica e kit commerciali DAS-ELISA disponibili oppure RT-PCR sigleplex già riportati in letteratura. In tutti i casi la multiplex e la singleplex RT-PCR si sono

dimostrate efficaci allo stesso modo per l'individuazione di tali patogeni mentre i saggi DAS-ELISA, ove applicabili si sono dimostrati circa 100 volte meno sensibili delle RT-PCR.

I risultati sono riportati nella tabella n. 4. Da come si evince dalla tabella n. 4 risultati simili si sono ottenuti comparando la tecnica delle due multiplex con le singleplex mentre risultati meno soddisfacenti si sono ottenuti con i saggi sierologici.

Analizzando in dettaglio i dati possiamo dire che il virus più prevalente era ToCV che è stato individuato in 32 piante, seguito da TSWV in 25 piante, CMV in 20 piante, PepMV in 17 piante, ToMV in 12 piante, ToMV in 12 piante, TICV in 6 piante e ToTV in 2 piante. Tre piante risultarono esenti da infezioni virali. Singole infezioni virali erano presenti in 8 piante, mentre 10 piante erano infette da due virus, 13 piante da tre virus, 8 piante da quattro virus e 3 piante da cinque virus, tabella n. 4. Questi dati mostrano che le infezioni miste con diversi virus sono frequenti. Le interazioni fra virus coinfezzanti la stessa pianta possono avere un importante impatto nelle epidemie e potevano incrementare il danno nelle coltivazioni. Se sorgono fenomeni di sinergismo (Syller, 2012) saggiando un addizionale numero di piante si dovrebbe confermare questi risultati per la distribuzione di certi virus che era differente in ciascuna provincia in Italia.

Tab. 4 - Analisi di 45 piante di pomodoro raccolti in Sicilia utilizzando multiplex RT-PCR, singleplex RT-PCR e ELISA

Geographic origin	Multiplex RT-PCR							DAS-ELISA (1) and singleplex RT-PCR (2)						
	PepMV	TSWV	ToTV	ToCV	CMV	ToMV	TICV	PepMV (1,2)	TSWV (1,2)	ToTV (2)	ToCV (2)	CMV (1,2)	ToMV (1,2)	TICV (2)
Ragusa Province	+	-	+	-	-	+	+	++	---	+	-	---	++	+
	+	-	+	+	+	+	+	++	---	+	+	---	++	+
	+	+	-	+	+	-	+	++	++	-	+	++	---	+
	-	+	-	+	-	-	-	---	++	-	+	---	---	-
	+	-	-	+	-	-	-	++	---	-	+	---	---	-
	-	-	-	-	-	-	-	---	---	-	-	-	---	-
	+	-	-	+	-	-	-	++	---	-	+	---	---	-
	-	-	-	+	-	-	+	---	---	-	+	---	---	+
	-	-	-	+	-	-	-	---	---	-	+	---	---	-
	+	+	-	+	-	-	-	++	++	-	+	---	---	-
	+	-	-	-	-	-	-	++	---	-	-	---	---	-
	+	-	-	-	-	-	-	++	---	-	-	---	---	-
	-	-	-	+	-	-	+	---	---	-	+	---	---	+
	Agrigento Province	+	-	-	+	+	+	-	++	---	-	+	++	++
+		-	-	+	+	+	-	++	---	-	+	++	++	-
+		+	-	-	+	+	-	++	++	-	-	++	++	-
-		+	-	+	+	-	-	---	++	-	+	++	---	-
-		-	-	+	-	-	-	---	---	-	+	---	---	-
-		-	-	+	-	-	-	---	---	-	-	---	---	-
-		+	-	+	+	+	-	---	++	-	+	+	++	-
-		+	-	+	+	+	-	---	++	-	+	+	++	-
-		+	-	-	+	+	-	---	++	-	-	+	++	-
-		+	-	-	+	+	-	---	++	-	-	+	++	-
-		-	-	+	-	-	-	---	---	-	-	-	---	-
-		-	-	+	+	+	-	---	++	-	+	+	++	-
-		+	-	+	+	+	-	---	++	-	+	+	++	-
-		+	-	-	+	+	-	---	++	-	-	+	++	-
Trapani Province	-	-	-	+	+	-	-	---	---	-	+	++	---	-
	-	+	-	+	+	-	-	---	++	-	+	++	---	-
	-	+	-	+	+	-	-	---	++	-	+	++	---	-
	+	+	-	+	+	+	-	++	++	-	+	++	++	-
	-	+	-	+	+	-	-	---	++	-	+	++	---	-
	+	+	-	+	+	-	-	++	++	-	+	++	---	-
	+	+	-	-	-	-	-	++	++	-	-	---	---	-
	-	+	-	+	-	-	-	---	++	-	+	---	---	-
	-	-	-	-	-	-	-	---	---	-	-	-	---	-
	-	+	-	+	+	-	-	---	++	-	+	++	---	-
	-	+	-	+	+	-	-	---	++	-	+	++	---	-
	-	+	-	+	+	-	-	---	++	-	+	++	---	-
	-	+	-	+	+	-	-	---	++	-	+	++	---	-
	-	+	-	+	+	-	-	---	++	-	+	++	---	-

Le procedure sviluppate in queste prove basate su due saggi di multiplex PCR permettono la rapida identificazione dei più importanti virus che infettano il pomodoro e soprattutto per le analisi di infezioni miste, in modo da risparmiare tempo, reagenti e costi. Questa metodologia potrebbe essere inclusa nei protocolli fitosanitari per la individuazione precoce di questi virus nei vivai o nei programmi di certificazione.

3.7 SEQUENZIAMENTO DI UN ISOLATO DI PEPMV RICONTRATO IN SICILIA

3.7.1. GENOTIPIZZAZIONE MEDIANTE RT-QPCR

La capacità della RT-qPCR per individuare i diversi genotipi di PepMV presenti in un dato campione di pomodoro è stata valutata usando i genotipi UE-pomodoro e Ch2 come controlli positivi.

Piante di pomodoro sane sono state utilizzate come controllo negativo. Tutti i saggi RT-qPCR individuano efficacemente il corrispondente specifico ceppo permettendo la valutazione genotipica degli isolati virali collezionati. Ambedue i genotipi Ch2 e EU-TOM erano molto efficienti nel discriminare gli isolati del virus, fornendo un valore di Ct medio di circa 18 Ct senza nessuna interferenza crociata tra i due ceppi. Solo il genotipo Ch2 è stato individuato tra gli isolati virali analizzati che includono il ceppo individuato nel 2001 in Sardegna (Roggero *et al.*, 2001); dunque, il ceppo Sardegna rappresenta la prima segnalazione in Europa di Ch2, poiché, in quel tempo solo il ceppo EU-TOM era conosciuto, mentre il ceppo denominato Ch2 era stato riscontrato in Spagna solo nel 2004 (Pagán *et al.*, 2006).

3.7.2. IL SEQUENZIAMENTO DEGLI ISOLATI ITALIANI

La sequenza genomica completa di ciascuno dei quattro isolati italiani usati durante le nostre prove è stata determinata da successive RT-PCR e derivata libreria di cloni di cDNA utilizzando la strategia del genome walking. La comparazione delle sequenze nucleotidiche dei cloni di ciascun amplicone assicura accuratezza nel sequenziare un isolato puro

ed ottenere una sequenza maggioritaria. Le sequenze assemblate dai seguenti isolati sono state depositate in GenBank come PepMV-Sar09 (accessione No. HQ663890), PepMV-Sic1.09 (HQ663891), PepMV-Sic2 (HQ663892), PepMV-Sar01 (HQ663893). La lunghezza del genoma dei quattro isolati variava da 6.412 a 6.459 nt. L'RNA assemblato era organizzato come precedentemente riportato per genoma di PepMV (Aguilar *et al.*, 2002; Cotillon *et al.*, 2002).

3.7.3. ANALISI FILOGENETICA E OMOLOGIA DI SEQUENZA

Gli isolati italiani di PepMV erano filogeneticamente correlati al ceppo Ch2 (figura n. 24) variando dal 97,2% al 98,5% di identità e similarità al livello aminoacidico rispettivamente con le sequenze di riferimento pubblicate (DQ 000985) (Ling, 2007).

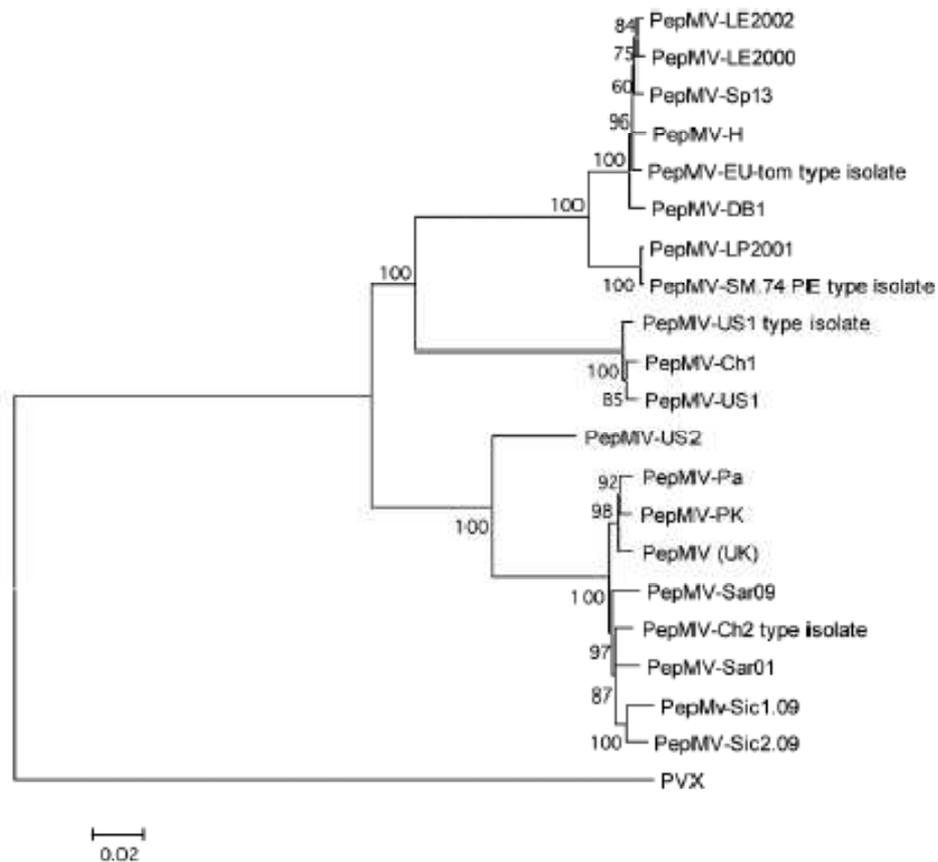


Fig. 24 - Relazione filogenetica di PepMV-Sar09 (accessione No. HQ663890), PepMV-SIC2 (HQ663891) e PepMV-SAR01 (HQ663893) sulla base delle sequenze genomiche complete di questi e di altri ceppi virali da GenBank: PepMV-LE2002 (adesione No. AJ606360); PepMV-LE2000 (AJ606359); PepMV-SP13 (Nc004067); PepMV-H (AM491606); PepMV-EU-TOM (FJ940223); PepMV-DB1 (FJ940224); PepMV-LP2001 (AJ606361); PepMV-SM74 (AM109896); PepMV-US1 (AY509926); PepMV-CH1 (DQ00984); PepMV-US1 (FJ940225); PepMV-US2 (AY509927); PepMV-Pa (FJ612601); PepMV-PK (EF408821); PepMV-UK (FJ212288); PepMV-Sar09 (HQ663890); PepMV-CH2 (DQ000985); PepMV-Sic2.09 (HQ663892). Supporto per i nodi di analisi bootstrap con 10.000 repliche viene mostrato per valori superiori al 50%. Patato virus X (PVX) è stato utilizzato come outgroup.

Quando, invece, comparati con le sequenze di riferimento dei ceppi US1 (AY 509926) (Maroon-Longo *et al.*, 2005) e EU-TOM (940223) (Van der Vlugt *et al.*, 2002) gli isolati italiani mostravano una identità del 77,5% e 78% rispettivamente, al livello aa. Inoltre, è stata calcolata la percentuale di similarità a livello aa di ciascuno degli ORFs (RdRp, TGB1, TGB2, TGB3 e CP) degli isolati italiani rispetto all'isolato PepMV-Ch2 (DQ000985). È interessante notare che gli isolati siciliani hanno le maggiori differenze nelle regioni RdRp e TGB1 mentre gli isolati Sardegna mostrano le maggiori differenze nella regione TGB2 (tabella n 8). Comparando le sequenze nucleotidiche complete di PepMV italiano con quelle di PepMV-Ch2 mediante il programma Vector NTI 9.0.0, regioni significativamente variabili erano identificate solo negli isolati siciliani di PepMV. Specificatamente, PepMV-Sic 1.09 mostra divergenze localizzate nella regione della replicasi nella porzione putativa dal nt 744 a 785 e da 4279 a 4312, che risultava in una modificazione di aa compresa entro i residui da 220 a 234 e da 1399 a 1409 della corrispondente proteina putativa RdRp. Queste regioni variabili erano al di fuori dei domini putativi tipo metiltrasferasi (aa59 a 224) specifico per "Sundbis-like" virus supergruppo (Razanov *et al.*, 1992); (ii) il dominio putativo NTPase /elicasi (aa708-934) con il motivo NTP GCGGSGRS e VVIFDD (Kadarè e Haenni, 1997; Kamer e Argos, 1994) e (iii) il dominio RdRp caratterizzato dal motivo SGEGPTFDANT (22aa) ed il motivo GDD (Kamer e Argos, 1994). PepMV-Sic2.09 mostra solo una regione variabile nel gene putativo replicasi dal nucleotide 712 a 778 che risultò in un aa modificazione entro residui 209 e 231.

Le sequenze aminoacidiche modificate erano analizzate al fine di predire la corrispondente struttura proteica secondaria.

Tab. 8 – Identità e similarità (tra parentesi) in % degli amino acidi delle regioni genomiche comprese tra l'isolato italiano di PepMV e il riferimento PepMV-CH2 ceppo (DQ000985).

	RdRp	TGB1	TGB2	TGB3	CP
PepMV-Sic1.09	96.9 (97.8)	95.7 (97.0)	97.6 (98.4)	98.8	100
PepMV-Sic2.09	97.4 (98.2)	94.9 (96.2)	97.6 (98.4)	98.8	100
PepMV-Sar09	98.2 (99.6)	100	96.7 (98.4)	98.8	99.2
PepMV-Sar01	98.3 (99.0)	96.2 (96.2)	98.4 (99.2)	98.8	99.2

Due delle identificate regioni variabili coinvolgevano una differente forma geometrica quando confrontata con quella rilevata da tutte le sequenze aa analizzate di PepMV Ch2. In particolare, un avvolgimento di conformazione alpha-helix/random (PepMV Sic 1.09) invece di due struttura a beta-shift (PepMV Ch2 isolato di riferimento) entro i residui 220-334 del polipeptide RdRp era il maggior mutamento nel polipeptide stesso. Come precedentemente riportato (Gutierrez-Aguirre *et al.*, 2009; Hasiow-Jaroszawska *et al.*, 2008b) distinzioni genotipiche degli isolati di PepMV possono essere favorevolmente effettuati mediante RT-qPCR ma questo metodo diagnostico non può fornire una estesa informazione sulla variabilità genetica.

Nei nostri studi, diverse strategie sono state usate per indagare le proprietà molecolari della sequenza completa degli isolati italiani di PepMV. In prima istanza sono state effettuate le analisi di sequenza mediante allineamento, identità e similarità dei singoli nucleotidi. Il software vector NTI 9.0.0 fornì una rapida grafica identificazione delle regioni più variabili a livello nucleotidico. In seguito esaminando tratti della struttura secondaria della proteina nelle regioni variabili a livello aa verificavamo alcune differenti forme genomiche nei nostri isolati rispetto

alla sequenza di riferimento PepMV-Ch2. Il significato di questi cambi nella forma della struttura secondaria osservata nei nostri isolati è attualmente sconosciuta. Studi sul ruolo della conformazione della catena polipeptidica in Virologia vegetale sono pochi (Lin *et al.*, 2009; Nemykh *et al.*, 2008; Rantalainen *et al.*, 2010; Rossman *et al.*, 1983; Shaumugan *et al.*, 2005). Comunque, ogni variazione della struttura secondaria avrà sicuramente un impatto significativo sia sulla patogenicità che sulla genomica funzionale del virus stesso.

3.8. STUDIO DEL FLUSSO GENICO E DELLA DISPERSIONE DI PEPMV IN SICILIA

I campioni sono stati prelevati a caso dalle piante asintomatiche e sintomatiche durante il periodo 2011-2013. L'anno e il punto di raccolta sono stati riportati nella tabella n. 6. Dei 1.800 campioni testati con DAS-ELISA utilizzando anticorpi policlonali, 676 danno risultati positivi. Nella tabella n. 6 è stato riportato il numero di piante infette per piante raccolte per un determinato anno e per provincia.

Tab. 6 – Numero di piante infette per piante analizzate prelevate nelle diverse province, nei mesi e negli anni.

Province	Numero di piante infette per piante analizzate		
	Gennaio 2011	Gennaio 2012	Gennaio 2013
Agrigento	0/100	29/100	42/100
Caltanissetta	0/100	28/100	68/100
Palermo	0/100	34/100	43/100
Ragusa	78/100	85/100	88/100
Siracusa	0/100	14/100	65/100

Trapani	0/100	32/100	70/100
Totale	78	222	376

È interessante notare che dal 2011 2013, la malattia ha avuto un progressivo aumento, infatti la percentuale di piante infette era circa il 13% nel 2011, mentre è aumentata al 37% nel 2012 e nel 2013 venne fino a circa il 63%. Inoculazioni meccaniche hanno consentito di trasmettere PepMV a 8 delle 9 piante erbacee sintomatiche, dal momento che tutti gli esperimenti concernenti *C. annuum* sono risultati negativi.

Nella tabella n. 8, sono state riportate le reazioni delle piante indicatrici, e la sindrome mostrata a 1, 2, 3 e 4 settimane dopo l'inoculazione. Lo studio dell'Host range ha mostrato differenze più visibili soprattutto su *Datura spp.* e su *N. benthamiana*. Queste due specie hanno mostrato sintomi sin dalla prima settimana dopo l'inoculazione, mentre *L. esculentum* che è l'ospite principale dove PepMV è stato raccolto ha mostrato sintomi solo dalla terza settimana dopo l'inoculazione. È importante notare che *Ocimum basilicum* e *Petunia hybrida* hanno mostrato sintomi alla terza e alla quarta settimana dopo l'inoculazione (tabella n. 7).

Tab. 7 – Livello basso di bollosità (lbl), deformazione sulle foglie (ld); bollosità (b); mosaico sulle foglie mature (mml); livello basso spumeggiante da parte basale delle giovani foglie (lblyl); bollosità sulle giovani foglie (byl); foglie a lento sviluppo (lsd); leggero mosaico (mm); alcune bolle sulle foglie giovani (fbyl); leggera deformazione (md); ingiallimento internervale (y).

Host	I settimana	II settimana	III settimana	IV settimana
<i>C. quinoa</i>	-	-	-	-
<i>N. benthamiana</i>	lbl	ld - b	ld - b	ld - b
<i>N. tabaci</i>	-	-	-	mml
<i>N. clevelandi</i>	-	-	-	-
<i>Datura spp.</i>	lblyl	byl-lsd	byl-lsd	byl-lsd-mm
Tomato	-	-	fbyl	byl
<i>C. annuum</i>	-	-	-	-

<i>Petunia hybrida</i>	-	md	md	md
<i>O. basilicum</i>	-	-	y	y

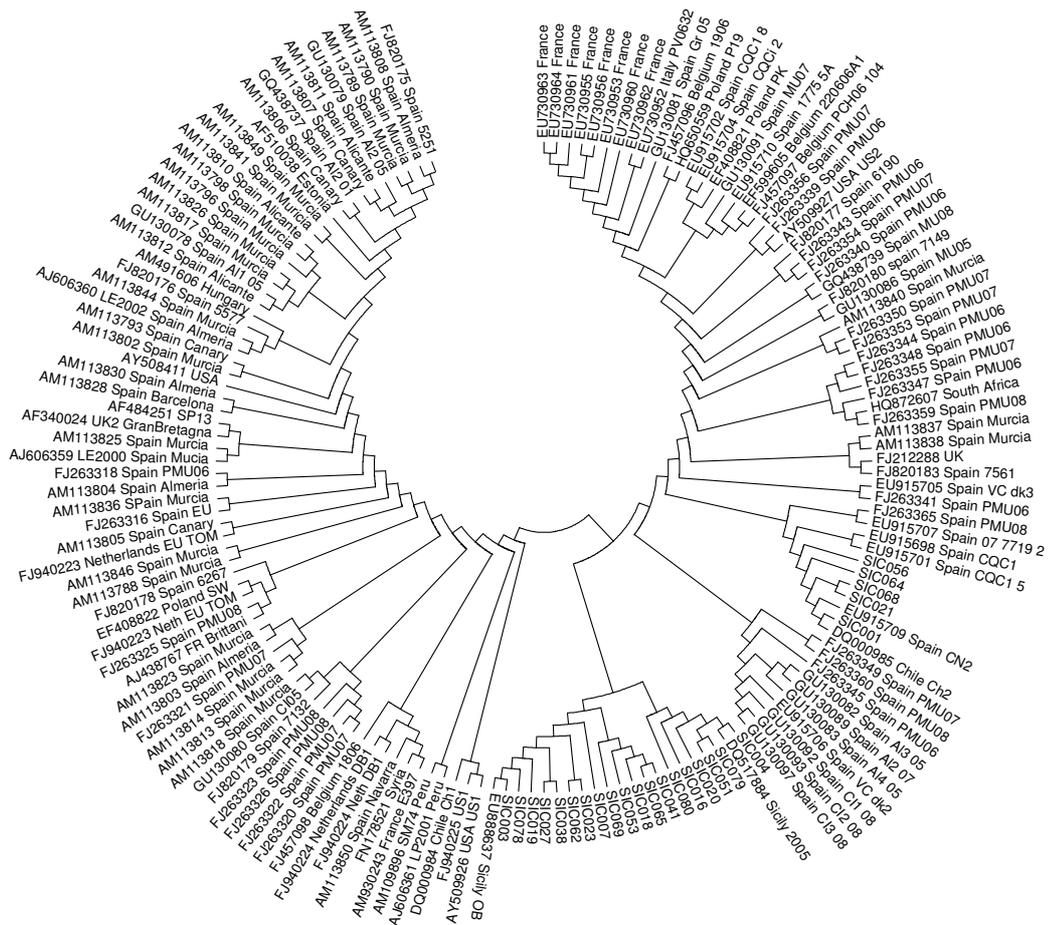
PepMV è stato individuato su *Ocimum basilicum* nel 2008 (Davino *et al.*, 2009), mentre su *Petunia hybrida* è la prima volta che vien segnalato come ospite. Tutti i risultati sono stati confermati da una successiva prova di DAS-ELISA.

Dei 68 campioni utilizzati per l'analisi molecolare, corrispondenti al 10 % del totale dei campioni che hanno dato risultato positivo con DAS-ELISA, tutti hanno prodotto l'atteso frammento 844 bp corrispondente al gene della CP e al blocco TGB e all' UTR. Nessuna amplificazione è stata ottenuta da piante di pomodoro coltivate in serra e utilizzate come controllo negativo. Successivamente sono state effettuate analisi SSCP del prodotto 844bp e tutti i campioni hanno mostrato modelli semplici, caratterizzati da due bande corrispondenti ai due filamenti di DNA che indica che le popolazioni intra-isolate sono composte solo da una variante genetica predominante (aplotipo), come conseguenza 68 prodotti di RT-PCR sono stati sequenziati in entrambe le direzioni. Le sequenze ottenute sono state tagliate per rimuovere le parti TGB e UTR, lasciando solo 714 nt corrispondenti alla CP-PepMV.

Gli allineamenti di sequenza nucleotidica sono state eseguiti con l'algoritmo CLUSTAL W (Larkin *et al.*, 2007). Per stimare il numero di sostituzioni nucleotidiche che si sono verificate, è stato necessario utilizzare un modello matematico che considera le frequenze nucleotidiche e il cambiamento di frequenza istantanea tra loro. Il modello di sostituzione che meglio si adatta a questi dati di sequenza (con il più basso criterio di informazione Bayesiano) è risultato il TN93: modello Tamura-Nei (Tamura, 1992), ipotizzando tassi di sostituzione

variabili tra i siti nucleotici ($\alpha = 0,79$). Relazioni filogenetiche sono state dedotte mediante il metodo di massima verosimiglianza (NEI e Kumar, 2000) con 1000 repliche di bootstrap per stimare la significatività statistica di ciascun nodo (Efron *et al.*, 1996). Tutte queste analisi sono state eseguite con il programma MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). Le analisi filogenetiche hanno dimostrato che tutti gli isolati italiani di PepMV erano strettamente correlati con l'isolato Cile Ch2 (figura n. 25).

Fig. 25 – Albero filogenetico più probabile costruito mediante l'algoritmo Maximumlikelihood utilizzando un bootstrap di 1000 repliche



Tab. 8 – Diversità nucleotidica tra le diverse sottopopolazioni e valori non significativi di Fst, K*, Z* e Snn.

Subpo. ^a	N. ^b	Belgium	Poland	Spain	New World	Italy	France	Netherlands
Belgium	4	0,173±0,018 ^c	0,145±0,015 ^d	0,181±0,018 ^d	0,225±0,020 ^d	0,095±0,010 ^d	0,128±0,013 ^d	0,257±0,027 ^d
		-0,362Fst	0,23±0,022 ^c	0,179±0,018 ^d	0,217±0,018 ^d	0,121±0,012 ^d	0,143±0,014 ^d	0,230±0,023 ^d
Poland	3	0,636Snn						
		0,614Kst						
		0,428Z						
Spain	92	0,040 Fst	-0,132Fst	0,177±0,017 ^c	0,200±0,017 ^d	0,192±0,019 ^d	0,183±0,018 ^d	0,161±0,016 ^d
		0,138Snn	0,901Snn					
		0,137Kst	0,741Kst					
		0,184Z	0,895Z					
New World	8	0,148Fst	0,003Fst	0,088 Fst	0,200±0,018 ^c	0,246±0,022 ^d	0,229±0,020 ^d	0,160±0,014 ^d
		0,306Snn	0,612Snn	---				
		0,203Kst	0,571Kst	---				
		0,104Z	0,287Z	---				
		0,072Fst	0,022Fst	0,502 Fst	0,516Fst	0,010±0,002 ^c	0,081±0,008 ^d	0,340±0,035 ^d
Italy	27	---	---	---	---	---	---	---
		---	---	---	---	---	---	---
		---	---	---	---	---	---	---
		-0,112Fst	-0,201Fst	0,191 Fst	0,266Fst	0,197Fst	0,012±0,013 ^c	0,268±0,027 ^d
		---	0,137Snn	---	---	---	---	---
France	10	0,095Kst	0,129Kst	---	---	---	---	---
		---	0,074Z	---	---	---	---	---
		0,649Fst	0,481Fst	0,435 Fst	0,417Fst	0,966Fst	0,755Fst	0,004±0,002 ^c
		0,053Snn	0,296Snn	0,936Snn	---	---	---	---
		---	0,125Kst	---	---	---	---	---
		---	0,140Z	---	---	---	---	---

a Raggruppamento delle sottopopolazioni.

b Numero di isolate di PepMV utilizzati.

c Diversità nucleotidica ± errore standard all'interno del gruppo.

d Diversità nucleotidica ± errore standard tra i distinti gruppi.

Valori non significativi di Fst, Z*, K* e Snn.

Nessuna correlazione è stata trovata tra parentela genetica e la posizione geografica o l'anno di raccolta. All'interno di ogni sottogruppo filogenetico di PepMV la distanza nucleotidica o la diversità tra i gruppi legati in Italia erano 0,095 con il gruppo del Belgio, 0,121 con il gruppo della Polonia, 0,192 con gruppo della Spagna, 0,246 con il gruppo del Nuovo Mondo, 0,081 con il gruppo della Francia e 0,340 con il gruppo olandese. Questi dati suggeriscono un GeneFlow moderato tra la Francia e il Belgio in Italia. La diversità della sequenza nucleotidica per l'Italia (intra-gruppo) era 0,010 e questo dato evidenzia che PepMV si è diffuso rapidamente nelle sei province oggetto dello studio.

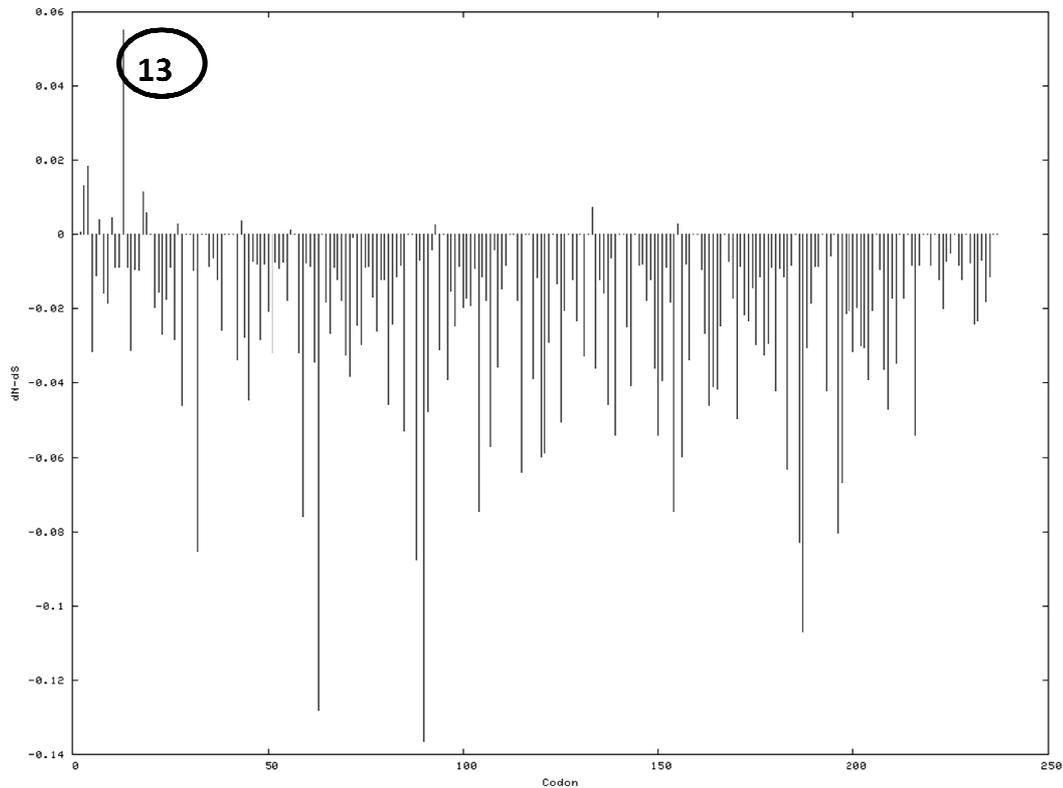
Per valutare la differenziazione genetica e il livello di flusso genico tra sottopopolazioni, sono stati utilizzati tre test statistici basati sulla

permutazione: Ks^* , Z^* e Snn (Hudson *et al.*, 1992; Hudson, 2000) ed il test Fst (Weir e Cockerham, 1984). Due sottopopolazioni con una distribuzione simile di varianti di sequenza darebbe un valore Fst che è statisticamente diverso da zero, mentre un valore di Fst uguale a 1 indicherebbe una separazione totale. Tutti questi test sono implementati nel programma DnaSP 5.0 (Librado e Rozas, 2009). Il Ks^* , Z^* e lo Snn erano significative nella maggioranza dei casi, suggerendo una differenziazione genetica tra sottopopolazioni: risultati tabella n. 8.

Sono stati segnalati solo non significativi valori di Ks^* , Z^* e Snn e sono stati riportati in tabella n. 8. Per studiare il ruolo della selezione naturale a livello molecolare, il tasso di sostituzioni sinonime per sito sinonimo (dS) e il tasso di sostituzioni nonsinonime per sito nonsinonimo (dN) sono stati analizzati separatamente. Il gene della proteina di rivestimento del PepMV aveva rispettivamente valori di dN e di dS pari a 0,003 e 0,029, indicando selezione negativa a causa di vincoli funzionali e strutturali, che si verifica che le proteine hanno raggiunto un elevato livello di adattamento.

Il rapporto dN/dS era di 0,103. La selezione a singoli codoni è stata statisticamente provata dalla probabilità a effetti fissi (FEL) e dalla probabilità ancestrale (SLAC); metodi disponibili dal server DATAMONKEY. Sono stati considerati solo i risultati concordanti (utilizzando entrambi i metodi). Questa analisi ha mostrato un sito selezionato positivamente situato in posizione aa 13 (figura n. 26) che potrebbe essere il risultato di un adattamento di PepMV.

Fig. 26 – Valori concordanti delle analisi statistiche della probabilità degli effetti fissi (FEL) e della probabilità ancestrale (SLAC)



3.9. DIAGNOSI DEL PEPMV ATTRAVERSO UN NUOVO METODO DI RILEVAMENTO BASATO SULL'IBRIDAZIONE DI FLUSSO DI IMPRONTE SU MEMBRANA

3.9.1. SPECIFICITÀ DELL'IBRIDAZIONE DI FLUSSO

Per stimare le specificità di rilevamento della sonda, RNA totale estratto da campioni essiccati e triturati dei vari isolati di PepMV sono stati analizzati mediante ibridazione convenzionale e di flusso mediante la sonda a RNA PepMV-CP1. Poiché l'ibridazione dipende dall'identità

nucleotidica tra la sonda e il target, è stata utilizzata la regione della CP che rappresenta la zona più conservata del genoma. La diversità nucleotidica tra la sonda e il bersaglio dall'isolato PepMV usato in questo lavoro variava 87,7-95,5% che copre il campo di variabilità genetica di questa regione genomica per tutti gli isolati depositati in GenBank.

Tutti gli isolati di PepMV hanno dato forti segnali di ibridazione con entrambe le tecniche di ibridazione mentre non hanno dato nessun segnale con le piante virus free cresciute in glasshouse (figura n. 25). Così, questa procedura consente il rilevamento universale di isolati di PepMV nonostante l'elevata diversità di questo virus in confronto con la minore diversità trovata per la maggior parte dei virus vegetali. Pertanto, questo metodo può ritenersi valido per la maggior parte virus vegetali.

3.9.2. RILEVAZIONE DI MEMBRANE CON IMPRONTE DI DIVERSI OSPITI E DI CAMPIONI DI PEPE

Per verificare se l'elaborazione del campione può essere evitato, sono state preparate delle impronte mediante taglio trasversale dei piccioli fogliari, attenute premendo delicatamente sulla membrana di nylon piante di pomodoro infette da PepMV e piante sane. Successivamente la membrana è stata sviluppata secondo il metodo dell'ibridazione di flusso. Un forte segnale di ibridazione è stato osservato in tutte le piante infette e nessun segnale è stato osservato in impronte di piante sane. L'ibridazione di impronte su membrane è adatta anche per l'analisi simultanea di più campioni. Le stampe dei tessuti possono essere preparati in campo, risparmiando così tempo e lavoro, conservati a temperatura ambiente fino a due anni e spediti altrove per

l'analisi. Questa procedura può essere utilizzata per monitorare la diffusione spaziale e temporale di virus per studi epidemiologici e per l'eradicazione delle piante infette presenti in nuove aree infette per impedire la diffusione.

Questa tecnica rappresenta una nuova procedura basata sull'ibridazione di flusso per impronte su membrane ed è stata sviluppata per un rapido, preciso e sensibile rilevamento del Pepino mosaic virus (PepMV). Può essere facilmente adattata ad altri virus vegetali e probabilmente ad altri patogeni delle piante.

Questa è probabilmente la tecnica diagnostica più veloce e più semplice che consente la diagnosi simultanea di un gran numero di campioni, poiché combina analisi di impronte di tessuto vegetale, risparmiando tempo e lavoro necessario per la preparazione dell'estratto, nonché una procedura di ibridazione ultra rapida di 15-30 minuti.

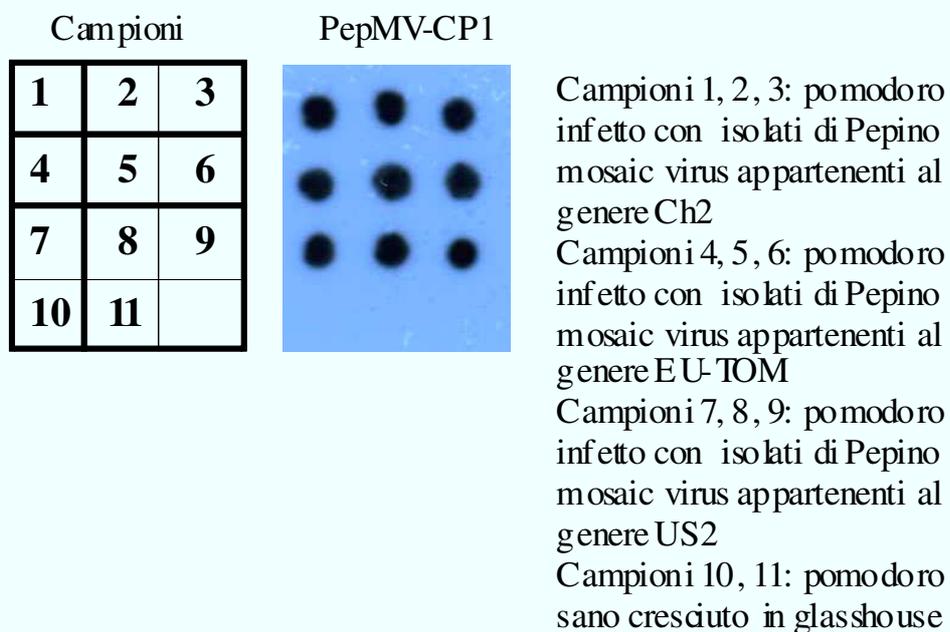


Fig. 25 – A sinistra, membrana quadrettata; a destra pellicola sviluppata con segnale luminoso di ibridazione.

4. CONCLUSIONI

I nostri risultati mostrano chiaramente l'elevata e rapida diffusione del virus del mosaico del pepino in provincia di Ragusa. I danni economici provocati dal PepMV sono risultati ingenti in tutte le provincie sia per l'elevata diffusione del virus sia per i relativi danni che provoca. Infatti, in molte serre da noi esaminate spesso la perdita di produzione arrivava quasi al 100% per la presenza di vistose maculature bianche su tutti frutti. I sintomi osservati su piante affette da PepMV consistono in alterazione della forma della foglia e macchie che sicuramente riducono la produzione delle piante infette. Comunque, il danno più rilevante sono le vistose e numerose maculature che si formano sui frutti delle piante infette che pertanto non risultano commercializzabili. Spesso nelle colture tardive le bacche dei primi sei-sette palchi non risultano commercializzabili e quindi le perdite sono molto elevate, mentre nelle colture precoci si può arrivare a perdere l'intera produzione. Osservazioni effettuate in alcune serre del comune di Scicli hanno evidenziato perdite di produzione sulle varietà Genio e Shiren di circa l'80% e di circa il 30-40% per quanto riguarda Piccadilly e Belize.

Come riportato nella Figura n. 16 i danni sono risultati abbastanza elevati in tutte le aree oggetto delle nostre indagini. Infatti come riportato nei risultati il 61% delle piante saggiate nel Comune di Vittoria sono risultate infette sino ad arrivare ad una percentuale di piante infette del 6% nel Comune di Pozzallo. Questi risultati concordano quanto riportato in letteratura infatti un virus trasportato da vettori diversi si propaga "a macchia d'olio" dal punto dell'infezione primaria. Come è

noto il virus è stato riscontrato inizialmente nel 2006 (Davino *et al.*, 2008) a Vittoria e da lì si è diffuso nei Comuni limitrofi. È da sottolineare che ormai il virus è diffuso su tutte le aree del ragusano e la probabilità che i danni economici da esso causati possano aumentare nel tempo è elevata. Ciò è legato alle seguenti condizioni:

- inverni particolarmente rigidi sono favorevoli alle infezioni;
- norme di prevenzione adottate dagli agricoltori;
- coltivazioni di varietà che non mostrano sintomi sulle bacche;
- coltivazione di nuovi genotipi che potrebbero risultare tolleranti al virus.

La prova per accertare la trasmissione di PepMV attraverso i bombi ha dimostrato chiaramente che questi insetti durante i loro movimenti sulle piante pur favorendo l'impollinazione dei fiori e quindi incrementano la produttività, dall'altro favoriscono la diffusione dei virioni ed in molti casi i danni osservati superavano gli effetti positivi dell'impollinazione. Già altri Autori riportano in letteratura che questi insetti possono disseminare il virus all'interno delle serre (Lacasa *et al.* 2003). Quindi maggiore sarà il numero di bombi presenti in una serra e maggiore saranno i danni provocati da PepMV. Quindi ulteriori indagini dovrebbero essere effettuate per accertare i benefici o gli eventuali danni che questi insetti impollinatori possono provocare alla coltivazione. Perché come dimostrato da parecchi anni i bombi favoriscono l'impollinazione quindi consentono di aumentare la produzione ma con la presenza di PepMV sarebbe necessario accertare un eventuale incremento di produzione dal momento che essi aumentano notevolmente il numero di piante rese improduttive per l'infezione di PepMV.

Le prove per accertare la presenza dei virioni di PepMV nei semi hanno dimostrato, in campioni costituiti da n. 4 semi e saggiati mediante test ELISA, la presenza del virus. È importante sottolineare che in molti casi nel campione costituito da 4 semi solo un seme poteva essere infetto, ciò vale anche per i campioni costituiti da 8, 16 e 32 semi. Quindi la percentuale reale non è del 100% dei semi infetti ma di valori molto bassi che tuttavia potrebbero arrecare gravi danni alle coltivazioni dal momento che il virus si trasmette con le operazioni colturali ed anche attraverso i bombi. Tuttavia con le debite proporzioni anche accertando il numero più basso per ogni partita di semi saggiati possiamo affermare che la quantità di semi infetti è piuttosto elevata. Anche altri Autori riportano dati molto simili (Córdoba-Sellés *et al.*, 2007). Un altro dato importante è che spesso da una elevata percentuale di semi infetti si possono ottenere anche pochissime piante infette. Infatti in molti casi i virioni si possono trovare all'esterno del seme e si possono denaturare quando il seme viene posto a dimora e quindi non riescono ad infettare le plantule. È stato anche dimostrato che in molti casi ove la percentuale di semi risultati infetti con un determinato virus è elevata la percentuale di piante infette risulta modesta in quanto i semi possono produrre durante la fase di germinazione sostanza ad azione antivirale che denaturano i virioni.

Per quanto riguarda la trasmissione di PepMV in piante di pomodoro attraverso il seme, possiamo affermare che nessuna delle piantine ottenute dai semi infetti ha mostrato sintomi afferenti ad infezioni di PepMV, inoltre nessuna delle piante da noi saggiate è risultata infetta. Ciò potrebbe essere collegato al modesto numero di piante saggiate (1600). In letteratura si riporta che la trasmissione per seme è spesso inferiore all'1%. Mentre altri Autori affermano che la

trasmissione è nulla. Ling riporta che nessuna delle 10.000 piantine ottenute da semi prelevati da frutti con evidenti sintomi di PepMV è risultata infetta. Mentre altri AA riportano infezioni modeste variabili dallo 0,005% all'0,057% (Córdoba-Sellés *et al.*, 2007; Hanssen *et al.*, 2010). Prove condotte nell'ambito di un Progetto finanziato dalla Comunità Europea denominato "Pepeira" ove hanno partecipato 17 Paesi Europei inclusa l'Italia e 20 Istituzioni di Ricerca hanno dimostrato che la percentuale di plantule infette ottenute da sementi contaminate è molto bassa 3 piantine su 5.000 in una prova e 2/8.200 nella seconda prova e cioè 0,006 e 0,024% rispettivamente.

In conclusione le prove hanno dimostrato che PepMV ha un basso livello di trasmissione per seme, tuttavia, il virus è estremamente stabile e persistente e considerando l'elevato tasso di trasmissione meccanica durante le diverse operazioni colturali e/o la presenza di bombi basta una singola piantina o poche piantine infette da PepMV per contaminare rapidamente l'intera serra. Queste caratteristiche hanno contribuito all'introduzione e alla rapida diffusione, nelle zone di produzione del pomodoro in serra, del virus del mosaico del pepino. Anche nel ragusano abbiamo riscontrato la stessa diffusione. Da qualche pianta riscontrata infetta da PepMV nel 2008 (Davino *et al.*, 2008) la percentuale di piante infette è aumentato progressivamente in tutte le aree del Comune di Vittoria ed ha raggiunto anche serre che distano circa 100 Km dai focolai iniziali.

Quindi, per il controllo del PepMV è consigliabile utilizzare seme sano, anche se la trasmissibilità per seme è bassa, e rispettare tutte le adeguate misure igieniche di prevenzione per ridurre al minimo la diffusione meccanica.

Al fine di migliorare la tecnica di saggio nella diagnosi di PepMV abbiamo tentato di mettere a punto una tecnica più veloce e capire se questa nuova tecnica potesse avere un'efficacia tale da poter essere utilizzata in diagnosi tradizionale, prove di comparazione sono state effettuate tra la nostra tecnica e kit commerciali DAS-ELISA disponibili oppure RT-PCR singleplex già riportati in letteratura. In tutti i casi la multiplex e la singleplex RT-PCR si sono dimostrate efficaci allo stesso modo per l'individuazione di tali patogeni mentre i saggi DAS-ELISA, ove applicabili si sono dimostrati circa 100 volte meno sensibili delle RT-PCR.

Le due multiplex RT-PCR messe a punto sono state provate su campioni di campo provenienti da tutta la Sicilia.

Da come si evince dalla tabella n. 4 risultati simili si sono ottenuti comparando la tecnica delle due multiplex con le singleplex mentre risultati meno soddisfacenti si sono ottenuti con i saggi sierologici. Dunque, la tecnica multiplex in tempi molto brevi ci consente di saggiare 7 virus contemporaneamente. Ciò è molto importante in quanto infezioni miste sono sempre presenti sia nelle coltivazioni in serre sia in pieno campo.

Analizzando in dettaglio i dati possiamo dire che il virus più prevalente era ToCV che è stato individuato in 32 piante, seguito da TSWV in 25 piante, CMV in 20 piante, PepMV in 17 piante, ToMV in 12 piante, ToMV in 12 piante, TICV in 6 piante e ToTV in 2 piante. Tre piante risultarono esenti da infezioni virali. Singole infezioni virali erano presenti in 8 piante, mentre 10 piante erano infette da due virus, 13 piante da tre virus, 8 piante da quattro virus e 3 piante da cinque virus, tabella n. 4. Anche i nostri dati mostrano chiaramente che le infezioni miste con diversi virus sono frequenti. Le interazioni fra virus

coinfettanti la stessa pianta possono avere un importante impatto nelle epidemie e potevano incrementare il danno nelle coltivazioni. Se sorgono fenomeni di sinergismo (Syller, 2012) saggiando un addizionale numero di piante si dovrebbe confermare questi risultati per la distribuzione di certi virus che possono essere diversi nelle aree in cui la solanacea viene coltivata. Le procedure sviluppate in queste prove basate su due saggi di multiplex PCR permettono la rapida identificazione dei più importanti virus che infettano il pomodoro e soprattutto per le analisi di infezioni miste, in modo da risparmiare tempo, reagenti e costi. Questa metodologia potrebbe essere inclusa nei protocolli fitosanitari per la individuazione precoce di questi virus nei vivai o nei programmi di certificazione sanitaria.

La capacità della tecnica RT-qPCR per individuare i diversi genotipi di PepMV presenti in un dato campione di pomodoro è stata valutata usando i genotipi UE-pomodoro e Ch2 come controlli positivi.

Piante di pomodoro sane sono state utilizzate come controllo negativo. Tutti i saggi RT-qPCR individuano efficacemente il corrispondente specifico ceppo permettendo la valutazione genotipica degli isolati virali collezionati. Ambedue i genotipi Ch2 e EU-TOM erano molto efficienti nel discriminare gli isolati del virus, fornendo un valore di Ct medio di circa 18 Ct senza nessuna interferenza crociata tra i due ceppi. Solo il genotipo Ch2 è stato individuato tra gli isolati virali analizzati che includono il ceppo individuato nel 2001 in Sardegna (Roggero *et al.*, 2001); dunque, il ceppo Sardegna rappresenta la prima segnalazione in Europa di Ch2, poiché, in quel tempo solo il ceppo EU-TOM era conosciuto, mentre il ceppo denominato Ch2 era stato riscontrato in Spagna solo nel 2004 (Pagán *et al.*, 2006).

La sequenza genomica completa di ciascuno dei quattro isolati italiane usati durante le nostre prove è stata determinata da successive RT-PCR e derivata libreria di cloni di cDNA utilizzando la strategia del genome walking. La comparazione delle sequenze nucleotidiche dei cloni di ciascun amplicone assicura accuratezza nel sequenziare un isolato puro ed ottenere una sequenza maggioritaria. Le sequenze assemblate dai seguenti isolati sono state depositate in GenBank come PepMV-Sar09 (accessione No. HQ663890), PepMV-Sic1.09 (HQ663891), PepMV-Sic2 (HQ663892), PepMV-Sar01 (HQ663893). La lunghezza del genoma dei quattro isolati variava da 6.412 a 6.459 nt. L'RNA assemblato era organizzato come precedentemente riportato per genoma di PepMV (Aguilar *et al.*, 2002; Cotillon *et al.*, 2002).

Gli isolati italiani di PepMV erano filogeneticamente correlati al ceppo Ch2 (figura n. 24) variando dal 97,2% al 98,5% di identità e similarità al livello aminoacidico rispettivamente con le sequenze di riferimento pubblicate (DQ 000985) (Ling, 2007).

Quando, invece, comparati con le sequenze di riferimento dei ceppi US1 (AY 509926) (Maroon-Longo *et al.*, 2005) e EU-TOM (940223) (Van der Vlugt *et al.*, 2002) gli isolati italiani mostravano una identità del 77,5% e 78% rispettivamente, al livello aa. Inoltre, è stata calcolata la percentuale di similarità a livello aa di ciascuno degli ORFs (RdRp, TGB1, TGB2, TGB3 e CP) degli isolati italiani rispetto all'isolato PepMV-Ch2 (DQ000985). È interessante notare che gli isolati siciliani hanno le maggiori differenze nelle regioni RdRp e TGB1 mentre gli isolati della Sardegna mostrano le maggiori differenze nella regione TGB2 (tabella n 8). Comparando le sequenze nucleotidiche complete di PepMV italiano con quelle di PepMV-Ch2 mediante il programma Vector NTI 9.0.0, regioni significativamente variabili erano identificate solo negli isolati

siciliani di PepMV. Specificatamente, PepMV-Sic 1.09 mostra divergenze localizzate nella regione della replicasi nella porzione putativa dal nt 744 a 785 e da 4279 a 4312, che risultava in una modificazione di aa compresa entro i residui da 220 a 234 e da 1399 a 1409 della corrispondente proteina putativa RdRp. Queste regioni variabili erano al di fuori dei domini putativi tipo metiltrasferasi (aa59 a 224) specifico per “Sundbis-like” virus supergruppo (Razanov *et al.*, 1992); (ii) il dominio putativo NTPase /elicasi (aa708-934) con il motivo NTP GCGGSGRS e VVIFDD (Kadarè e Haenni, 1997; Kamer e Agos, 1994) e (iii) il dominio RdRp caratterizzato dal motivo SGEGPTFDANT' (22aa) ed il motivo GDD (Kamer e Argos, 1994). PepMV-Sic2.09 mostra solo una regione variabile nel gene putativo replicasi dal nucleotide 712 a 778 che risultò in un aa modificazione entro residui 209 e 231.

Le sequenze aminoacidiche modificate erano analizzate al fine di predire la corrispondente struttura proteica secondaria.

Due delle identificate regioni variabili coinvolgevano una differente forma geometrica quando confrontata con quella rilevata da tutte le sequenze aa analizzate di PepMV Ch2. In particolare, un avvolgimento di conformazione alpha-helix/random (PepMV Sic 1.09) invece di due struttura a beta-sheet (PepMV Ch2 isolato di riferimento) entro i residui 220-334 del polipeptide RdRp era il maggior mutamento nel polipeptide stesso. Come precedentemente riportato (Gutierrez-Aguirre *et al.*, 2009; Hasiow-Jaroszawska *et al.*, 2008b) distinzioni genotipiche degli isolati di PepMV possono essere favorevolmente effettuati mediante RT-qPCR ma questo metodo diagnostico non può fornire una estesa informazione sulla variabilità genetica.

Nei nostri studi, diverse strategie sono state usate per indagare le proprietà molecolari della sequenza completa degli isolati italiani di

PepMV. In prima istanza sono state effettuate le analisi di sequenza mediante allineamento, identità e similarità dei singoli nucleotidi. Il software vector NTI 9.0.0 ha fornito una rapida grafica identificazione delle regioni più variabili a livello nucleotidico. In seguito esaminando tratti della struttura secondaria della proteina nelle regioni variabili a livello aa si accertavano alcune differenti forme genomiche nei nostri isolati rispetto alla sequenza di riferimento PepMV-Ch2. Il significato di questi cambi nella forma della struttura secondaria osservata nei nostri isolati è attualmente sconosciuta. Come è noto studi sul ruolo della conformazione della catena polipeptidica in Virologia vegetale sono pochi (Lin *et al.*, 2009; Nemykh *et al.*, 2008; Rantalainen *et al.*, 2010; Rossman *et al.*, 1983; Shaumugan *et al.*, 2005). Comunque, ogni variazione della struttura secondaria avrà sicuramente un impatto significativo sia sulla patogenicità che sulla genomica funzionale del virus stesso.

Le indagini per accertare la dispersione del virus fanno notare che dal 2011 2013, la malattia ha avuto un progressivo aumento, infatti la percentuale di piante infette era circa il 13% nel 2011, mentre è aumentata al 37% nel 2012 e nel 2013 venne fino a circa il 63%.

Lo studio dell'Host range ha mostrato differenze più visibili soprattutto su *Datura spp.* e su *N. benthamiana*. Queste due specie hanno mostrato sintomi sin dalla prima settimana dopo l'inoculazione, mentre *L. esculentum* che è l'ospite principale dove PepMV è stato raccolto ha mostrato sintomi solo dalla terza settimana dopo l'inoculazione. È importante notare che *Ocimum basilicum* e *Petunia hybrida* hanno mostrato sintomi alla terza e alla quarta settimana dopo l'inoculazione.

PepMV è stato individuato su *Ocimum basilicum* nel 2008 (Davino *et al.*, 2009), mentre su *Petunia hybrida* è la prima volta che vien segnalato

come ospite. Tutti i risultati sono stati confermati da una successiva prova di DAS-ELISA.

Nessuna correlazione è stata trovata tra parentela genetica e la posizione geografica o l'anno di raccolta.

Questa analisi ha mostrato un sito selezionato positivamente situato in posizione aa 13 (figura n. 26) che potrebbe essere il risultato di un adattamento di PepMV.

Questa procedura mediante la ibridazione di flusso consente il rilevamento universale di isolati di PepMV nonostante l'elevata diversità di questo virus in confronto con la minore diversità trovata per la maggior parte dei virus vegetali. Pertanto, questo metodo può ritenersi valido per la maggior parte virus vegetali.

Le impronte dei tessuti possono essere preparati in campo, risparmiando così tempo e lavoro, conservati a temperatura ambiente fino a due anni e spediti altrove per l'analisi. Questa procedura può essere utilizzata per monitorare la diffusione spaziale e temporale di virus per studi epidemiologici e per l'eradicazione delle piante infette presenti in nuove aree infette per impedire la diffusione.

Questa tecnica rappresenta una nuova procedura basata sull'ibridazione di flusso per impronte su membrane ed è stata sviluppata per un rapido, preciso e sensibile rilevamento del Pepino mosaic virus (PepMV). Può essere facilmente adattata ad altri virus vegetali e probabilmente ad altri patogeni delle piante.

Questa è probabilmente la tecnica diagnostica più veloce e più semplice che consente la diagnosi simultanea di un gran numero di campioni, poiché combina analisi di impronte di tessuto vegetale, risparmiando tempo e lavoro necessario per la preparazione dell'estratto, nonché una procedura di ibridazione ultra rapida di 15-30 minuti.

LETTERATURA CITATA

- ADAMS M. J., ANTONIW J.F., BAR-JOSEPH M., BRUNT A. A., CANDRESSE T., FOSTER G.D., MARTELLI G. P., MILNE R. G. e FAUQUET C. M. (2004). *The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation*. Arch. Virol. 149, 1045-1060.
- ADAMS I.P., GLOVER R.H., MONGER W.A., MUMFORD R., JACKEVICIENE E., NAVALINSKIENE M., SAMUTTIENE M., BOONHAM N. (2009). *Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology*. Mol. Plant Pathology 10(4), 537-545.
- ADKINS S (2000). *Tomato spotted with virus-positive steps towards negative success*. Molecular Plant Pathology 1, 151-157.
- AGUILAR J.M., HERNANDEZ-GALLARDO M.D., CENIS J.L., LACASA A., ARANDA M.A. (2002). *Complete sequence of the Pepino mosaic virus RNA genome*. Archives of Virology 147: 2009-2015.
- ALFARO-FERNANDEZ A., SANCHEZ-NAVARRO J. A., CEBRIAN M., CORDOBA-SÉLLES M.C., PALLAS V., E JORDÀ C. (2009). *Simultaneous detection and identification of Pepino mosaic virus (PepMV) isolates by multiplex one-step RT-PCR*. Eur. J. Plant Pathology 125, 143-158.
- AMARI. K. GONZALES-IBEAS. D. GOMEZ P. SEMPERE. R.N., SANCHEZ-PINA. M.A. ARANDA M.A. DIAZ-PENDON. J.A. NAVAS-CASTILLE. J. MORIONES. E. BLANCA J. HERNANDEZ-GALLARDO, M.D. ANASTASIO. G. (2008). *Tomato torrado virus is transmitted by Bemista tabaci and infects pepper and eggplant in addition to tomato*. Plant Disease 92, 1139.

- BEATA HASIÒW-JAROSZEWSKA, NATASZA BORODYNKO (2011). *Characterization of the necrosis determinant of the European genotype of pepino mosaic virus by site-specific mutagenesis of an infectious cDNA clone.* ARCH VIROL 337-341.
- BEATA HASIÒW-JAROSZEWSKA, NATASZA BORODYNKO (2013). *Detection of Pepino mosaic virus isolates from tomato by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification.* Arch Virol 2153-2156.
- BEIBEI GE, QIAN LI, GUOJIE LIU, MEIGUANG LU, SHIFANG LI, HONGQING WANG (2013). *Simultaneous detection and identification of four viruses infecting pepino by multiplex RT-PCR.* Arch Virol 1181-1187.
- BROADBENT L. (1976). *Epidemiology and control of Tomato mosaicvirus.* Annual Review of Phytopathology 14, 75-96.
- CANDRESSE T., MARAIS A., FAURE C., DUBRANA M.P., GOMBERT J. E BENDAHMANE A. (2010). *Multiple coat protein abolish recognition of pepino mosaic virus (PepMV) by the potato Rx resistance gene in transgenic tomatoes.* Molecular Plant-Microbe Interaction Vol. 23, No. 4, pp 376-383.
- CARMICHAEL D.J., REY M.E.C., NAIDOO S., COOK G. E VAN HEERDEN S.W. (2011). *First report of Pepino mosaic virus infecting tomato in South Africa.* Plant Disease 95(6), 767-767.
- CASTEEL D. T., WELLINK J., GOLDBACH R. W. E VAN LENT J. W. (1997). *Isolation and characterization of tubular structures of cowpea mosaic virus.* J. Gen. Virol. 78: 3167-3170.
- CHEWACHONG G. M., J. J. BLAKESLEE , M. A. ELLIS S. A. MILLER, F. QU (2013). *Efficient "vaccination" of Nicotiana benthamiana and tomato plants using a lab-attenuated strain of Pepino mosaic virus.* The American Phytopathological Society.

- CONTI M. (1997). *Processi di trasmissione di virus e agenti fitopatogeni virus-simili in insetti omotteri*. Atti dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia. Rendiconti, Anno XVI-1997.
- CÒRDOBA-SELLÈS M. C., GARCÌA-RANDEZ A., ALFARO-FERNANDEZ A. E JORDÀ-GUTIÉRREZ C. (2007). *Seed transmission of Pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments*. Plant Disease 91, 1250-1254.
- COTILLON A. C., GIRARD M. E DUCOURET, S. (2002). *Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a French isolate of Pepino mosaic virus (PepMV)*. Arch. Virol. 147, 2231-2238.
- DAVINO S., NAPOLI C., DAVINO M., ACCOTTO G. P. (2006). *Spread of Tomato yellow leaf curl virus in Sicily: partial displacement of another geminivirus originally present*. European Journal of Plant Pathology 114: 293-299.
- DAVINO S., DAVINO M., BELLARDI M.G., AGOSTEO G.E. (2008). *Pepino mosaic virus and Tomato chlorosis virus causing mixed infection in protected tomato crops in Sicily*. Phytopathologia Mediterranea 47: 35-41.
- DAVINO S., ACCOTTO G.P., MASENGA V., TORTA L., E DAVINO M. (2009). *Basil (Ocimum basilicum) a new host of Pepino mosaic virus*. Plant Pathology 58, 407.
- DAVINO S., COLOMBO A., DONZELLA D., CATALDI S. E DAVINO M.(2009). *Le virosi nell'orticoltura professionale, guida alla prevenzione e alla difesa*. ISI sementi Orto wic 66pp.
- DAVINO S., IACONO G. E DAVINO M. (2010). *Spread of Pepino mosaic virus to different genotype crops by bumble bees*. In: Atti XVI Cong. Nazionale SIPaV,35, Firenze 14-17 Sett.2010.
- DUFFUS. E. LIU. H.Y. WISTER G.C. (1996). *Tomato infectious chlorosis virus a new dostero-like virus transmitted by Trialeurodes vaporarierum*. European

- Journal of Plant Pathology 102, 219-226.
- EDWARDS ML, COOPER JI (1995) *Plant virus detection using a new form of indirect ELISA*. J Virol Methods 11: 309-319.
- EFRON B., HALLORAN E., HOLMES S (1996). *Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees*. Proc Natl Acad Sci USA 93: 7085-7090.
- EFTHIMIOU K.E., GATSIOS A.P., ARETAKIS K.C., PAPAYIANNIS L.C. E KATIS N.I., (2011). *First report of Pepino mosaic virus infecting greenhouse cherry tomatoes in Greece*. Plant Disease 95(1), p 78.
- FAKHRO A., VON BARGEN S., BANDTE M., BÜTTNER C. (2010). *Pepino Mosaic virus, a first report of a virus infecting tomato in Syria*. Phytopathologia Mediterranea 49: 99-101.
- FAKHRO A., VON BARGEN S., BANDTE M., BÜTTNER C., FRANKEN P. E SCHWARZ D. (2011). *Susceptibility of different plant species and tomato cultivarsto two isolates of Pepino mosaic virus*. Eur j Plant Pathol 129, 579-590.
- FRENCH C.J., BOUTHILLIER M., BERNARDY M., FERGUSON G., SAUBORIN M., JOHNSON R.C., MASTERS C., GODKIN S., MUMFORD R. (2001). *First report of Pepino mosaic virus in Canada and the United States*. Plant Diseases 85: 1121.
- GOMEZ P., SEMPERE R.N., ELENA S.F., ARANDA M.A. (2009). *Mixed infections of Pepino mosaic virus strains modulate the evolutionary dynamics of this emergent virus*. Journal of Virology 83, 12378-12387.
- GUTIERREZ-AGUIRRE I., MEHLE N., DELIC D., GRUNDEN K., MUMFORD R., RAVNIKAR M. (2009). *Real-time quantitative PCR based sensitive detection and genotype discrimination of Pepino mosaic virus*. Journal of Virological Methods 162: 46.55.
- HANSEN I.M., THOMMA B.P.H.J. (2010). *Pepino of mosaic virus: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops*.

Molecular Plant Pathology 11: 179-189.

HANSEN. I.M., LAPIDET. M., THOMMA. B.P. (2010). *Emerging viral diseases of tomato crops*. Molecular Plant-Microbe Interactions 23, 539-548.

HASIOW-JAROSZEWSKA B., BORODYNKO N., POSPIEZNY H. (2008a). *Complete genomic RNA sequence of the Polish Pepino mosaic virus isolate belonging to the US2 strain*. Virus Genes 36: 1-8.

HASIOW-JAROSZEWSKA B., BORODYNKO N., POSPIEZNY H. (2008b). *Development of a Real time RT-PCR assay for the Sequence analysis of Italian PepMV isolates*. Journal of Plant Protection Research 48: 285-301.

HASIOW-JAROSZEWSKA B., JACKOWIAK P., BORODYNKO N., FIGLEROWICZ M. E POSPIEZNY H.(2010). *Quasispecies nature of Pepino mosaic virus and its evolutionary dynamics*. Virus Genes 41, 260–267.

HASSEN I.G., MUMFORD R., BLYSTAD D.-R., CORTEZ I., JAROSZEWSKA B. H., PETERS J., POSPIEZNY H., RAVNIKAR M., STIJGER I., TOMASSOLI L., VARVERI C., VAN DER VLUGT R. E NIELSEN L. (2010). *Seed transmission of Pepino mosaic virus in tomato*. Eur. J. Plant Pathol. 126, 145-152.

[HTTP://WWW.EPPO.ORG](http://www.eppo.org).

HUDSON RR (2000). A NEW STATISTIC FOR DETECTING GENETIC DIFFERENTIATION. Genetics 155: 2011-2014.

HUDSON RR, BOOS DD, KAPLAN NL (1992). *A statistical test for detecting geographic subdivision*. Mol Biol Evol 9: 138-151.

HULL R. (2002). Matthews R. E. F. *Plant Virology. Fourth Edition*. Academic Press, San Diego, California.

JACOBI. V., BACHAND. G.D. HAMELIN. R.C. CASTELLO. J.D. 1998. *Development of a multiplex immunocapture RT_PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses*. Journal of Virological Methodc 74, 167-178.

- JONES R.A.C., KOENIG R., LASEMANN D.E. (1980). *Pepino Mosaic virus, a new potexvirus from pepino (Solarium muricatum)*. Annals of Applied Biology 94: 61-68.
- JORDÁ C., LÁZARO PÉREZ A., MARTÍNEZ CULEBRAS P.V., E LACASA A. (2011). *First report of Pepino mosaic virus on natural hosts*. Plant Disease 85, 1292.
- KADARÈ G., HAENNI A.L., (1997). *Virus-encoded RNA helicases*. Journal of Virology 71: 2583-2590.
- KASTEEL D. T., WELLINK J., GOLDBACH R. W. E VAN LENT J. W. (1997). *Isolation and characterization of tubular structures of cowpea mosaic virus*. J. Gen. Virol. 78: 3167-3170.
- KNIPPERS R., ALPERT C.A., 1999. RECOMBINANT DNA TECHNOLOGY. IN: LENGELER J.W., DREWS G., SCHLEGEL H.G. (eds). *Biology of the Prokaryotes*, pp. 416-436. Blackwell Science, Oxford UK.
- LACASA A., GUERRERO M. M., HITA I., MARTÍNEZ M. A., JORDÀ C., BIELZA P., CONTRERAS J., ALCAZAR A. E CANO A. (2003). *Implication of bumble bee (Bombus spp.) on Pepino mosaic virus (PepMV) spread on tomato crops*. PLAGAS 29, 393-403.
- LAMBROS C. PAPAYIANNIS, CHARALAMBOS D. KOKKINOS, ANA ALFARO-FERNÁNDEZ (2011). *Detection, characterization and host range studies of Pepino mosaic virus in Cyprus*. Eur J Plant Pathol 1-7.
- LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE JM, WILM A, LOPEZ R (2007). *Clustal W and Clustal X version 2,0*. Bioinformatics 23: 2947-2948.
- LIBRADO P, ROZAS J (2009). *DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data*. Bioinformatics 25: 1451-1452.
- LIN HX; RUBIO L. SMYTHE AB, FALK BW (2004). *Molecular population*

- genetics of Cucumber mosaic virus in California: Evidence for founder effects and reassortment.* J Virol 78: 6666-6675.
- LING K.-S. E SCOTT, J. W. (2007). *Sources of resistance to Pepino mosaic virus in tomato accessions.* Plant Disease 91, 749-753.
- LING K.S. (2007). *Molecular characterization of two Pepino mosaic virus variants from imported tomato seed reveals high levels of sequence identity between Chilean and US isolates.* Virus Genes 34. 1-8.
- LING K.-S., WINTERMANTEL W.M. E BLEDSOE M. (2008). *Genetic composition of Pepino mosaic virus population in North american greenhouse tomatoes.* Plant Disease 92, 1683-1688.
- LING K.-S. (2008). *Pepino mosaic virus on tomato seed: virus location and mechanical transmission.* Plant Disease 92, 1701-1705.
- LING K.S. E ZHANG W. (2011). *First report of Pepino mosaic virus infecting tomato in Mexico.* Plant Disease 95(8), 1035-1036.
- LING K.S., LI R. E BLEDSOE M. (2013). *Pepino mosaic virus genotype shift in North America and development of a loop-mediated isothermal amplification for rapid genotype identification.* Virol J. 2013; 10: 117.
- LURIA S. E., DARNELL J. E., BALTIMORE D. E CAMPBELL A. (1978). *General Virology, 3rd Edn.* John Wiley & Sons, New York, p. 2.
- MAROON-LANGO, C. J., GUARAGNA, M. A., JORDAN, R. L., HAMMOND, J., BANDLA, M., E MARQUARDT, S. K. (2005). *Two unique US isolates of Pepino mosaic virus from a limited source of pooled tomato tissue are distinct from a third (European-like) US isolate.* Arch. Virology. 150, 1187-1201.
- MARTELLI. G.P. AGRANOVSKY. A.A., BAR-JOSEPH ., M., BOSCIA. D. CANDRESSE., T. COUTTS, R.H. DOLJA. V.V. FALK B.W. GONSALVES. G.C. YOSHIKAWA, N. (2002). *The family Closteroviridae revised.* Archives of Virology 147. 2039-2044.

- MARTIJN F. SCHENK, ROEL HAMELINK, RENÈ A., A. VAN DER VLUGT, ADRIAN M. W. VERMUNT, RUUD C. KAARSENMAKER, INEKE C. C. M. M. STIJGER (2010). *The use of attenuated isolates of Pepino mosaic virus for cross-protection*. Eur J Plant Pathol 249-261.
- MATTA A. (1996). *Fondamenti di Patologia vegetale*. Patron Editore, Bologna, p. 17.
- MATTHEWS R. E. F. (1991). *Plant virology. Third Edition*. Academic Press, San Diego, California.
- MILANOVIC J., KAJIC V. E NOVAK A. (2011). *First record of Pepino mosaic virus (PepMV) in Croatia*. Glasilo Biljne Zaštite Vol. 11 No. 5 pp. 353-356.
- MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI. Pront. N°32128 del 18 settembre 2002.
- MUMFORD . R.A., METCALFE. E.J. (2001). *The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate a Pepino mosaic virus and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru*. Archives of Virology 146: 2455-2460.
- MUMFORD. R.A., BARKER. I., WOOD, K.R., (1994). *The detection of Tomato spotted withvirus using the polymerase chain reaction*. Journal of Virological Methods 46: 303-311.
- NEI M., KUMAR S (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*, Oxford University press, New York.
- NEMYKH M.A., EFIMOV A.V., NOVIKOV V.K., ORLOV V.N., ARUTYUNYAN A.M. DRACHEV V.A., LUKASHINA E.V., BARATOVA L.A., Dobrov E.N. (2008). *One more probable structural transition in Potato virus X virions and a revised model of the virus coat protein structure*. Virology 373: 61-71.
- PÀGAN I., CÒRDOBA-SÉLLES M.C., MARTÍNEZ-PRIEGO, FRAILE A.,

- MALPICA J.M., JORDÀ C. E GARCÍA-ARENAL F. (2006). *Genetic structure of the population of Pepino mosaic virus infecting tomato crops in Spain*. *Phytopathology* 96, 274-279.
- PALUKATIS P., GARCÍA-ARENAL F (2003). *Cucumoviruses*. *Adv Virus res* 62: 241-323.
- PALUKATIS P., ROOSSINCK P. DIETZGEN RG, FRANKIE RIB (1992). *Cucumber mosaic virus*. *Adv Res* 41: 281-384.
- PAMILO P., BIANCHI NO (1993). *Evolution of the Zfx and zfy genes: rates and interdependence between the genes*. *Mol Biol Evol* 10: 271-281.
- PANNO S., DAVINO S., RUBIO L., RANGEL E., DAVINO M., GARCÍA-HERNÁNDEZ J. E OLMOS A. (2012). *Simultaneous detection of the seven main tomato-infecting RNA viruses by two multiplex reverse transcription polymerase chain reaction*. *Journal of Virological Methods* 186, 152-156.
- PAPAYIANNIS L.C., KOKKINOS C.D. E ALFARO-FERNÁNDEZ A. (2012). *Detection, characterization and host range studies of Pepino mosaic virus in Cyprus*. *European Journal of Plant Pathology* 132(1), 1-7.
- POSPIESZNY H., BORODYNKO. N., OBREPALSKA-STEPLOWSKA, A., HASIOW. B. (2007). *The first report of Tomato torrado virus in Poland*. *Plant Disease* 91, 1364.
- PRZEMYSŁAW W., OBREPALSKA-STEPLOWSKA (2013). *Multiplex Rt-Pcr reaction for simultaneous detection of tomato torrado virus and Pepino mosaic virus co-infecting solanum lycopersicum*. *Journal of Plant Protection Research* 289-294.
- RANTALAINEN K.I., ESKELIN K., TOMPA P., MAKINENE K., 2010. *Structural flexibility allows the functional diversity of Potyvirus genome-linked protein VPg*. *Journal of Virology* 85: 2449-2457.
- ROGGERO P., MASENGA V., LENZI R., COGHE F., ENA S., WINTER S. (2001). *First report of Pepino mosaic virus in tomato Italy*. *Plant Pathology*

50: 798.

- ROSSMANN M.G., ABAD_ZAPATERO C., MURTHY M.R., LILJAS L., JONES T.A., STRNDBERG B. (1983). *Structural comparisons of some small spherical plant viruses*. Journal of Molecular Biology 165: 711-736.
- SALOMONE A. E ROGGERO P. (2002). *Host range, seed transmission and detection by elisa and lateral flow o fan italian isolate of pepino mosaic virus*. Journal of Plant Pathology 84 (1), 65-68.
- SAMBADE A., RUBIO L., GARNSEY SM., COSTA N., MULLER GW, PEYROU M, GUERRI J., MORENO P. (2002). *Comparison of the RNA population of pathogenically distinct isolates of Citrus tristeza virus. Application to monitoring cross protection*. J Plant Pathol 51: 257-265.
- SCHENK M. F., HAMELINK R., VAN DER VLUGT R.A.A., VERMUNT A.M.W., KAARSENMAKER R.C. E STIJGER I.C.C.M.M. (2010) *The use of attenuated isolates of Pepino mosaic virus for cross-protection*. J. Plant Pathology 127, 249-261.
- SHANMUNGAM G., POLAVARAPU P.L., KENDALL A., STUBBS G., 2005. *Structures of plant viruses from vibrational circular dichroism*. Journal of General Virology 86: 2371-2377.
- SOLER S.**, PROHENS J., DIÈZ M.J., NUEZ F. (2002). *Natural occurrence of Pepino mosaic virus in Lycopersicon species in Central and Southern Peru*. Journal of Phytopathology 150: 49-53.
- SPENCE N. J., BASHAM J., MUMFORD R.A., HAYMAN G., EDMONDSON R. E JONES D.R. (2006). *Effect Of Pepino mosaic virus on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK*. Plant Pathology 55, 595-606.
- SYLLER. J. (2012). *Facilitative and antagonistic interaction between plant viruses in mixed infections*. Molecular Plant Pathology 13, 204-216.
- TAMURA K. (1992). *Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G C-content biases*. Mol Biol

Svolv 9: 678.

TAMURA K, PETERSON D. PETERSON N., STECHER G., NEI M., KUMAR S (2011). *MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods*. Mol Biol Evol 28: 2731-2738.

TIBERINI A., DAVINO S., DAVINO M. E TOMASSOLI L. (2011). *Complete sequence, genotyping and comparative analysis of Pepino mosaic virus isolates from Italy*. Journal of Plant Pathology 93 (2), 437-442.

TIBERINI A., DAVINO S., VICCHI V., TOMASSOLI L. (2010). *Current status of Pepino mosaic virus in Italy*. Petria 20 (2), 162-163.

VAIRA, A.M., ACCOTTO G.P. VECCHIATI, M. BRAGALONI, M. 2002. *Tomato infectious chlorosis virus causes leaf yellowing and reddening of tomato in Italy*. Phytoparasitica 30, 290-294.

VAN DER VLUGT R.R.A., CUPERUS C., VINK J., STIJGER I.C.M.M., LESEMANN D.E., VERHOEVEN J.TH.J., ROENHORST J.W., (2002). *Identification and characterization of Pepino mosaic potexvirus in tomato*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 32: 503-508.

VAN DER VLUGT R.R.A., STIJGER C.C.M., VERHOEVEN J.T.J., LESEMANN D.E. (2000). *First report of Pepino of mosaic virus on tomato*. Plant Disease 84. 103.

VERHOEVEN J.TH.J., VAN DER VLUGT R.A.A E ROENHORST J.W. (2003). *High similarity between tomato isolates of Pepino mosaic virus suggests a common origin*. European Journal of Plant Pathology 109, 419-425.

VERBEEK M., DULLEMANS., A.M., VAN DER HEUVEL. J.F.J. MARIS P.C. VAN DER VLUGT, R.A.A. (2007). *Identification and characterization of Toamto torrado virus, a new plant picorna-like virus from tomato*. Archives of Virology 152, 881-990.

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of

population structure. *Evolution* 38: 1358-1370

WISLER. G.C. DUFFUS. J.E. LIU, H.Y. LI R.H. (1998). *Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses*. *Plant Disease* 82. 270-279.