



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in “Scienze Agrarie, Alimentari, Forestali e Ambientali

Curriculum: Agroecosistemi Mediterranei

Dipartimento Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali (SAAF)

Patologia vegetale (AGR/12)

VIRUS EMERGENTI NELLE COLTURE ORTIVE IN SICILIA

IL DOTTORE

ANDREA GIOVANNI CARUSO

IL COORDINATORE

PROF. VINCENZO BAGARELLO

IL TUTOR

PROF. SALVATORE DAVINO

CO TUTOR

DOTT.SSA PATRIZIA BELLA

CICLO XXXII

ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2020

INDICE

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE	PAG.	3
1.1	IMPORTANZA ECONOMICA DELLE COLTURE ORTIVE	“ 4
1.2	POMODORO (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> L.)	“ 6
1.3	PEPERONE (<i>CAPSICUM ANNUM</i>)	“ 10
1.4	ZUCCHINO (<i>CUCURBITA PEPO</i> L.)	“ 13
1.5	PRINCIPALI MALATTIE DELLE ORTIVE	“ 17
1.6	I FITOVIRUS	“ 19
1.6.1	MORFOLOGIA	“ 21
1.6.2	PROTEINE VIRALI	“ 25
1.6.3	MODELLI DI REPLICAZIONE VIRALE	“ 27
1.6.4	SINTOMATOLOGIA	“ 32
1.6.5	TRASMISSIONE	“ 34
1.7	CONTROLLO DELLE MALATTIE VIRALI	“ 36
CAPITOLO 2. SCOPO DEL LAVORO	PAG.	38
CAPITOLO 3. CASO STUDIO <i>TOMATO LEAF CURL NEW DELHI VIRUS</i> (ToLCNDV)	PAG.	42
3.1	INTRODUZIONE	“ 43
3.2	MATERIALI E METODI	“ 47
3.2.1	RACCOLTA MATERIALE VEGETALE	“ 47
3.2.2	TRASMISSIONE MECCANICA E CARATTERIZZAZIONE PRELIMINARE DELLA GAMMA DEGLI OSPITI	“ 47
3.2.3	STUDIO DELL'INCIDENZA DI ToLCNDV MEDIANTE REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI E SUCCESSIVO SEQUENZIAMENTO	“ 47
3.2.4	ANALISI DELLE SEQUENZE	“ 49
3.2.5	MESSA A PUNTO DI UNA TECNICA LAMP (LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION) PER IL RILEVAMENTO RAPIDO DI ToLCNDV	“ 52
3.2.6	CLONAGGIO E SEQUENZIAMENTO	“ 53
3.2.7	DISEGNO PRIMER LAMP E PROTOCOLLO DI AMPLIFICAZIONE	“ 55
3.3	RISULTATI	“ 57
3.3.1	TRASMISSIONE MECCANICA E CARATTERIZZAZIONE PRELIMINARE DELLA GAMMA DEGLI OSPITI	“ 57
3.3.2	STUDIO DELL'INCIDENZA DI ToLCNDV MEDIANTE REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI E SUCCESSIVO SEQUENZIAMENTO	“ 57
3.3.3	ANALISI DELLE SEQUENZE	“ 60
3.3.4	MESSA A PUNTO DI UNA TECNICA LAMP (LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION) PER IL RILEVAMENTO RAPIDO DI ToLCNDV	“ 65
3.4	CONCLUSIONI	“ 74

CAPITOLO 4. CASO STUDIO <i>TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS</i> (ToBRFV)	PAG.	77
4.1	INTRODUZIONE	“ 78
4.2	MATERIALI E METODI	“ 81
4.2.1	PRIMO CASO DI <i>TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS</i> SU POMODORO IN ITALIA	“ 81
4.2.2	RACCOLTA MATERIALE VEGETALE	“ 85
4.2.3	ANALISI DI ToBRFV MEDIANTE RT-PCR END POINT	“ 86
4.2.4	TRASMISSIONE MECCANICA	“ 86
4.2.5	SEQUENZIAMENTO COMPLETO DEL GENOMA	“ 87
4.2.6	DISEGNO DEI PRIMER, SONDA TAQMAN MGB E SCELTA DELLA MIGLIOR COPPIA DI PRIMER	“ 91
4.2.7	MESSA A PUNTO DELLA REAL TIME RT-PCR CON SONDA TAQMAN MGB PER IL RILEVAMENTO DI ToBRFV	“ 92
4.2.8	CURVA STANDARD	“ 93
4.2.9	DIFFERENTI METODI DI PREPARAZIONE DEL CAMPIONE E COMPARAZIONE DI DIFFERENTI TECNICHE PER IL RILEVAMENTO DI ToBRFV	“ 95
4.2.10	DISPERSIONE NELL'AREALE SICILIANO DI ToBRFV	“ 98
4.3	RISULTATI	“ 102
4.3.1	PRIMO CASO DI <i>TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS</i> SU POMODORO IN ITALIA	“ 102
4.3.2	ANALISI PRELIMINARE PER ToBRFV MEDIANTE RT-PCR END POINT	“ 103
4.3.3	TRASMISSIONE MECCANICA	“ 104
4.3.4	SEQUENZIAMENTO COMPLETO DEL GENOMA	“ 105
4.3.5	DISEGNO DEI PRIMER, SONDA TAQMAN MGB E VALIDAZIONE	“ 107
4.3.6	MESSA A PUNTO DELLA REAL TIME RT-PCR CON SONDA TAQMAN MGB PER IL RILEVAMENTO DI ToBRFV	“ 111
4.3.7	CURVA STANDARD	“ 111
4.3.8	DIFFERENTI METODI DI PREPARAZIONE DEL CAMPIONE E COMPARAZIONE DI DIFFERENTI TECNICHE DI DIAGNOSI PER IL RILEVAMENTO DI ToBRFV	“ 113
4.3.9	DISPERSIONE NELL'AREALE SICILIANO DI ToBRFV	“ 116
4.4	CONCLUSIONI	“ 119
CAPITOLO 5. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	PAG.	122
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	PAG.	129
ALLEGATO 1. LISTA PUBBLICAZIONI	PAG.	141
RINGRAZIAMENTI	PAG.	144

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE

1.1 IMPORTANZA ECONOMICA DELLE COLTURE ORTIVE

Le colture ortive sono sempre state un'importante fonte di reddito, un mezzo per evitare la povertà e un tassello rilevante per migliorare l'alimentazione umana. Negli ultimi anni la domanda di prodotti orticoli freschi e trasformati *pro capite* è aumentata, grazie anche a un profondo cambiamento dello stile di vita e alle migliori abitudini alimentari, con lo scopo di mantenere un buono stato di salute (Tiwari & Nigam, 2019).

Questa categoria di colture comprende ortaggi, frutta e fiori, utilizzati principalmente per scopi alimentari, ma noti anche per il loro valore medicinale e nutritivo.

Le colture ortive sono tra i componenti principali di una dieta sana. La frutta e la verdura, in particolare, sono una buona fonte di fibre, minerali, vitamine e antiossidanti. La grande maggioranza di frutta e verdura è disponibile quasi tutto l'anno in un'ampia varietà e tali prodotti possiedono caratteristiche favorevoli di consistenza, colore, sapore e facilità d'uso. I prodotti ottenuti dalle colture ortive possono essere consumati freschi, cotti, caldi o freddi, in scatola, in salamoia, congelati o essiccati (Vincente *et al.*, 2014). Grazie alle loro qualità organolettiche, la domanda per i prodotti freschi e trasformati è aumentata sul mercato internazionale.

Nel settore orticolo, le specie che rivestono un ruolo predominante nell'economia mondiale, nonché italiana, appartengono alle famiglie *Solanaceae* e *Cucurbitaceae*.

In Italia l'orticoltura, sia per quanto concerne le colture in pieno campo, sia per la coltivazione in sistemi protetti, assume un ruolo rilevante nell'ambito dell'economia mondiale. L'Italia infatti è un Paese che gode di un'ampia disponibilità di specie, di un panorama varietale e di condizioni climatiche favorevoli e assai variabili lungo l'intera penisola, che permettono di diversificare le produzioni. Inoltre, a questi fattori si aggiungono l'impiego di tecnologie all'avanguardia e la possibilità di poter avviare attività produttive intensive, sfruttando i cicli colturali generalmente brevi e la maturazione scalare delle varietà impiegate, che consentono di massimizzare le rese e minimizzare i rischi produttivi legati a fattori ambientali, tecnici ed economici. Le specie ortive maggiormente diffuse in Italia, in particolare nelle regioni del centro-sud, sono il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.), lo zucchini (*Cucurbita pepo* L.) e il peperone (*Capsicum annum*) (ISTAT, 2018). Tale diffusione è dovuta ad un imponente consumo dei prodotti freschi e trasformati di tali colture, poiché rivestono un

ruolo importante nella dieta mediterranea. Inoltre, sono specie che ben si adattano alla coltivazione sia in pieno campo che in coltura protetta e alle condizioni pedoclimatiche della penisola. In particolare, l'agricoltura siciliana basa buona parte della sua attività nell'ambito della coltivazione di specie ortive, quali pomodoro, peperone e zucchini. Negli ultimi anni però, la continua ripetizione di cicli produttivi nei medesimi ambienti colturali, la presenza di nuovi patogeni, o la recrudescenza di vecchi, gli scambi commerciali di sementi e/o materiale di propagazione, i costi di produzione sempre più elevati, nonché i cambiamenti climatici, stanno compromettendo fortemente la qualità e la quantità delle produzioni; questi fattori infatti possono esporre tali colture al grave rischio di diffusione di malattie, soprattutto virali, difficili da controllare. Per concludere, è importante quindi conoscere tutti gli aspetti inerenti all'importanza economica, alla biologia di tali colture e alle possibili minacce di natura biotica ed abiotica che possono compromettere gravemente le produzioni.

1.2 POMODORO (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.)

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) è una delle specie vegetali che meglio rappresenta l'importante segmento economico della produzione orticola mondiale. È una delle colture ortive più diffuse al mondo ed è caratterizzata da un doppio uso, poiché la bacca può essere consumata fresca o nei suoi derivati.

Il pomodoro è una specie dicotiledone erbacea annuale, appartenente alla famiglia delle *Solanaceae*, originaria del Centro e Sud America e della parte meridionale del Nord America. In Europa è stato introdotto presumibilmente intorno al 1540, ma la sua effettiva coltivazione e successiva diffusione è datata intorno alla seconda metà del diciassettesimo secolo. In seguito, grazie alle favorevoli condizioni climatiche e soprattutto a ulteriori selezioni e innesti, che consentirono di ottenere bacche di colore rosso e non più oro, si ebbe l'effettiva diffusione in Italia, soprattutto nel sud del paese. Questa solanacea presenta l'apparato radicale fibroso e il fittone, fortemente ramificato, può andare in profondità, ma la maggior parte delle radici rimane confinata entro i primi 30 cm di terreno. Il portamento della pianta era originariamente espanso e molto lungo, ma la selezione varietale e il miglioramento genetico operato nel corso degli anni, al fine di ottimizzare le operazioni colturali e l'efficienza produttiva, hanno portato a forme raccolte ed erette. Lo stelo è inizialmente eretto e successivamente tende a ricadere verso il basso, per tale motivo è necessario l'impiego di appositi tutori. Le foglie si ramificano fra loro, così come i germogli laterali e gli internodi allungati su cui sono inseriti i fiori. Le foglie sono alternate. Il frutto è una grande bacca, rossa nella fase di maturazione, che presenta dimensioni e forme diverse a seconda della varietà.

Per quanto concerne la diffusione, il pomodoro è coltivato in tre principali aree del mondo: Estremo Oriente, Bacino del Mediterraneo e Nord America, con una superficie investita di oltre 4,8 milioni di ettari ed una produzione complessiva di circa 182 milioni di tonnellate (FAO, 2017) La coltivazione del pomodoro è maggiormente diffusa nei paesi asiatici. La Cina detiene il primato a livello mondiale, sia in termini di superficie con oltre 1 milione di ettari, che di produzione, con oltre 59 milioni di tonnellate, seguita dall'India con 797.000 ha (20.708.000 t) e dalla Turchia con oltre 187.000 ha (12.750.000 t). Tra i paesi africani la Nigeria ha la maggiore superficie coltivata a pomodoro, con circa 589.000 ha, seppur con una produzione non del tutto rapportata alla superficie investita (~4.100.000 t), seguita

dall'Egitto, con oltre 182.000 ha di superficie ed una produzione di circa 7.300.000 t, mentre negli Stati Uniti d'America e Messico sono investiti oltre 280.000 ettari con una produzione di oltre 15.000.000 t. In Europa, la Russia ha la più grande area coltivata con circa 114.000 ettari (Figura 1, 2).

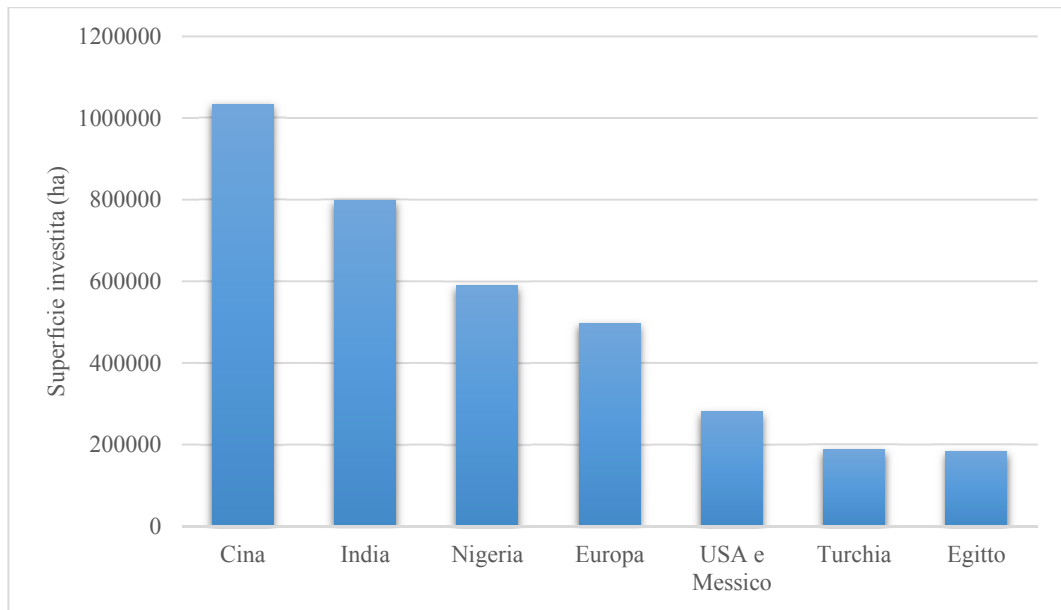


Figura 1 – Superficie investita a pomodoro dei principali Paesi produttori (FAO, 2017).

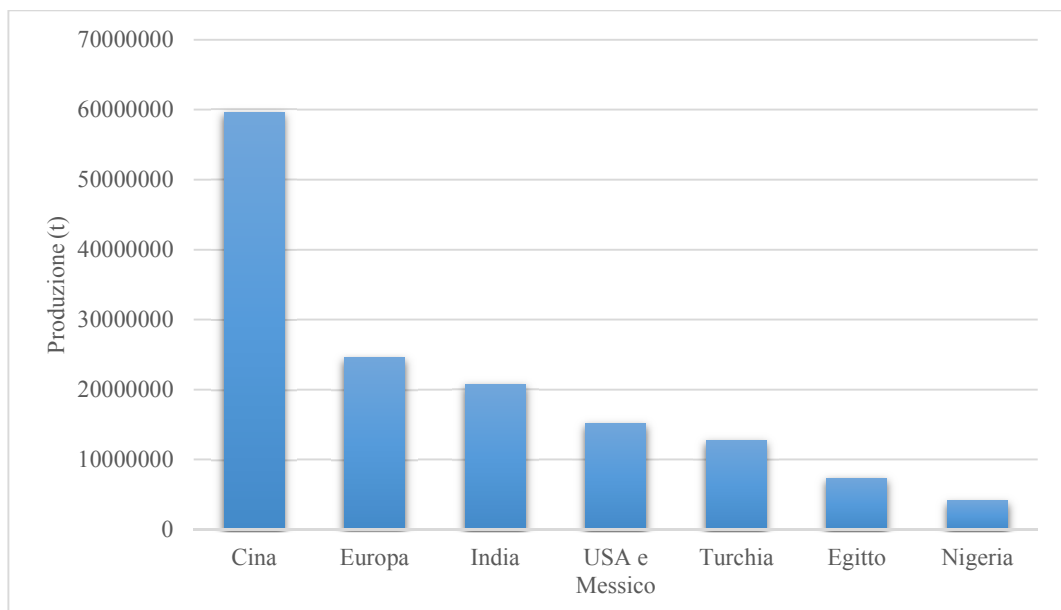


Figura 2 – Produzione di pomodoro dei principali Paesi produttori (FAO, 2017).

La coltivazione di pomodoro nell'Unione Europea conta fino a oltre 380.000 ettari. L'Italia è leader nell'area del Bacino del Mediterraneo con circa 100.000 ha ed una produzione di circa 6 milioni di t (comprese le colture coltivate sia in pieno campo che in serra), seguita dalla Spagna con circa 61.000 ettari ed una produzione di poco superiore ai 5 milioni di tonnellate.

In dettaglio, il pomodoro rappresenta ancora oggi una buona e importante fonte di reddito per molte aziende agricole italiane, sebbene la crisi economica abbia colpito molti settori economici e produttivi. La superficie italiana interessata dalla coltivazione in pieno campo, comprendente la coltivazione sia di pomodoro da mensa che da industria, si aggira attorno ai 90.000 ha, con una produzione di oltre 54 milioni di q, mentre la coltivazione in serra occupa una superficie di circa 7.200 ha, con una produzione poco superiore a 5.300.000 q (ISTAT, 2018). Si può constatare come la maggior parte delle superfici investite a pomodoro e delle relative produzioni totali si concentri nel Mezzogiorno (Tabella 1).

Tabella 1 – Superficie e produzione di pomodoro, in serra e in pieno campo, in Italia. Dettaglio per ripartizione geografica (ISTAT, 2018).

Ripartizioni geografiche	Coltivazione in serra		Coltivazione in pieno campo			
	Superficie (ha)	Produzione totale (q)	Pomodoro da mensa		Pomodoro da industria	
			Superficie (ha)	Produzione totale (q)	Superficie (ha)	Produzione totale (q)
Nord	539,72	453.944	875	333.534	34.276	23.204.039
Centro	1.775,6	1.376.902	1.661	653.365	4.251	2.660.049
Mezzogiorno	4.914,1	3.524.792	14.823	4.467.584	33.977	23.365.325
ITALIA	7.229,42	5.355.638	17.359	5.454.483	72.504	49.229.413

Per quanto riguarda la distribuzione regionale nel territorio nazionale delle superfici interessate dalla coltivazione di pomodoro in pieno campo, sulla base della destinazione d'uso del prodotto, la Sicilia riveste un ruolo predominante per quanto riguarda il pomodoro da consumo fresco, seguita da Puglia, Calabria e Campania; mentre l'Emilia-Romagna primeggia per la produzione di pomodoro da industria, seguita da Puglia e Lombardia. Per quanto concerne, invece, le superfici e le produzioni della coltivazione in serra, la Sicilia detiene il primato a livello italiano (ISTAT, 2018).

La Sicilia impiega, dunque, una posizione predominante nel panorama nazionale della coltivazione del pomodoro, con una superficie complessiva di 14.733 ha e una produzione totale di oltre 4,2 milioni di q (ISTAT, 2018). La maggior parte della produzione in serra è concentrata nella provincia di Ragusa, mentre per la coltivazione in pieno campo primeggiano la provincia di Agrigento (soprattutto pomodoro da mensa) e la provincia di Palermo (prodotto destinato alla trasformazione industriale) (Tabella 2).

Tabella 2 – Superficie e produzione di pomodoro nelle diverse province siciliane (ISTAT, 2018).

Coltivazione in serra		
Provincia	Superficie (ha)	Produzione totale (q)
Ragusa	2.000	1.500.000
Caltanissetta	540	162.000
Siracusa	218	235.000
Agrigento	170	49.300
Trapani	130	13.000
Palermo	34	163.540
Enna	0,50	3.200
Messina	0,20	1.000
Catania	0,10	5.000
TOTALE	3.092,80	2.132.040

Coltivazione in pieno campo		
Provincia	Superficie (ha)	Produzione totale (q)
Agrigento	4.700	846.000
Palermo	3.850	469.000
Ragusa	1.030	495.000
Messina	450	100.000
Siracusa	420	120.600
Trapani	400	40.000
Caltanissetta	300	18.000
Catania	150	35.000
Enna	140	21.000
TOTALE	11.640	2.144.600

1.3 PEPERONE (*CAPSICUM ANNUM*)

Il peperone (*Capsicum annum*), appartenente alla famiglia delle *Solanaceae*, è una specie originaria delle Americhe (Acevedo-Rodriguez & Strong, 2012). È stato ipotizzato che provenga da un distretto dell'America Centrale (Basu & De, 2003) o che sia stato addomesticata in Messico (Aguilar-Meléndez *et al.*, 2017). Essendo una delle prime piante addomesticate della mesoamerica, il peperone, insieme ad altre specie del genere *Capsicum*, è noto fin dall'inizio della civiltà nell'emisfero occidentale e fa parte della dieta umana dal 7500 a.C. Fu Cristoforo Colombo a riferirne per la prima volta il suo utilizzo nelle Americhe intorno al 1493-1494 e, probabilmente, fu esso stesso ad introdurre questa specie in Europa; verso la metà del XVII secolo il peperone veniva coltivato in tutta l'Europa meridionale e centrale, grazie all'immediato adattamento della specie alle condizioni climatiche del vecchio continente (Basu e De, 2003).

Il peperone è un arbusto selvatico con un apparato radicale poco profondo che si estende in profondità solo nei terreni sciolti e sabbiosi. Presenta uno stelo angolare, liscio e leggermente legnoso con rami dicotomici, il cui sviluppo è regolato dal genotipo e dalle condizioni di crescita delle piante. Le foglie sono alternate, glabre con margine intero. I fiori compaiono nelle ascelle delle foglie o dei rami, sono ermafroditi, con una corolla bianca che supporta da 5 a 7 petali e stami di colore giallo chiaro (CABI Datasheet, 2019). I fiori possono essere solitari o raggruppati. Il frutto è una bacca, di colore verde nella prima fase di sviluppo, che può diventare rosso o giallo con tonalità diverse a maturazione. La forma e le dimensioni possono essere diverse: prisma troncato, con tre o quattro lobi, allungato conico o arrotondato. L'interno è diviso in "logge" da setti e placenta incompleti. L'interno del frutto nell'area peduncolare è occupato da un tessuto placentare spugnoso in cui sono inseriti i semi. In funzione della forma e delle dimensioni dei frutti si distinguono numerose varietà botaniche (Zhigila *et al.*, 2014):

- *conoides*, *fasciculatum*, *acuminatum* e *longum* presentano frutti stretti e allungati di piccole dimensioni;
- *grossum* presenta frutti isodiametrici o prismatici di grandi dimensioni;
- *abbreviatum* presenta frutti di forma subconica di medie dimensioni;
- *cerasiforme* presenta frutti di forma sferica o conica di piccole dimensioni.

Per quanto riguarda l'importanza economica del peperone, è difficile stabilire con certezza dei valori inerenti a superficie investita e produzione totale mondiale, questo perché secondo gli ultimi dati riportati dalla FAO nel 2017 non viene fatta alcuna distinzione tra le diverse specie appartenenti al genere *Capsicum*, o tra peperoncini piccanti e non (Pickersgill, 2003). Vi è molta confusione per i diversi termini utilizzati sotto la voce “pimento”, ovvero “capsicum”, “cayenne”, “chillie”, “paprika”, “red pepper” e “bell pepper”. Il termine “capsicum” è allo stesso modo confuso, poiché può essere usato per i peperoni e/o peperoncini non piccanti, ma può anche essere usato per alcuni frutti secchi leggermente piccanti.

Si stima che negli ultimi due decenni, la produzione mondiale totale di peperoncini e peperoni verdi (presumibilmente compresi anche frutti maturi di peperoni e pimento) ha subito un notevole aumento, al momento non del tutto quantificabile, con oltre la metà della produzione dislocata in Asia.

In Italia, il peperone risulta essere una delle colture più rappresentative dell'orticoltura del paese. Occupa una superficie complessiva di oltre 10.500 ha con una produzione totale di 2.691.632 quintali (ISTAT, 2018), coltivato per la maggior parte in pieno campo. Come è possibile notare dai dati riportati in Tabella 3, la maggior parte della produzione in serra e in pieno campo avviene nel Mezzogiorno d'Italia (8.566 ha su un totale di 10.522 ha).

Tabella 3 – Superficie e produzione di peperone, in serra e in pieno campo, in Italia. Dettaglio per ripartizione geografica (ISTAT, 2018).

	Coltivazione in serra		Coltivazione in pieno campo	
	Superficie (ha)	Produzione totale (q)	Superficie (ha)	Produzione totale (q)
Nord	442,63	222.729	440	99.361
Centro	216,03	96.899	857	185.549
Mezzogiorno	1.317,41	470.129	7.249	1.616.965
ITALIA	1.976,07	789.757	8.546	1.901.875

La regione maggior produttrice di peperone in pieno campo è la Puglia con una produzione totale di 547.250 q, seguita da Sicilia, Calabria, Campania e Lazio. Riguardo la coltivazione

in serra, la Campania detiene il primato di produzione con 228.355 q, seguita da Sicilia, Veneto, Lazio e Piemonte.

La Sicilia occupa una posizione di rilievo per la produzione di peperone nel Mezzogiorno, con una superficie complessiva di oltre 2.144 ha e una produzione totale di 484.720 q (ISTAT, 2018). La produzione in serra è concentrata principalmente nelle province di Ragusa e Siracusa (130.000 e 35.600 q, rispettivamente), mentre per la coltivazione in pieno campo primeggia la provincia di Siracusa con 79.000 q seguita dalla provincia di Ragusa con 65.000 q (Tabella 4).

Tabella 4 – Superficie e produzione di peperone nelle diverse province siciliane (ISTAT, 2018).

Coltivazione in serra		
Provincia	Superficie (ha)	Produzione totale (q)
Ragusa	450	130.000
Siracusa	185	35.600
Agrigento	47	23.500
Caltanissetta	18	3.600
Trapani	50	2.500
Palermo	1,90	1.425
Enna	0,50	900
Messina	0,06	45
Catania	-	-
TOTALE	752,46	197.570

Coltivazione in pieno campo		
Provincia	Superficie (ha)	Produzione totale (q)
Siracusa	350	79.000
Ragusa	150	65.000
Agrigento	271	50.100
Palermo	230	27.400
Catania	140	27.000
Messina	110	20.000
Caltanissetta	91	13.650
Enna	30	3.600
Trapani	20	1.400
TOTALE	1.392	287.150

1.4 ZUCCHINO (*CUCURBITA PEPO* L.)

Lo zucchini (*Cucurbita pepo* L.) è una specie appartenente alla famiglia delle *Cucurbitaceae*, originaria da una fascia compresa tra la parte meridionale degli Stati Uniti e il Messico nordorientale. La prima domesticazione delle forme selvatiche, tuttora presenti in natura, fu operata dai nativi americani circa 10.000 anni fa in Messico. A partire dal XVI secolo si diffuse in Europa, Asia e Africa. In Italia la coltivazione si diffuse rapidamente, grazie anche alle condizioni climatiche favorevoli.

È una pianta erbacea annuale con steli rampicanti, striscianti o in alcune varietà folti. Il sistema di radici è superficiale e ramificato, che cresce da un fittone ben sviluppato. Gli steli sono setosi, ramificati, spesso radicati ai nodi. I piccioli sono setosi, scanalati, lunghi 6-24 cm. Le sottili foglie sono semplici, alternate, da largamente ovate a deltoidi, con margini leggermente dentati, lunghe 20-30 cm e larghe 10-35 cm (Messiaen & Fagbayide, 2004). I frutti sono tecnicamente bacche, molto variabili in forma, colore e dimensioni. La forma può essere ovale, cilindrica, appiattita, globosa, fusiforme e/o affusolata. La superficie può presentarsi liscia, verrucosa, rugosa, solcata, con una colorazione che può andare dal bianco al giallo, da verde chiaro a verde scuro, quasi nero, crema e/o arancione (Wang *et al.*, 2011). La coltivazione dello zucchini coinvolge sia l'Estremo Oriente, i paesi del bacino del Mediterraneo e l'America, con una superficie investita di oltre 2 milioni di ettari ed una produzione complessiva di circa 27 milioni di tonnellate (FAO, 2017). I paesi asiatici sono i maggiori produttori, con l'India che detiene il primato sia in termini di superficie che di produzione (536.171 ha, 5.142.812 t), seguita dalla Cina con oltre 438.000 ha (8.051.495 t) e dalla Turchia con oltre 179.000 ha (580.624 t).

Tra i paesi dell'Unione Europea, la Spagna detiene il primato nell'area del bacino del Mediterraneo, con una superficie investita di 14.957 ha ed una produzione di poco superiore a 702.000 t (comprese le colture coltivate sia in pieno campo che in serra), seguita dall'Italia con 18.529 ettari ed una produzione di circa 590.000 tonnellate (FAO, 2017).

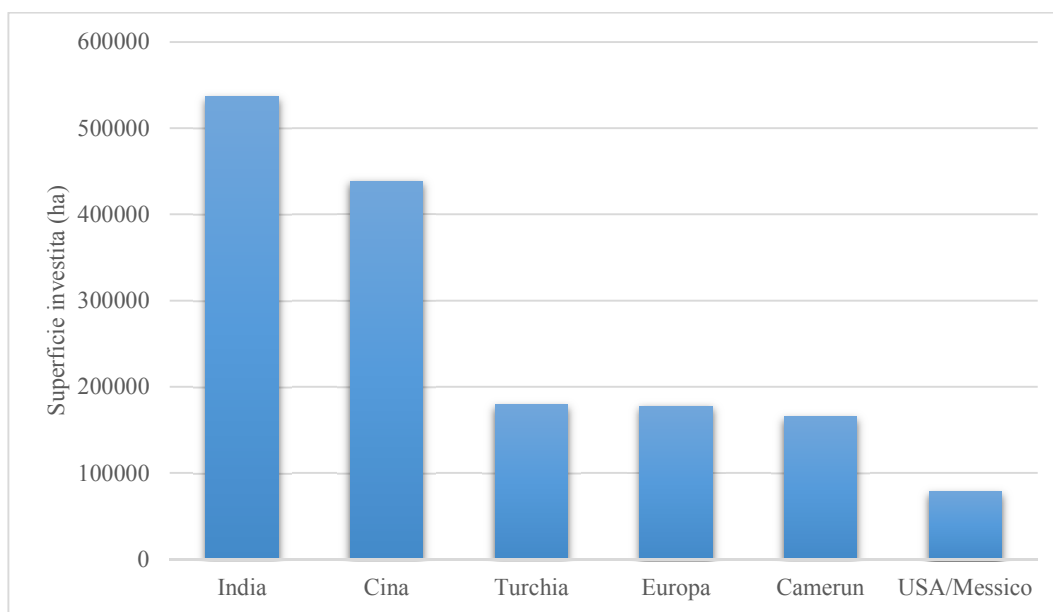


Figura 3 – Superficie investita a zucchini dei principali Paesi produttori (FAO, 2017).

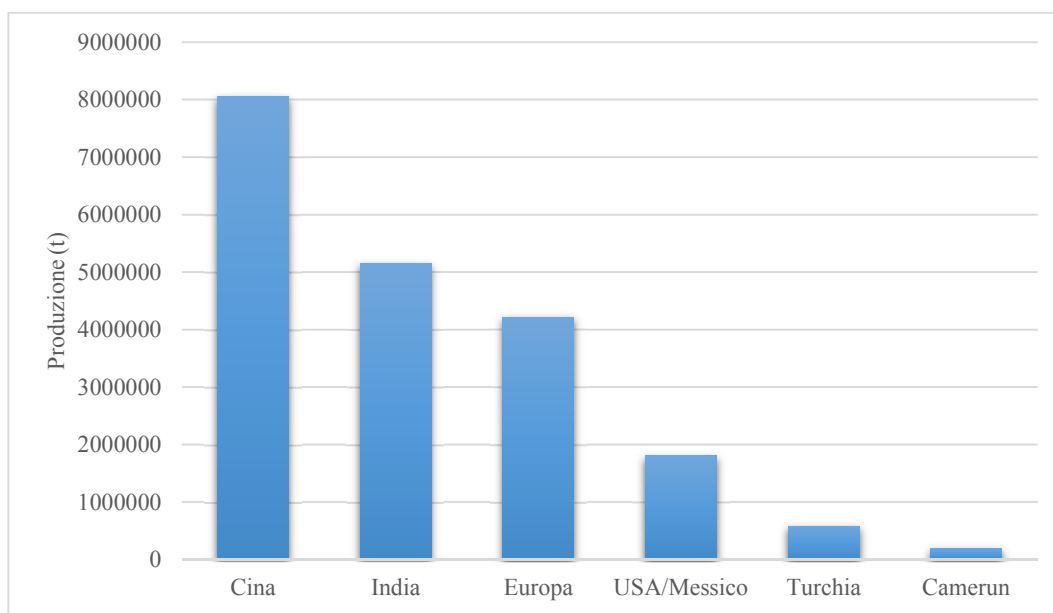


Figura 4 – Produzione di zucchini dei principali Paesi produttori (FAO, 2017).

In Italia lo zucchini si è diffuso in ogni regione anche se, per le elevate esigenze termiche, la specie assume particolare importanza nelle regioni meridionali. Nel territorio nazionale la superficie investita a zucchini (18.671 ha) è principalmente distribuita nelle regioni del centro e del mezzogiorno per quanto concerne la coltura protetta, mentre la coltivazione in

pieno campo è maggiormente distribuita nelle regioni del nord e del mezzogiorno (ISTAT, 2018). In dettaglio, le regioni maggiori produttrici di zucchini in pieno campo sono la Puglia, con una produzione totale di 569.500 quintali, seguita da Emilia-Romagna, Lazio, Sicilia e Calabria, mentre, per la coltivazione in serra, la regione Lazio detiene il primato con una produzione di 1.266.100 quintali, seguita da Sicilia, Puglia, Campania e Veneto.

Tabella 5 – Superficie e produzione di zucchini, in serra e in pieno campo, in Italia. Dettaglio per ripartizione geografica (ISTAT, 2018).

	Coltivazione in serra		Coltivazione in pieno campo	
	Superficie (ha)	Produzione totale (q)	Superficie (ha)	Produzione totale (q)
Nord	566,29	206.785	5.388	1.363.905
Centro	1.792,22	1.280.869	1.999	563.203
Mezzogiorno	2.153,81	845.173	6.772	1.631.288
ITALIA	4.512,32	2.332.827	14.159	3.558.396

Per quanto concerne la regione Sicilia, lo zucchini viene prodotto sia in pieno campo nei mesi primaverili-estivi e autunnali, che in serra all'interno di piccoli e medi tunnel durante la stagione invernale; nella coltivazione dello zucchini sono di fondamentale importanza i cicli colturali relativamente brevi, ottenibili grazie all'utilizzo di varietà a maturazione scalare, e il ricorso ad apprestamenti protettivi, consentendo quindi di ridurre i rischi produttivi legati ai fattori ambientali, tecnici, nonché economici. Le province maggiori produttrici di zucchini in coltura protetta sono Ragusa e Siracusa, con 800 e 185 ha di superficie e 300.000 e 43.000 quintali di produzione, rispettivamente. Per la coltivazione in pieno campo, la provincia di Siracusa si attesta su una produzione di 124.500 quintali, seguita da Ragusa con una produzione di 100.000 quintali (Tabella 6).

Tabella 6 – Superficie e produzione di zucchini nelle diverse province siciliane (ISTAT, 2018).

Coltivazione in serra		
Provincia	Superficie (ha)	Produzione totale (q)
Ragusa	800,00	300.000
Siracusa	185,00	43.000
Trapani	100,00	5.000
Palermo	4,30	4.310
Catania	0,05	2.500
Agrigento	4,50	2.385
Caltanissetta	15	1.500
Enna	0,5	1.250
Messina	0,08	160
TOTALE	1.109,43	360.105

Coltivazione in pieno campo		
Provincia	Superficie (ha)	Produzione totale (q)
Siracusa	500	124.500
Ragusa	250	100.000
Palermo	310	53.480
Caltanissetta	300	40.500
Agrigento	191	38.500
Messina	110	26.000
Enna	20	3.000
Catania	5	2.450
Trapani	10	1.200
TOTALE	1.696	389.630

1.5 PRINCIPALI MALATTIE DELLE ORTIVE

La malattia è il risultato dell'interazione tra patogeno, pianta ospite suscettibile e condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo del patogeno stesso nel corso del tempo, inteso come persistenza delle condizioni ambientali favorevoli all'attacco. Tali fattori contribuiscono a determinare la severità dell'attacco stesso e l'entità del danno. Inoltre, la probabilità che un patogeno si possa diffondere con estrema facilità aumenta enormemente nel momento in cui gli imprenditori agricoli, a causa della domanda continua e ininterrotta da parte dell'industria di trasformazione e dei consumatori, iniziano a produrre le proprie colture orticole, sia in pieno campo che in serra, in condizioni di monocoltura. Al giorno d'oggi, l'aumento dell'incidenza di molte malattie endemiche, nonché l'emergenza di nuove malattie, hanno aggravato la crisi del settore orticolo in Italia e in tutto il mondo, influenzando negativamente anche sulla sicurezza degli alimenti che sulla protezione dell'ambiente.

Riguardo le specie coltivate appartenenti alle famiglie *Solanaceae* e *Cucurbitaceae*, il pomodoro, peperone e zucchini, sono soggette a diverse malattie di natura biotica. In Tabella 7 e 8 sono riportati i principali agenti eziologici di tali colture.

Tabella 7 – Principali patogeni del pomodoro e peperone.

FUNGHI		
Agente eziologico	Nome malattia	Ospite
<i>Phytophthora infestans</i>	Peronospora del pomodoro	Pomodoro
<i>Fusarium oxysporum f.s. radicle-lycopersici</i>	Marciume del colletto e delle radici	Pomodoro
<i>Colletotrichum coccodes</i>	Antracnosi dei frutti/marciume bruno delle radici	Peperone
<i>Cladosporium fulvum</i>	Cladosporiosi	Pomodoro, Peperone
<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	Suberosi radicale del pomodoro	Pomodoro
<i>Phytophthora capsici</i>	Cancrena del pedale del peperone	Pomodoro, Peperone
<i>Pythium debaryanum</i>	Moria delle piantine in semenzaio	Pomodoro, Peperone
<i>Pythium spp.</i>		
<i>Sclerotinia fuckeliana</i> (forma ascofora)	Muffa grigia	Pomodoro, Peperone
<i>Botrytis cinerea</i> (forma conidica)		
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Sclerotinia	Pomodoro, Peperone
<i>Septoria lycopersici</i>	Septoriosi del pomodoro	Pomodoro
<i>Verticillium dahliae</i>	Verticilloso	Pomodoro, Peperone
<i>Leveillula taurica/Oidiopsis taurica</i>	Mal bianco delle Solanacee	Pomodoro, Peperone
BATTERI		
Agente eziologico	Nome malattia	Ospite
<i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i>	Cancro batterico del pomodoro	Pomodoro
<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>	Macchiatura batterica del pomodoro	Pomodoro
<i>Xanthomonas spp.</i>	Maculatura batterica del pomodoro e del peperone	Pomodoro, Peperone
<i>Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum</i>	Marciume molle batterico	Pomodoro, Peperone
VIRUS		
Agente eziologico	Nome malattia	Ospite
<i>Alfalfa mosaic virus</i> (AMV)	Virus del mosaico dell'erba medica	Pomodoro, Peperone
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Virus del mosaico del cetriolo	Pomodoro, Peperone
<i>Eggplant mottled dwarf virus</i> (EMDV)	Virus del nanismo screziato della melanzana	Pomodoro, Peperone
<i>Parietaria mottle virus</i> (PMoV)	Virus della maculatura della parietaria	Pomodoro, Peperone
<i>Pelargonium zonate spot virus</i> (PZSV)	Virus della maculatura zonata del geranio	Pomodoro, Peperone
<i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV)	Virus del mosaico del pepino	Pomodoro
<i>Potato virus Y</i> (PVY)	Virus Y della patata	Pomodoro, Peperone
<i>Southern tomato virus</i> (STV)	-	Pomodoro
<i>Tomato chlorosis virus</i> (ToCV)	Virus della clorosi del pomodoro	Pomodoro
<i>Tomato infectious chlorosis virus</i> (TICV)	Virus della clorosi infettiva del pomodoro	Pomodoro
<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i> (ToLCNDV)	Virus dell'accartocciamento fogliare giallo del pomodoro New Delhi	Pomodoro, Peperone
<i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV)	Virus del mosaico del pomodoro	Pomodoro, Peperone
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	Virus del mosaico del tabacco	Pomodoro, Peperone
<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	Virus dell'avvizzimento maculato del pomodoro	Pomodoro, Peperone
<i>Tomato torrado virus</i> (ToTV)	Virus del torrado del pomodoro	Pomodoro
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV)	Malattia dell'accartocciamento fogliare giallo del pomodoro	Pomodoro
<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i> (TYLCSV)		
<i>Tomato brown rugose fruit virus</i> (ToBRFV)	-	Pomodoro, Peperone

Tabella 8 – Principali patogeni dello zucchini.

FUNGHI	
Agente eziologico	Nome malattia
<i>Fusarium oxysporum f.sp. melonis</i>	Marciume del melone
<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	Peronospora
<i>Erysiphe cichoracearum</i>	Mal bianco
<i>Verticillium spp.</i>	Verticilliosi
<i>Didymella bryoniae</i>	Cancro gommoso del melone
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Cladosporiosi
<i>Pythium spp.</i>	Moria delle piantine in semenzaio
<i>Sclerotinia fuckeliana/Botrytis cinerea</i>	Muffa grigia
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Sclerotinia
BATTERI	
Agente eziologico	Nome malattia
<i>Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum</i>	Marciume molle batterico
VIRUS	
Agente eziologico	Nome malattia
<i>Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)</i>	Virus del mosaico giallo dello zucchini
<i>Cucumber mosaic virus (CMV)</i>	Virus del mosaico del cetriolo
<i>Beet pseudo-yellows virus (BPYV)</i>	Virus del giallume della bietola
<i>Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV)</i>	Virus dell'accartocciamento fogliare giallo del pomodoro New Delhi

Tra i patogeni più comuni e pericolosi per le colture ortive, i virus possono causare, nei casi più gravi, la totale perdita di produzione, con conseguenti perdite economiche per i produttori.

1.6 I FITOVIRUS

I virus sono particelle infettive di natura non cellulare e di dimensioni submicroscopiche costituiti da un acido nucleico rivestito da un involucro proteico (capside) incapaci di una sintesi proteica autonoma e perciò caratterizzati dalla vita parassitaria endocellulare obbligatoria. Sono agenti eziologici di numerose malattie che colpiscono l'uomo, gli animali, i batteri e le piante. I virus si moltiplicano inducendo le cellule ospiti a produrre più particelle virali. Sono in grado di causare malattie, non consumando le cellule o uccidendole mediante la produzione di tossine, ma sfruttando sostanze cellulari e processi metabolici durante la moltiplicazione, occupando spazio nelle cellule e disturbando i processi cellulari, che a loro volta sconvolgono il metabolismo cellulare, portando allo sviluppo di sostanze anomale e condizionando le funzioni e la vita della cellula o dell'organismo. Un virus è un'entità submicroscopica di dimensioni estremamente ridotte, tali da non poter essere osservato

individualmente con un microscopio ottico (Christie & Edwardson, 1977). I virus presentano le seguenti caratteristiche:

- sono costituiti da un solo tipo di acido nucleico (DNA o RNA) racchiuso in un capsido di natura proteica;
- si riproducono traducendo le informazioni genetiche solo quando il loro genoma viene introdotto in una cellula;
- sono incapaci di aumentare di dimensioni o di subire scissione binaria;
- mancano di ribosomi e di sistemi enzimatici deputati alla produzione di energia;
- sono sprovvisti di capacità biosintetiche autonome e si servono dell'apparato biosintetico della cellula ospite per la loro replicazione.

In base alle loro caratteristiche fisiche, morfologiche e biologiche i fitovirus, come tutti i virus, vengono suddivisi in famiglie (con suffisso *-viridae*), generi (con suffisso *-virus*) e specie. Ulteriori suddivisioni in sottospecie, tipi, ceppi ecc. vengono stabilite da apposite commissioni per la nomenclatura in base a criteri che vengono studiati caso per caso (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV, 2019). Ad esempio, due virus della medesima famiglia costituiscono due tipi distinti quando l'omologia del loro genoma risulta essere inferiore al 50%. Nella pratica i virus vengono indicati secondo la nomenclatura comune, ovvero nome del virus + nome della malattia determinata nell'ospite principale (ad esempio virus del mosaico del tabacco) oppure con il nome che gli è stato attribuito al momento dell'isolamento (ad esempio virus Ebola). L'attuale classificazione internazionale si basa:

- sul tipo di genoma (DNA o RNA) e sulla sua configurazione (mono- o bicatenario, lineare o circolare, monofilamento o segmentato, a polarità positiva o negativa);
- sul tipo di simmetria (cubica o elicoidale);
- sulla presenza/assenza di involucro pericapsidico;
- sul meccanismo di replicazione.

Il genoma può essere costituito da DNA o da RNA e può essere monocatenario o bicatenario, lineare oppure circolare, costituito da un'unica molecola o da vari segmenti; in quest'ultimo caso si parla di genoma segmentato. Nei virus con RNA monocatenario, questo può essere orientato come un RNA messaggero (RNAm a polarità positiva) o in modo complementare

all'RNAm (antisense o a polarità negativa). A seconda del tipo di genoma la replicazione segue particolari meccanismi metabolici.

Oltre ad essi, tuttavia, altri due tipi di agenti patogeni simili a virus sono associati a malattie delle piante. I “virus satelliti” sono agenti subvirali ma non possono causare infezioni da soli. Essi devono sempre essere associati a determinati virus (virus helper) perché dipendono da questi ultimi per la moltiplicazione e il processo infettivo (Dimmock *et al.*, 2016). Esistono anche gli “RNA satelliti”, ovvero piccoli frammenti di RNA lineari o circolari situati all'interno dei virioni di alcuni virus multicomponenti (Collmer & Howell, 1992). Gli RNA satelliti non sono correlati, o sono solo parzialmente correlati all'RNA del virus; possono aumentare o diminuire la gravità delle infezioni virali e seguono un meccanismo di replicazione indipendente da quello del genoma virale.

Secondo gli ultimi dati forniti dall'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV Master Species List, 2018), il numero di virus attualmente conosciuti supera le 5.500 specie, con inserimento di nuove specie descritte con frequenza mensile. Di questi, circa il 50% è in grado di infettare le piante; questi prendono il nome di fitovirus. I fitovirus, possono danneggiare alcune o tutte le parti di una pianta, causando perdite economiche, riducendo le rese e la qualità dei prodotti vegetali. La gravità delle singole malattie virali può variare con la località, la varietà della specie coltivata e da una stagione all'altra. Nei casi più eclatanti si può arrivare alla distruzione di interi impianti di coltivazione.

1.6.1 MORFOLOGIA

Una particella virale completa viene definita “virione” e la sua principale funzione è quella di introdurre il proprio acido nucleico all'interno di una cellula ospite, affinché esso possa essere espresso dall'apparato biosintetico della stessa. L'acido nucleico (DNA o RNA) contiene l'informazione genetica necessaria per codificare tutte le funzioni replicative del virus, compresa la programmazione della cellula ospite per l'espletamento delle funzioni necessarie per la moltiplicazione virale. Il rivestimento proteico ha una doppia funzione: proteggere l'acido nucleico del virus dalla degradazione degli agenti denaturanti presenti nell'ambiente extracellulare e consentire l'adesione del virione su specifici recettori della membrana citoplasmatica della cellula ospite. Le proteine del rivestimento sono codificate dal genoma virale, la cui ridotta lunghezza impone una limitazione al numero di proteine

destinate a una data funzione. Per tale motivo, generalmente, il rivestimento è costituito da unità ripetute di una o poche proteine, combinate tra loro a formare una struttura continua. Questa combinazione può seguire due schemi fondamentali: una distribuzione elicoidale intorno all'acido nucleico (simmetria elicoidale) o la costituzione di una sorta di guscio icosaedrico (simmetria cubica) (Figura 5), definito “capside” il quale racchiude l'acido nucleico e le proteine a esso associate, le nucleoproteine. Le nucleoproteine insieme al genoma formano il cosiddetto “nucleocapside”.

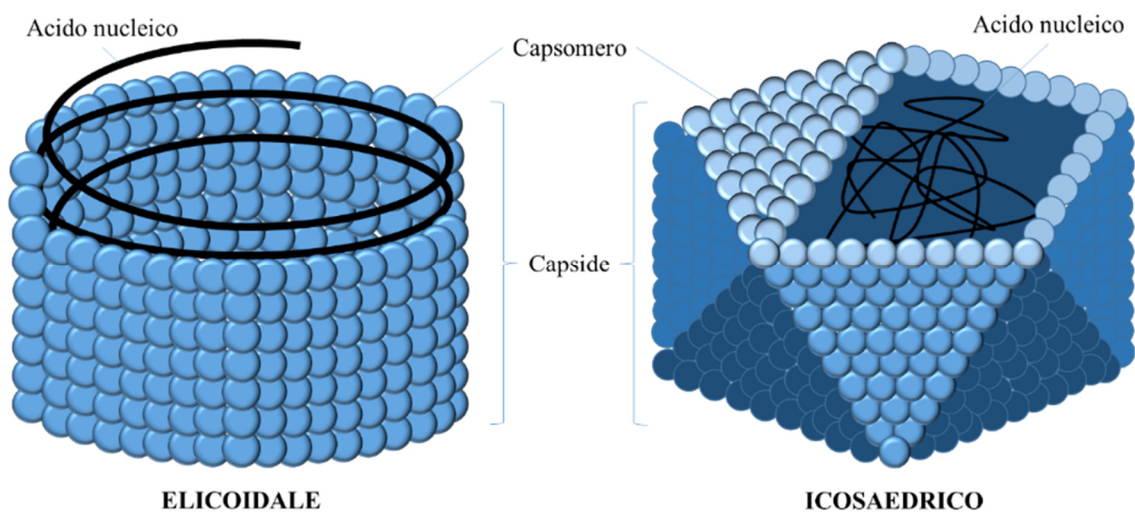


Figura 5 – Rappresentazione schematica del rivestimento elicoidale e icosaedrico.

Per quanto concerne la morfologia, i fitovirus possono presentare diverse forme e dimensioni. Quasi la metà hanno una forma allungata o sferica (isometrica o poliedrica), mentre i restanti una morfologia bacilliforme.

Molti virus delle piante hanno genomi divisi, ovvero sono costituiti da due o più filamenti di acido nucleico distinti incapsulati in particelle di dimensioni diverse, costituite dalle stesse sub-unità proteiche. Inoltre, molti virus isometrici hanno due o tre diversi componenti della stessa dimensione ma contenenti filamenti di acido nucleico di lunghezze diverse. Nei virus multicomponente, tutti i componenti dei filamenti di acido nucleico devono essere presenti nella pianta affinché il virus si moltiplichi e possa avvenire il processo infettivo. In Figura 6 e 7 sono riportati i fitovirus a DNA e RNA in base alle caratteristiche morfologiche.

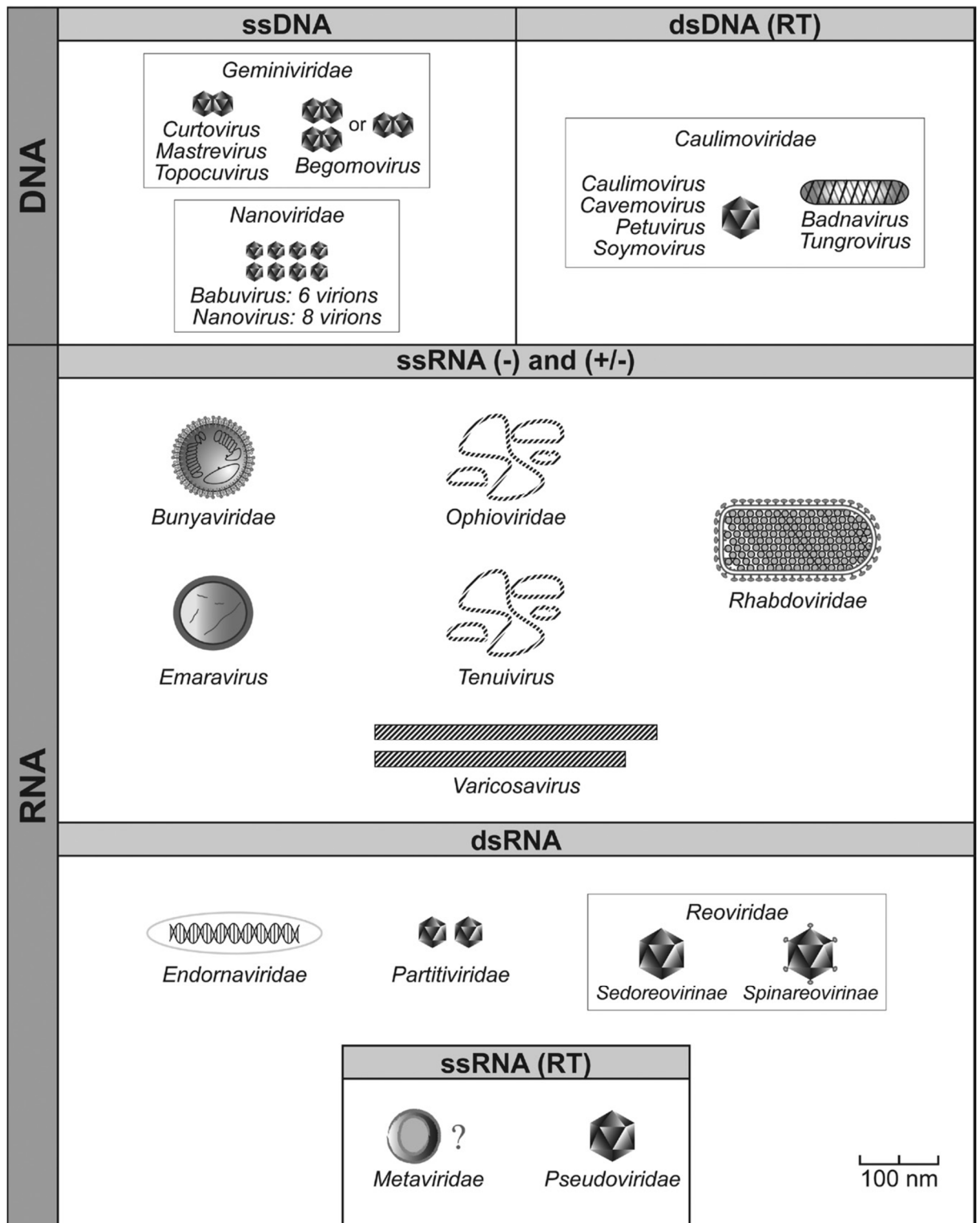


Figura 6 – Classificazione tassonomica dei virus che infettano le piante (parte 1) (King *et al.*, 2011).

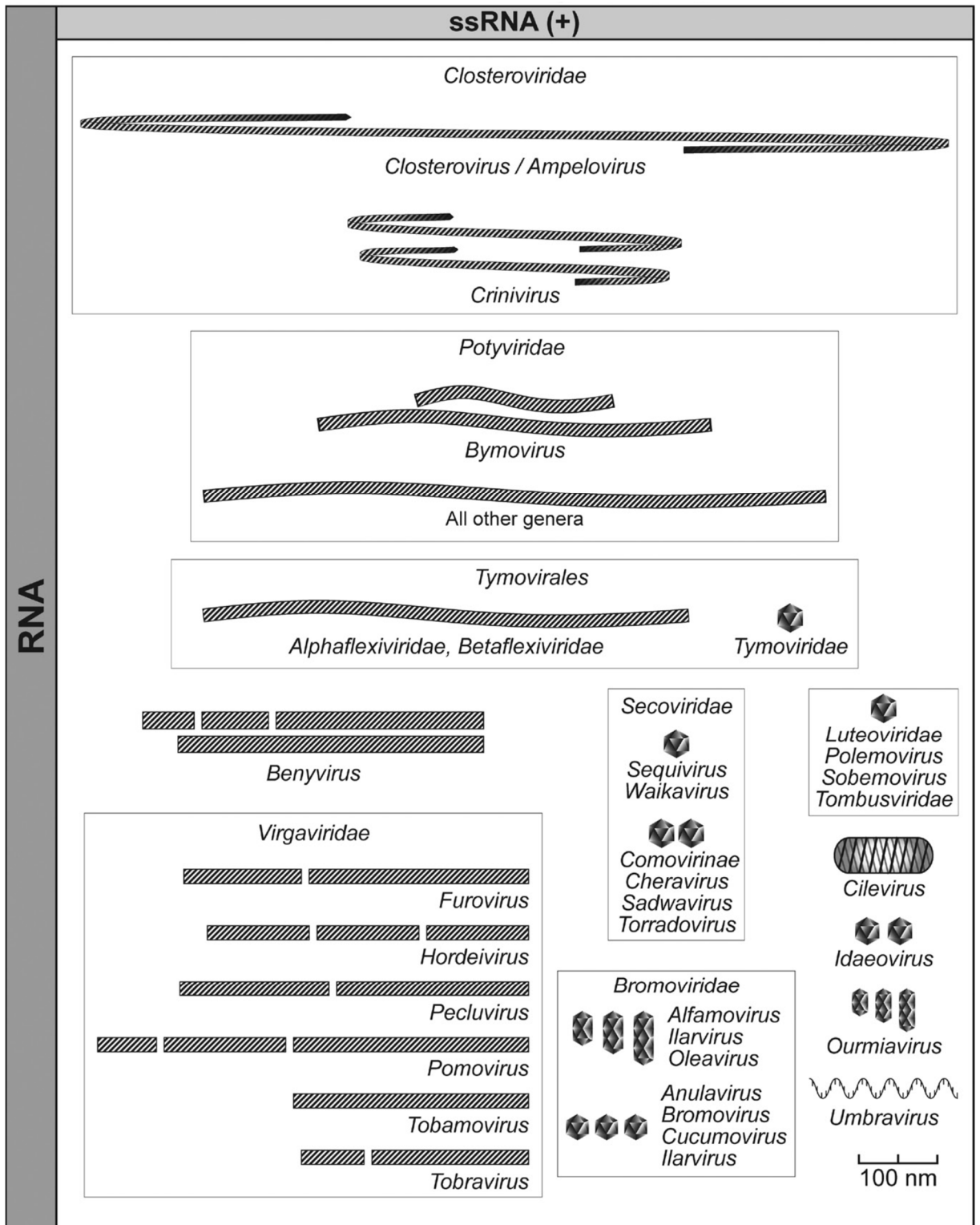


Figura 7 – Classificazione tassonomica dei virus che infettano le piante (parte 2)
(King *et al.*, 2011).

1.6.2 PROTEINE VIRALI

Le proteine virali, come tutte le proteine, sono costituite da aminoacidi. La sequenza di aminoacidi all'interno di una proteina, dettata dalla sequenza di nucleotidi nel materiale genetico, determina la natura e le proprietà della proteina stessa.

Gli involucri proteici di rivestimento dei fitovirus sono composti da subunità ripetute, assemblate in modo simmetrico e preciso per formare il capsido, un involucro che copre e protegge l'acido nucleico. Il contenuto e la sequenza di aminoacidi per le subunità proteiche di un dato virus sono costanti ma variano per virus diversi e anche per ceppi diversi dello stesso virus. Oltre ad avere una funzione protettiva dell'acido nucleico, il capsido determina le caratteristiche antigeniche di un virus, regola la sua trasmissione tramite vettori e in alcuni casi determina la specificità del virus nei riguardi della sua gamma di ospiti. Alcuni virus possono presentare anche un involucro di molecole lipidiche frammiste alle proteine sulla faccia esterna del capsido.

Le proteine codificate dai virus, in base alla loro funzione biologica, possono essere distinte in:

- Proteine strutturali: quando sono componenti essenziali per l'organizzazione del capsido e per l'assemblaggio dell'acido nucleico virale con le subunità proteiche;
- Proteine non strutturali: la maggior parte di esse si trovano nelle cellule infette, con funzioni specifiche relative alla replicazione dell'acido nucleico, alla scissione proteolitica dei polipeptidi, alla diffusione del virus nei tessuti dell'ospite e al trasferimento delle particelle virali da una pianta all'altra da parte dei vettori. In certi virus, alcune proteine non strutturali con attività enzimatica prodotte in quantità eccessiva, si accumulano all'interno della cellula in strutture note come corpi d'inclusione, spesso con forma e localizzazione specifiche per un determinato gruppo di virus.

La maggior parte dei virus vegetali codifica per le proteine di movimento (movement protein – MP) che si associano ai plasmodesmi e mediano il trasporto delle particelle virali tra le cellule. Due principali meccanismi di trasporto possono essere distinti in base al genere del virus. Alcune proteine di movimento si associano all'RNA virale e mediano il suo trasporto attraverso i plasmodesmi, formando complessi di ribonucleoproteine (RNP). Questo meccanismo è regolato dalle proteine “triple gene block” (TGB) dei potexvirus o dalla

superfamiglia “30K” delle proteine di movimento dei tobamovirus. In alternativa, i comovirus e i caulimovirus codificano per le proteine di movimento, le quali formano strutture tubolari attraverso i plasmodesmi, consentendo il passaggio delle particelle virali attraverso le cellule (Heinlein & Epel 2004; Taliansky *et al.*, 2008).

Il contenuto e le sequenze di aminoacidi sono noti per le proteine di molti virus. Ad esempio, la subunità proteica del virus del mosaico del tabacco (*Tobacco mosaic virus* – TMV) è costituita da 158 amminoacidi in una sequenza costante e ha una massa di 17,6 KDa. Nel TMV le subunità proteiche sono disposte in un’elica contenente 49 subunità ogni tre giri (Culver, 2002). Il foro centrale della particella virale lungo l'asse ha un diametro di 4 nanometri, mentre il diametro massimo della particella è di 18 nanometri. Ogni particella di TMV è costituita da circa 130 giri di elica di subunità proteiche (Figura 8).

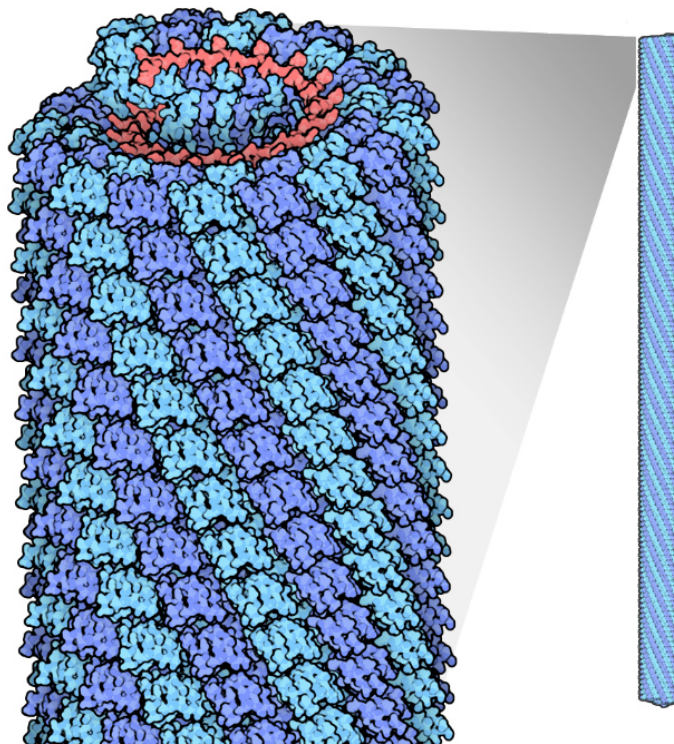


Figura 8 – Particolare della struttura e delle subunità proteiche di TMV (Protein Data Bank, 2019).

1.6.3 MODELLI DI REPLICAZIONE VIRALE

I virus delle piante penetrano all'interno dei tessuti e delle cellule solo attraverso ferite causate da danni meccanici, attraverso vettori o mediante deposizione di un granulo di polline infetto all'interno di un ovulo.

Nella replicazione virale dei virus a RNA, l'acido nucleico del virus viene prima liberato del rivestimento proteico e solo successivamente induce la cellula a produrre l'RNA polimerasi virale. Questo enzima utilizza l'RNA virale come modello per formare RNA complementare. L'RNA prodotto da tale sintesi non è l'RNA virale ma un'immagine speculare (copia complementare) dell'RNA di partenza. Nel momento in cui l'RNA complementare si forma, è temporaneamente legato al filamento virale (Figura 9). Pertanto, i due formano un RNA a doppio filamento che in poco tempo si separa per produrre l'RNA del virus originale e il filamento speculare (-), con quest'ultimo che servirà successivamente da modello per la sintesi dell'RNA (+) delle nuove particelle virali.

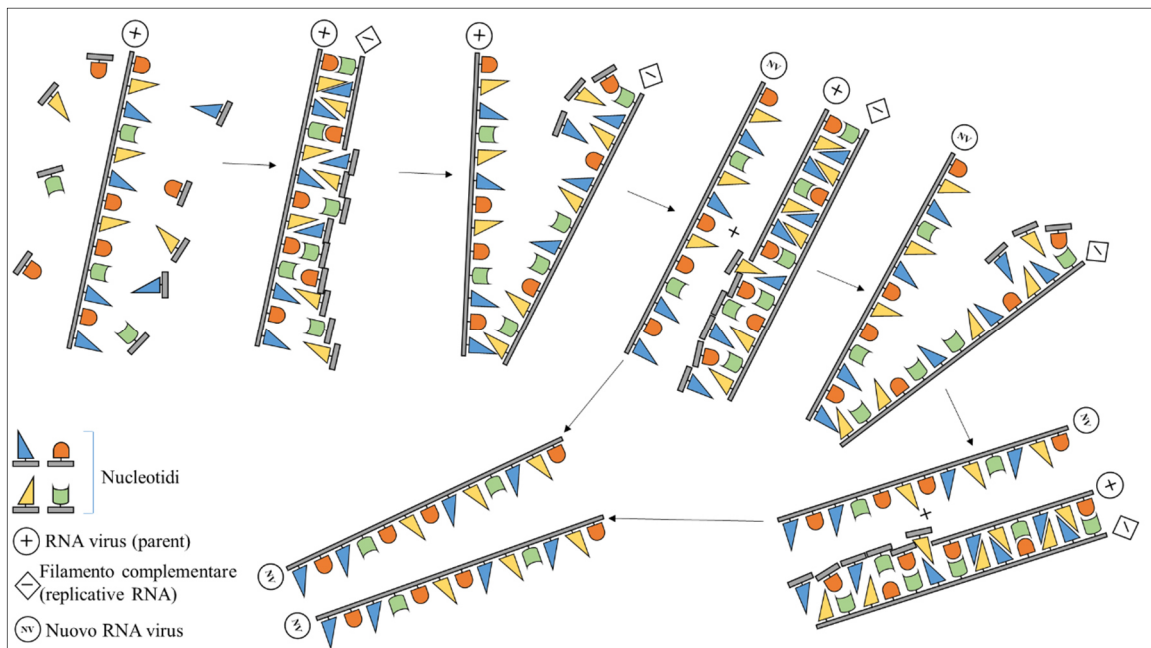


Figura 9 – Rappresentazione schematica della replicazione dell'RNA virale.

La replicazione di alcuni virus differisce notevolmente dal suddetto schema. Nei virus in cui sono presenti diversi segmenti di RNA con due o più particelle, tutte le particelle devono

essere presenti nella stessa cellula affinché possa avvenire la replicazione virale e il successivo sviluppo dell'infezione.

Nei virus isometrici con RNA a doppio filamento, l'RNA è segmentato all'interno dello stesso virus, non è infettivo e dipende per la sua replicazione nell'ospite da un enzima trascrittasi codificato dal virus stesso.

In una infezione causata da un virus a DNA a doppio filamento (double-stranded DNA – dsDNA), il dsDNA virale, superavvolto a formare un minicromosoma, entra nel nucleo cellulare. Viene successivamente trascritto in due RNA a singolo filamento: l'RNA di dimensioni più ridotte viene trasportato nel citoplasma e successivamente tradotto in proteine, mentre l'RNA di maggiori dimensioni viene anch'esso trasportato nel citoplasma, ma incapsulato da subunità proteiche di rivestimento e impiegato come modello per la trascrizione inversa in un virione completo a dsDNA completo. Il metodo di replicazione dei fitovirus a DNA a singolo filamento (single-stranded DNA – ssDNA) non è stato ancora determinato con certezza. Vi sono alcune prove, tuttavia, che dimostrano che l'ssDNA si replica mediante un processo definito “rolling circle” dal quale si ottiene un filamento multimerico (-) (Figura 10), che funge da modello per la produzione di filamenti multimerici (+) i quali vengono successivamente tagliati per produrre filamenti di lunghezza unitaria (+).

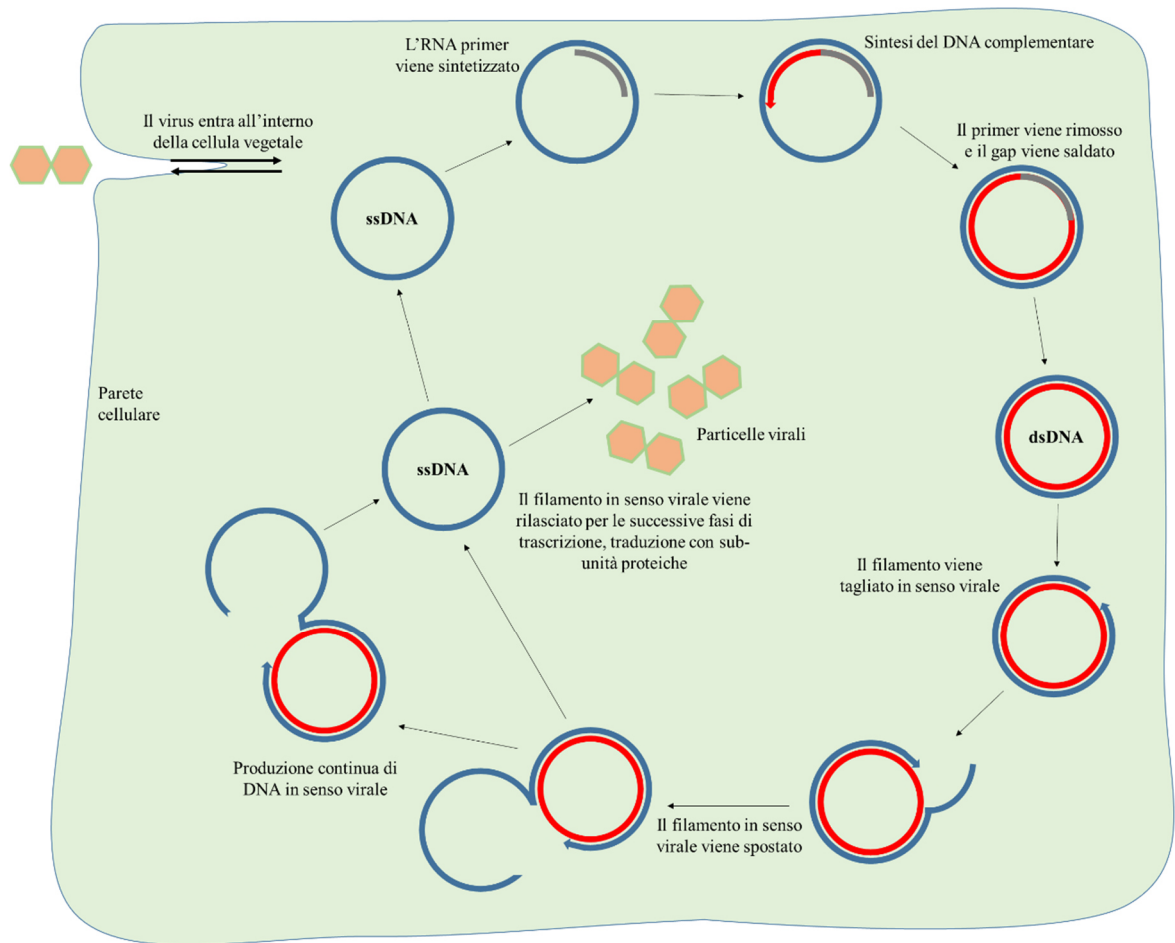


Figura 10 – Rappresentazione schematica della replicazione di un geminivirus.

Non appena viene sintetizzato un nuovo acido nucleico virale, parte di esso viene tradotto, cioè induce la cellula ospite a produrre le molecole proteiche codificate dal suo acido nucleico. La sintesi proteica nelle cellule sane dipende dalla presenza di aminoacidi e dalla cooperazione di ribosomi, RNA messaggero e RNA di trasferimento. Ogni RNA di trasferimento è specifico per un aminoacido, che porta verso la sequenza nucleotidica appropriata lungo l'RNA messaggero. L'RNA messaggero, che viene sintetizzato nel nucleo, determina il tipo di proteina che verrà prodotta codificando la sequenza in cui saranno disposti gli aminoacidi. I ribosomi forniscono l'energia necessaria per il legame degli aminoacidi predisposti per formare la proteina (Figura 11).

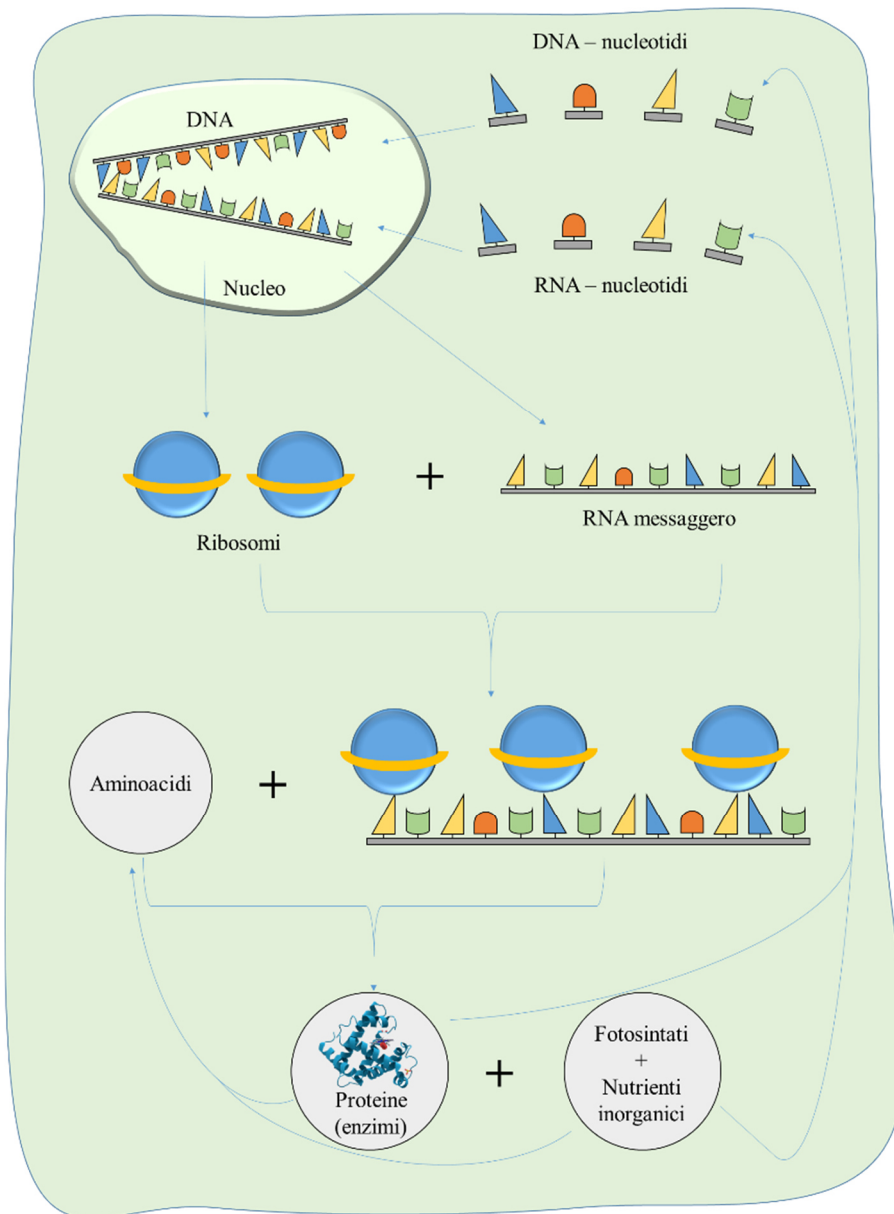


Figura 11 – Rappresentazione schematica delle funzioni di base all'interno di una cellula.

Il virus utilizza gli aminoacidi e i ribosomi della cellula ospite; le proteine formate sono ad uso esclusivo del virus per il rivestimento (Figura 12) o per altre funzioni. Nel momento in cui sono state prodotte nuove subunità di acido nucleico virale e proteine virali, l'acido nucleico organizza le subunità proteiche attorno ad esso e i due vengono assemblati per formare la particella virale completa, ovvero il virione.

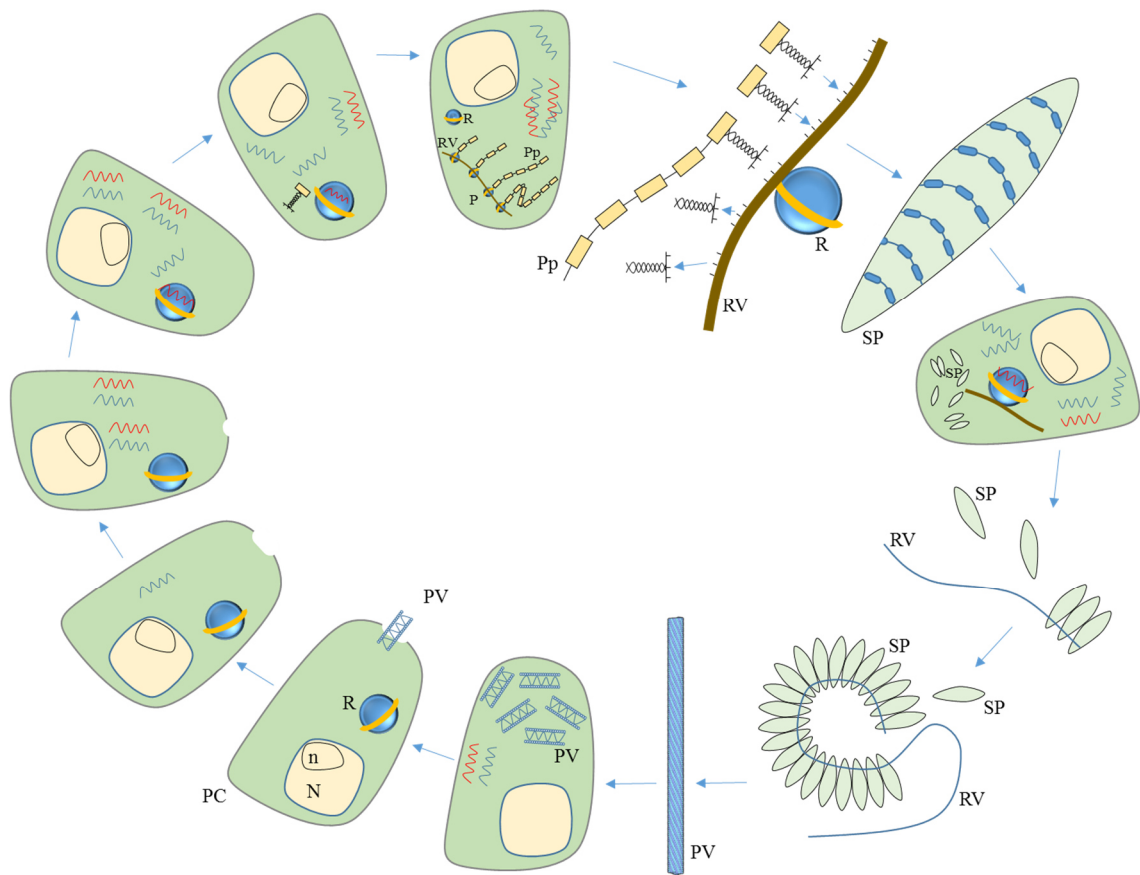


Figura 12 – Sequenza schematica di eventi nell’infezione virale e biosintesi (PV: particella virale; RV: RNA virale; SP: subunità proteiche; R: ribosomi; Pp: polipeptidi; P: poliribosomi; PC: parete cellulare; N: nucleo; n: nucleolo).

Il sito o siti della cellula in cui l’acido nucleico e il rivestimento proteico del virus vengono sintetizzati ed assemblati in virioni varia a seconda del genere o famiglia del virus stesso. Per la maggior parte dei virus a RNA, l’RNA virale, dopo essere stato liberato dal rivestimento proteico, si replica nel citoplasma, dove funge anche da RNA messaggero e, insieme ai ribosomi e l’RNA di trasferimento, sintetizza le subunità proteiche virali. Ne segue il successivo assemblaggio del virione, sempre nel citoplasma. In altri virus, ad esempio i virus con DNA a singolo filamento (ssDNA), la sintesi dell’acido nucleico virale e delle proteine, così come il loro assemblaggio in virioni, sembra aver luogo nel nucleo, dal quale le particelle virali vengono poi rilasciate nel citoplasma.

I primi virioni intatti compaiono nelle cellule vegetali circa 10 ore dopo l'inoculazione. Le particelle virali possono formare corpi di inclusione amorfi o cristallini (Figura 13) all'interno delle aree cellulari (citoplasma, nucleo) in cui si trovano.

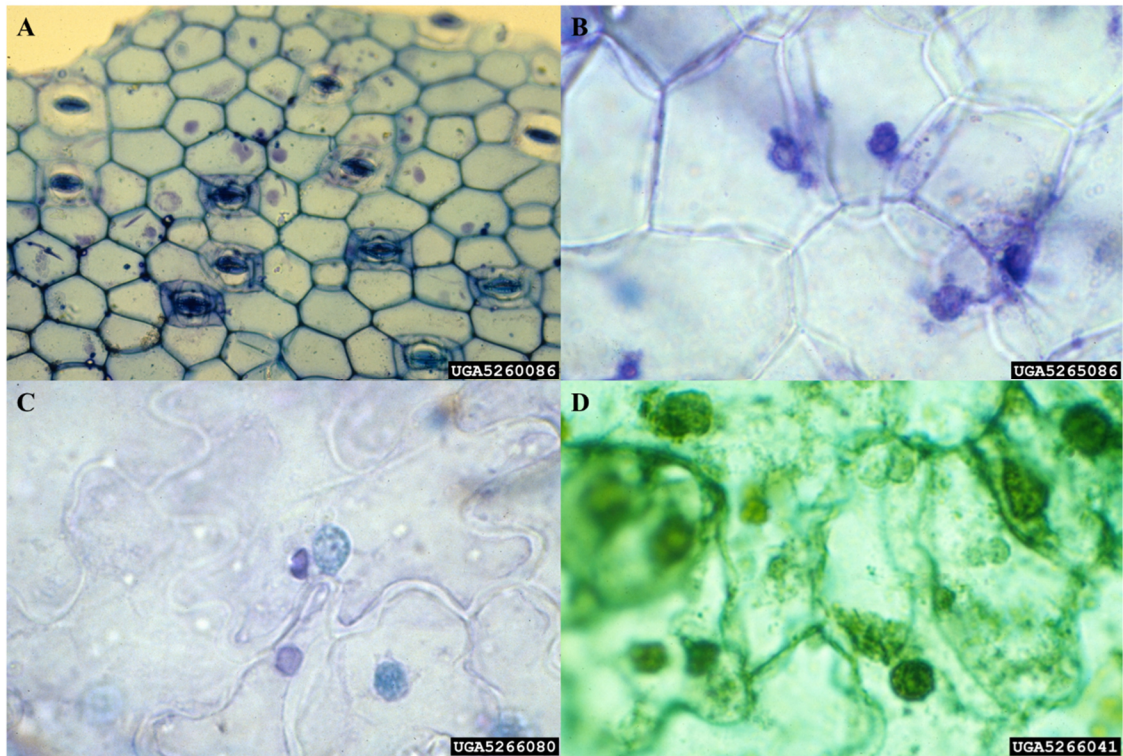


Figura 13 – Inclusioni cellulari prodotte dalle cellule vegetali in reazione ad infezioni causate da determinati virus. Le inclusioni sono specifiche per un virus, possono essere osservate mediante microscopio elettronico ed aiutano nell'identificazione, solitamente a livello di genere o famiglia. A: *Tobacco mosaic virus* – TMV; B: *Tomato spotted wilt virus* – TSWV; C: *Cucumber mosaic virus* – CMV; *Tobacco etch virus* – TEV (Florida Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, 2019).

1.6.4 SINTOMATOLOGIA

Per quanto concerne la sintomatologia causata da virus fitopatogeni, quasi tutte le malattie virali sembrano causare un certo grado di nanismo o arresto della crescita dell'intera pianta, con conseguente riduzione della resa totale. I fitovirus di solito riducono la durata del ciclo vitale delle piante infette, sebbene non sempre portano alla morte delle stesse.

I sintomi più evidenti delle piante infette da virus sono di solito quelli che compaiono sulle foglie, ma alcuni virus possono causare sintomi eclatanti sullo stelo, sul frutto e sulle radici.

In quasi tutte le malattie virali delle piante che si verificano in campo, il virus è presente in tutta la pianta (infezione sistemica) e induce la formazione di sintomi sistemici. Inoltre, alcuni virus sono in grado di superare le barriere fisiologiche presenti negli organi riproduttivi, causando la produzione di semi infetti. In molte piante inoculate artificialmente con determinati virus, il virus provoca la formazione di piccole lesioni clorotiche o necrotiche solo nei punti di entrata (infezioni locali), causando lesioni localizzate. Alcuni virus infettano le piante ospiti senza causare lo sviluppo di sintomi visibili su di esse (virus latenti). In altri casi, le piante che di solito sviluppano sintomi di infezione da un certo virus possono non mostrare temporaneamente alcuna sintomatologia in determinate condizioni ambientali, ad esempio in condizioni di alta o bassa temperatura. Infine, le piante possono mostrare sintomi acuti gravi subito dopo l'infezione che possono portare alla morte dei giovani germogli o dell'intera pianta; se l'ospite sopravvive alla fase iniziale di shock, i sintomi tendono a diventare più lievi (sintomi cronici) nelle fasi successive dello sviluppo della pianta, portando a un recupero parziale o addirittura totale. In alcune malattie, tuttavia, la gravità dei sintomi può aumentare progressivamente, provocando un declino lento o rapido della pianta (slow/quick decline).

I sintomi più comuni causati da infezioni sistemiche da virus sono il mosaico e gli spot ad anello. I mosaici sono caratterizzati da aree verde chiaro, gialle o bianche mescolate al verde normale delle foglie o dei frutti o di aree di colore più chiaro mescolate ad aree del normale colore di fiori o frutti. A seconda dell'intensità o del motivo delle decolorazioni, i sintomi di tipo a mosaico possono essere descritti come chiazze, striature, motivi ad anello, motivi a linee, velature, venature o chiazze clorotiche. Sono stati descritti un gran numero di altri sintomi virali meno comuni che includono arresto della crescita, nanismo, accartocciamento fogliare, ingiallimenti internervali, striature, enazioni, tumori, appiattimento e distorsione dello stelo.

1.6.5 TRASMISSIONE

La trasmissione dei fitovirus può avvenire secondo diverse modalità, ovvero mediante seme, polline, materiale di propagazione, contatto, attrezzi da lavoro, insetti, acari, nematodi, funghi e piante (cuscuto).

La trasmissione per seme può essere di tipo embrionale, nel caso in cui i virioni riescono a raggiungere l'embrione, oppure non embrionale nel caso in cui il virus risulta circoscritto al tegumento seminale o trattenuto sulla superficie esterna del seme. Quest'ultima presuppone, ovviamente, che il virus abbia la capacità di mantenersi infettivo per un lungo periodo di tempo su semi dissecati, per poi avviare il processo di infezione al momento della germinazione, con le giovani foglie cotiledonari. Per quanto riguarda la trasmissione mediante il polline, questo può agire come vettore del virus nel sacco embrionale e infettare, dunque, il seme, oppure, nel caso in cui avvenga la diffusione delle particelle virali trasportate dai granuli pollinici ai tessuti della pianta impollinata, può determinare la trasmissione diretta del virus da una pianta all'altra (Mink, 1993). I casi di trasmissione mediante polline infetto sono, tuttavia, limitati a poche combinazioni virus-ospite. L'impiego di organi vegetativi o porzioni di pianta infetta, dà origine, solitamente, a nuove piante virosate. Ciò è determinato dal fatto che il virus, una volta all'interno dell'ospite, è capace di diffondersi in tutti i suoi tessuti tramite le connessioni citoplasmatiche tra una cellula e l'altra. La trasmissione per contatto avviene attraverso microlesioni dei tessuti più superficiali dell'apparato epigeo o ipogeo della pianta. Nell'ambito di questa modalità si distinguono: trasmissione per contatto diretto di una pianta infetta con una sana, tramite microlesioni provocate dallo sfregamento stesso tra organi delle due piante; trasmissione per contatto indiretto, quando avviene per mezzo di ferite o lesioni provocate durante le operazioni colturali, ad esempio mediante attrezzi da lavoro contaminati. A livello radicale la trasmissione per contatto si realizza tramite lesioni alle giovani radici durante l'accrescimento, le quali possono acquisire quei virus le cui particelle virali persistono nel terreno. La trasmissione di un virus per mezzo di vettori avviene, invece, ad opera di organismi capaci di acquisire il virus da una pianta infetta, trattenerlo in forma infettiva all'interno del proprio corpo per un certo periodo di tempo e inocularlo, successivamente, ad altre piante ospiti. Possono fungere da vettori diverse specie di insetti o acari, ma anche nematodi, funghi e protozoi. Tra tutti gli organismi vettori di virus, gli insetti risultano

sicuramente quelli più importanti, per l'elevato numero e l'importanza delle malattie virali trasmesse. Nell'ambito di questi, inoltre, quelli che presentano una maggiore predisposizione alla trasmissione di fitovirus sono gli insetti con apparato boccale pungente-succhiante, appartenenti all'ordine dei *Rhynchota* (afidi in particolare, ma anche cicaline, aleurodidi e coccidi); vi sono, inoltre, altre specie di insetti vettori appartenenti agli ordini *Thysanoptera* (tripidi) e *Coleoptera*.

Dal punto di vista epidemiologico, la trasmissione mediante insetti vettori risulta essere la più importante e avviene attraverso quattro fasi principali:

1. Periodo di acquisizione: intervallo di tempo minimo affinché il virus sia acquisito dall'insetto durante l'alimentazione;
2. Periodo di latenza: tempo di incubazione utile affinché l'insetto virulifero sia in grado di trasmettere il virus ad una nuova pianta;
3. Periodo di inoculazione: tempo di alimentazione minimo necessario all'insetto virulifero affinché possa trasmettere il virus alla nuova pianta;
4. Periodo di infettività: intervallo di tempo tra l'acquisizione della capacità virulifera e la perdita della stessa.

Inoltre, in funzione della durata delle fasi appena descritte e del rapporto virus-vettore, vengono distinte tre modalità di trasmissione:

- **Non persistente**: l'acquisizione e l'inoculazione del virus si realizzano in pochi secondi (3-4), al massimo in pochi minuti, e non si ha una fase di latenza. La trasmissione può essere favorita dalla pratica del "probing" o assaggio operata dall'insetto, solitamente indotta da un periodo di digiuno di qualche ora prima dell'acquisizione; per tale tipo di trasmissione infatti è sufficiente la sola penetrazione degli stiletti, anche senza alimentazione propriamente detta. L'insetto rimane virulifero, cioè in grado di trasmettere il virus, per poche ore; inoltre, il virus non si moltiplica all'interno del corpo dell'insetto;
- **Persistente**: l'acquisizione e l'inoculazione si realizzano in intervalli di tempo molto lunghi e si riscontra un periodo di latenza. L'infettività varia da alcuni giorni a svariate settimane; si definisce "circolativa" quando il virus, giunto nel canale alimentare, supera le barriere e penetra nel corpo dell'insetto fino all'emocele e alle ghiandole salivari, da cui successivamente verrà inoculato con la saliva nei tessuti delle piante, "propagativa"

quando il virus è in grado di moltiplicarsi nel corpo del vettore, il quale risulterà al contempo infettivo ed infetto. Infine, nel caso di alcuni virus capaci di trasmettersi alla prole attraverso le uova, si parla di trasmissione “transovarica”;

- **Semipersistente:** si riscontrano caratteristiche intermedie tra le due precedentemente descritte. Non vi è fase di latenza e il virus non si localizza nell’emocele né nel sistema salivare; prolungando la durata dell’acquisizione aumenta anche la ritenzione di infettività. Si ritiene che le particelle virali si accumulino in modo extracellulare nella parte anteriore del canale alimentare, senza che avvenga alcuna replicazione e che vengano inoculati con il processo di ingestione-egestione tipico dei non persistenti. La capacità di infettare viene persa con la muta, la quale interessa anche la parte anteriore del canale alimentare.

1.7 CONTROLLO DELLE MALATTIE VIRALI

Dalle informazioni precedentemente descritte, le misure di controllo da applicare in presenza di malattie causate da virus si basano essenzialmente sulla attuazione di buone pratiche di prevenzione e/o contenimento, per tre motivi fondamentali:

- attualmente, non esistono prodotti antivirali in grado di curare le piante infette;
- i virus hanno differenti modalità di trasmissione e per tale motivo possono raggiungere con facilità i loro ospiti;
- evolvono con estrema facilità, grazie a fenomeni di mutazione, ricombinazione, riassortimento genetico e migrazione da o verso altre aree geografiche, riuscendo così ad infettare nuovi ospiti.

Per tale motivo, al fine di consentire una immediata applicazione delle misure adeguate di controllo della malattia, è essenziale effettuare una diagnosi precoce ed affidabile degli agenti eziologici virali (Sankaran *et al.*, 2010), soprattutto nei paesi in via di sviluppo, dove tali infezioni, nonostante si sospetti la presenza di un virus, non vengono mai identificate in modo soddisfacente, andando a inficiare gravemente la resa delle principali colture alimentari per l’agricoltura di sussistenza (Rybicki & Pietersen, 1999). Un’adeguato controllo dei patogeni virali delle piante può essere ottenuta mediante l’integrazione di diverse misure profilattiche, che possono variare in termini di efficienza, durata dell’efficacia e costi. Dato che la presenza dei virus e l’intensità delle malattie possono

variare di anno in anno dovrebbero essere presi in considerazione molti fattori per la gestione razionale ed economica delle malattie (Shtienberg, 2000). Per tale motivo, in un contesto di gestione integrata delle malattie (Integrated Pest Management – IPM), l'adozione di adeguate misure profilattiche, che si basano sull'impiego di materiale vegetale virus-esente, ottenuto mediante programmi di certificazione, permette di ostacolare la propagazione dei virus attraverso semi, piante e materiale di propagazione infetti (Riyaz & Kathiravan, 2019). La protezione crociata (cross-protection), basata sull'inoculazione di piante con isolati virali blandi, al fine di indurre resistenza e proteggerle da ulteriori infezioni di isolati più gravi, è una strategia utilizzata con successo in alcune colture orticole (Fulton, 1986). Altre misure di controllo delle malattie virali si basano sul controllo dei vettori mediante trattamenti chimici o controllo biologico, utilizzando predatori naturali del vettore; l'impiego di piante resistenti ottenute mediante programmi di miglioramento genetico o ingegneria genetica rappresenta uno dei metodi più efficaci per combattere le malattie virali.

Infine, in vivaio e in fase di coltivazione, vanno sempre applicate le principali norme igieniche, essenziali per ostacolare una possibile infezione virale e conseguente diffusione: utilizzare materiale di propagazione sano e certificato; utilizzare abbigliamento monouso da parte di tutto il personale dei vivai o, in alternativa, programmare una corretta disinfezione dell'abbigliamento normalmente utilizzato durante le operazioni colturali; in prossimità delle aree di coltivazione vanno posti tappetini con soluzione disinfettante; effettuare una corretta disinfezione degli strumenti di lavoro dopo ogni operazione colturale; controllare i semenzali con cadenza settimanale, al fine di rilevare tempestivamente la comparsa di eventuali sintomi; inviare piante con sintomi sospetti ad un laboratorio di diagnosi specializzato in malattie virali; nel caso in cui vengono rilevate piante infette, segnare la fila corrispondente ed estirpare da 3 a 6 piantine o l'intera fila su cui insistono le piante sintomatiche; il materiale infetto deve essere prontamente distrutto o trasportato in luoghi di stoccaggio lontani dalle aree di coltivazione; se possibile, disinfettare il substrato in cui erano messe a dimora le piante infette e l'impianto di fertirrigazione; quando possibile, mettere a dimora colture specifiche per interrompere il ciclo di trasmissione del virus.

CAPITOLO 2

SCOPO DEL LAVORO

CAPITOLO 2. SCOPO DEL LAVORO

Le malattie virali rappresentano una grande sfida per l'agricoltura del XXI secolo in tutto il mondo. Gli eventi a cui i nostri ecosistemi sono ormai soggetti da molti anni, come i cambiamenti climatici e la presenza sempre più massiccia della popolazione umana, stanno determinando rapide modifiche delle pratiche agricole e dei sistemi di coltivazione, che favoriscono l'insorgenza di epidemie distruttive causate da agenti eziologici di natura virale. I terreni agricoli si riducono, mentre la quantità di cibo richiesto sale sempre di più. Tali epidemie sono sorprendentemente evidenti nell'agricoltura di sussistenza nelle regioni con scarsa sicurezza dal punto di vista della gestione colturale (Jones & Naidu, 2019). La globalizzazione agricola e il commercio internazionale stanno diffondendo virus e i loro vettori in nuove regioni geografiche con conseguenze inattese per la produzione alimentare e gli ecosistemi naturali. A causa delle diverse caratteristiche epidemiologiche dei diversi patosistemi virali, non esiste un approccio unico per mitigare gli impatti negativi delle malattie virali su diversi sistemi di produzione. I progressi nella comprensione scientifica dei patosistemi virali, la rapida innovazione tecnologica, le strategie di comunicazione innovative e le reti scientifiche globali offrono numerose opportunità per costruire una conoscenza epidemiologica delle minacce virali per la produzione agricola e la sicurezza alimentare globale.

Tra le malattie delle piante, le infezioni virali rappresentano una delle principali minacce per l'agricoltura mondiale, principalmente quelle che colpiscono le colture orticole, poiché causano considerevoli perdite economiche, nel momento in cui l'agente eziologico non viene identificato e/o contenuto precocemente.

Le evoluzioni che si hanno nei virus delle piante, causate da eventi di mutazione, ricombinazione, riassortimento genetico e migrazione da o verso altre aree geografiche causano importanti cambiamenti sulle popolazioni degli stessi. Le diverse fonti di variazione genetica portano al coinvolgimento di vari fattori trainanti del cambiamento evolutivo (Jeger *et al.*, 2006), poiché tali eventi consentono ai virus di adattarsi rapidamente ai cambiamenti ambientali, sempre più frequenti. Per tale motivo, identificare precocemente un nuovo agente patogeno e comprenderne le dinamiche genetiche della popolazione risulta essere estremamente importante nello sviluppo della valutazione del rischio e delle strategie di intervento. È evidente quindi la necessità di sviluppare adeguate metodologie di diagnosi per

l'individuazione precoce delle malattie, al fine di adottare i migliori mezzi di lotta in un contesto di agricoltura sostenibile.

Nel contesto dell'orticoltura siciliana, in particolare per quanto concerne la coltivazione di pomodoro e zucchino, sono molte le problematiche che affliggono questo comparto produttivo. Le condizioni di monocoltura, i cicli brevi tipici delle colture ortive, la sovrapposizione degli stessi nel corso dell'anno, la presenza di insetti vettori, l'impiego di materiale di propagazione non certificato, il mancato utilizzo di varietà resistenti, nonché l'ingresso di patogeni alieni che sfuggono ai controlli fitosanitari, sono fattori cruciali che inevitabilmente favoriscono ed accelerano l'insorgenza e la diffusione di numerosi patogeni di natura virale. Inoltre, la libera circolazione delle merci tra i paesi del Bacino del Mediterraneo (area di libero scambio) e la globalizzazione del commercio internazionale rendono alquanto complicato il controllo delle merci e delle derrate alimentari e, di conseguenza, degli agenti patogeni potenzialmente presenti in essi, specie per quelli che vengono trasmessi per seme. Nei casi più gravi, si potrebbe arrivare ad un ridimensionamento della produzione e nel contempo delle superfici investite a tali colture.

L'identificazione di nuovi virus, lo studio dell'evoluzione genetica, dell'epidemiologia degli agenti virali e la messa a punto di tecniche di diagnosi rapida sono stati gli argomenti oggetto della presente tesi di dottorato. In particolare, sono stati studiati due sistemi modello, rappresentati dal *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) e dal *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV). Questi due virus, appartenenti rispettivamente al genere *Begomovirus* e *Tobamovirus*, stanno arrecando negli ultimi anni gravissimi danni al comparto orticolo siciliano, con ingenti perdite di produzione. I due sistemi modello trattati nella presente tesi sono stati scelti in base all'ospite principale, zucchino o pomodoro, ed in base al loro metodo di trasmissione, per insetto o per contatto, rispettivamente. Lo studio ed il confronto di questi due patogeni, unitamente alla messa a punto di sistemi di diagnosi rapida, di facile utilizzo, altamente specifica ed affidabile, permetterà di programmare con successo le operazioni mirate ad una difesa integrata per minimizzare i rischi legati alla diffusione di tali patogeni e le conseguenti perdite di produzione.

In tale contesto, per quanto concerne il sistema modello *Tomato leaf curl New Delhi virus*, è stata valutata la dispersione e la diversità genetica di ToLCNDV in Italia, dopo le epidemie riscontrate in diverse regioni nel 2015 e 2016 (Panno *et al.*, 2016; Luigi *et al.*, 2016; Bertin

et al., 2018); è stata inoltre effettuata un'analisi genetica al fine di migliorare la comprensione dell'evoluzione ed epidemiologia di ToLCNDV.

Infine, è stata messa a punto una tecnica di diagnosi rapida basata sulla tecnologia LAMP (Loop-mediated isothermal AMPLification) per il rilevamento rapido di tale patogeno.

Per quanto riguarda il sistema modello rappresentato da *Tomato brown rugose fruit virus*, la recente epidemia di questo patogeno, verificatasi in Sicilia a partire dall'autunno 2018 (Panno *et al.*, 2019b), dovuta probabilmente all'introduzione del virus nell'isola attraverso semi o frutti infetti e la loro successiva manipolazione, ha destato particolare preoccupazione nel settore orticolo. Tale problematica è stata inoltre aggravata dalla capacità di tale virus di superare il gene di resistenza *Tm-2²* delle cultivar di pomodoro. Lo studio del presente sistema modello ha quindi previsto lo studio epidemiologico del patogeno, la caratterizzazione biologica e molecolare dell'isolato virale presente in Sicilia e lo sviluppo di un metodo sensibile, specifico ed economico per la diagnosi.

CAPITOLO 3

CASO STUDIO *TOMATO LEAF CURL NEW DELHI VIRUS* (ToLCNDV)

Il lavoro di ricerca presentato in questo capitolo è stato incluso nella seguente pubblicazione:

Emergence of *Tomato leaf curl New Delhi virus* in Italy: estimation of incidence and genetic diversity
Panno S, Caruso AG, Troiano E, Luigi M, Manglli A, Vatrano T, Iacono G, Marchione S, Bertin S, Tomassoli L, Parrella G, Davino S, (2019). *Plant Pathology*, 68(3), 601-608.

CAPITOLO 3. CASO STUDIO *TOMATO LEAF CURL NEW DELHI VIRUS (ToLCNDV)*

3.1 INTRODUZIONE

Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) è un virus costituito da particelle di 18 x 30 nm aventi forma icosaedrica, uniti per un lato, che danno un aspetto geminato alle particelle virali (Figura 1).

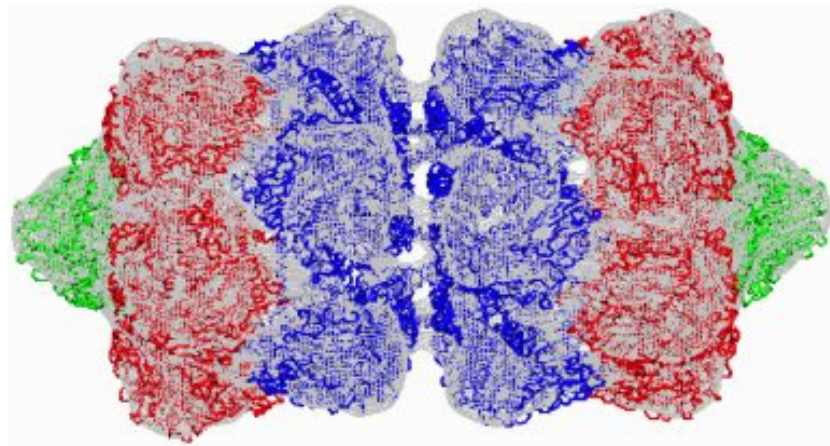


Figura 1 – Ricostruzione 3D della struttura geminata dei virus appartenenti alla famiglia *Geminiviridae* (Zhang *et al.*, 2001).

Appartenente alla famiglia *Geminiviridae* (dal latino “gemini” che vuol dire gemelli, doppi) e al genere *Begomovirus*, ToLCNDV è un tipico begomovirus bipartito il cui genoma è costituito da due componenti circolari di DNA a singolo filamento (ssDNA), denominati DNA-A e DNA-B (Padidam *et al.*, 1995) rispettivamente di 2,7 e 2,6 kb. Il DNA-A codifica tutte le informazioni per il rivestimento proteico e la replicazione virale, produce virioni e può replicarsi autonomamente (Rogers *et al.*, 1986).

Nello specifico, il DNA-A codifica per la proteina di rivestimento (Coat Protein, CP), la proteina associata alla replicazione (Replication-associated protein, Rep), la proteina “enhancer” (REn), la proteina attivatrice della trascrizione (Transcriptional Activator Protein, TrAP) e la proteina C4, implicata nel controllo del ciclo cellulare e nella soppressione della risposta dell’ospite. Il DNA-B, invece, codifica per la proteina di movimento (Movement Protein, MP) e la proteina di trasporto al nucleo (Nuclear Shuttle Protein, NSP) (Figura 2). I due componenti del genoma hanno ben distinte storie di evoluzione molecolare e presentano una spiccata sensibilità alle pressioni evolutive. Il genoma del DNA B nasce come un satellite ma si evolve fino a diventare una componente essenziale del genoma. Il DNA-B non può replicarsi in assenza del DNA-A, ma è necessario

per l'espressione dei sintomi, il movimento sistemico, la localizzazione nucleare e l'infezione sistemica (Sanderfoot & Lazarowitz, 1996). Una regione intergenica (Intergenic region – IR) è presente sia nel DNA-A che nel DNA-B e contiene una regione comune (Common Region – CR). La principale caratteristica della common region è una struttura a forcina con una sequenza nonanucleotidica conservata (TAATATT↓AC) che comprende l'origine della replicazione del filamento del virione (Origin of Replication – *ORI*, indicata da ↓) (Padidam *et al.*, 1995).

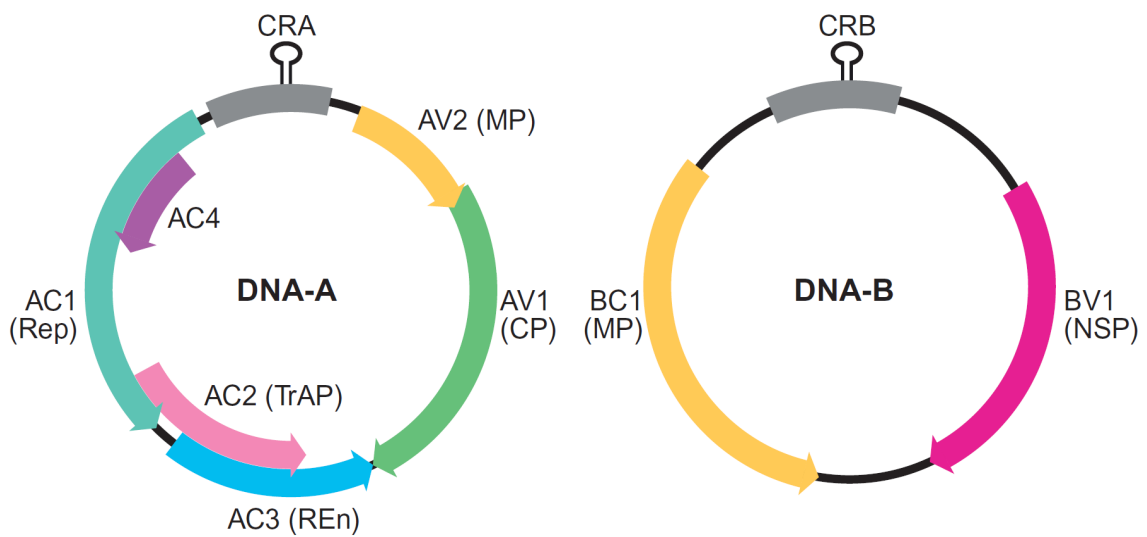


Figura 2 – Organizzazione genomica di un begomovirus bipartito. Le lettere A e B poste all'inizio o alla fine dell'acronimo di ciascuna proteina codificata si riferiscono rispettivamente al DNA-A e al DNA-B. CR = common region, nella quale le sequenze intergeniche con la struttura condivise dai due componenti genomici dei virus bipartiti sono contenute nel riquadro bianco (King *et al.*, 2011).

Per quanto concerne la diffusione mondiale, *Tomato leaf curl New Delhi virus*, originario dell'India, è stato recentemente rilevato nella Spagna sud-orientale (Murcia) (Juárez *et al.*, 2014), dove è stato responsabile di gravi epidemie nello zucchini, causando ingenti perdite economiche (López *et al.*, 2015). Inoltre, ToLCNDV è stato successivamente segnalato in Tunisia (Mnari-Hattab *et al.*, 2015) e in Italia (Panno *et al.*, 2016) (Figura 3). In Italia tale virus è stato riscontrato per la prima volta in agro di Marsala (Provincia di Trapani) nel mese di ottobre 2015 (Panno *et al.*, 2016) ed in poco tempo si è diffuso nelle province siciliane a maggiore vocazione orticola. A causa dei gravi danni causati su specie appartenenti alle famiglie *Cucurbitaceae* e *Solanaceae*, l'EPPO, nel giugno del 2015, ha inserito il *Tomato leaf curl New Delhi virus* nell'Alert List.

In Tabella 1 è riportata la lista dei Paesi, secondo gli ultimi dati riportati dalla EPPO, in cui è presente ToLCNDV.

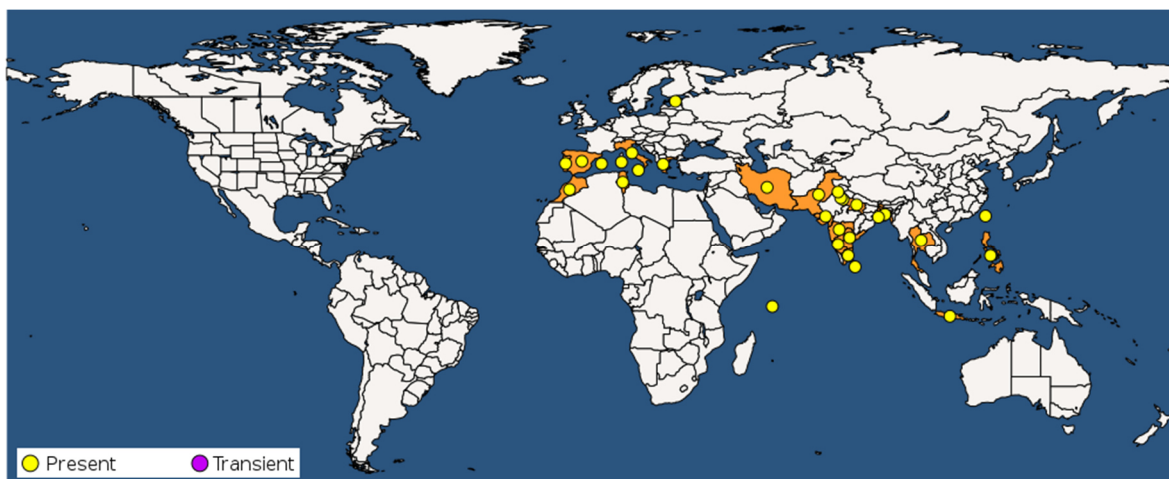


Figura 3 – Distribuzione geografica mondiale di *Tomato leaf curl New Delhi virus* (EPPO, 2019).

Tabella 1 – Paesi in cui è stato segnalato ToLCNDV e stato attuale della presenza del virus (EPPO, 2019).

Continente	Paese	Regione	Presenza del virus
Africa	Marocco	-	Presente, distribuzione limitata
	Seychelles	-	Presente
	Tunisia	-	Presente
Asia	Bangladesh	-	Presente
	India	Andhra Pradesh	Presente
		Delhi	Presente
		Gujarat	Presente
		Haryana	Presente
		Karnataka	Presente
		Maharashtra	Presente
		Punjab	Presente
		Tamil Nadu	Presente
		Uttar Pradesh	Presente
	Bengala occidentale	Presente	
	Indonesia	Java	Presente
	Iran	-	Presente
	Pakistan	-	Presente
Filippine	-	Presente	
Sri Lanka	-	Presente	
Taiwan	-	Presente	
Tailandia	-	Presente	
Europa	Estonia	-	Presente, distribuzione limitata
	Grecia	-	Presente, rinvenimenti limitati
	Italia	Sardegna	Presente
		Sicilia	Presente, distribuzione limitata
	Portogallo	-	Presente, rinvenimenti limitati
Spagna	Isole Baleari	Presente	

I sintomi di ToLCNDV possono variare da ingiallimento o maculatura fogliare, necrosi o mosaico sulle foglie, riduzione della superficie fogliare e arresto della crescita. Nello zucchini, ToLCNDV provoca gravi accartocciamenti delle foglie, rigonfiamento delle nervature sulle foglie giovani, accorciamento degli internodi, mosaico giallo nelle foglie giovani, rugosità della buccia dei frutti e dimensioni ridotte dei frutti (Panno *et al.*, 2016); tali sintomi determinano una riduzione della qualità e della commerciabilità dei frutti.

La trasmissione di ToLCNDV è entomofila: la specie che lo trasmette con maggiore efficienza è la mosca bianca degli orti, *Bemisia tabaci*, la quale trasmette i begomovirus in maniera persistente circolativa (Rosen *et al.*, 2015). Questo vettore è presente nelle regioni tropicali, subtropicali e nel bacino del Mediterraneo, ed è considerato una grave minaccia per le piante di importante rilevanza economica (Sharma & Prasad, 2017).

La trasmissione delle particelle virali, una volta acquisite durante l'alimentazione del vettore su piante infette, avviene mediante le punture di suzione della linfa, attraverso le quali l'insetto inserisce i suoi stilette nel floema. Tale attività può protrarsi per tutto il periodo vitale. Studi recenti hanno dimostrato che nelle cucurbitacee può trasmettersi anche meccanicamente (López *et al.*, 2015). Non è noto se il virus possa essere trasmesso anche per contatto o per seme.

3.2 MATERIALI E METODI

3.2.1 RACCOLTA MATERIALE VEGETALE

Un totale di 1.400 piante di zucchini, sintomatiche e non sintomatiche, sono state raccolte da diverse aree della Sicilia, Campania, Lazio, Sardegna e Calabria.

I campionamenti sono iniziati in Sicilia nel 2015 e sono stati estesi a Campania, Lazio e Sardegna nel 2016 e in Calabria alla fine del 2017. Le aree di campionamento selezionate in ciascuna regione sono state geo-referenziate mediante applicazione mobile Planthology (Davino *et al.*, 2017b) e ispezionate ogni anno. Per ogni area, sono stati raccolti 50 campioni da due diversi campi, secondo il seguente schema: su 100 filari di piante, ne sono stati selezionati 10 (uno ogni 10 filari). Quindi, su ciascun filare selezionato, è stato prelevato un campione ogni 10 piante, per un totale di cinque campioni per filare.

3.2.2 TRASMISSIONE MECCANICA E CARATTERIZZAZIONE PRELIMINARE DELLA GAMMA DEGLI OSPITI

Tre isolati di ToLCNDV, uno proveniente dalla Sicilia (SIC17RG), uno dalla Campania (CAMP16NA) e uno dal Lazio (LAZ16RO) sono stati inoculati meccanicamente in piante di *Cucurbita pepo*, *Cucumis melo inodorus*, *C. melo cantalupensis*, *Cucumis sativus*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum melongena* e *Capsicum annuum*. L'omogenato di ogni isolato è stato inoculato meccanicamente in tre piante per ospite. Le piante sono state poste in terreno sterilizzato all'interno di serre dotate di reti anti-insetto, con un fotoperiodo di 14 ore di luce ed una temperatura di 28/20 °C giorno/notte. I sintomi sono stati registrati settimanalmente per la caratterizzazione della gamma degli ospiti e la presenza di ToLCNDV è stata confermata mediante PCR.

3.2.3 STUDIO DELL'INCIDENZA DI ToLCNDV MEDIANTE REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI E SUCCESSIVO SEQUENZIAMENTO

Il DNA totale delle 1.400 piante di zucchini è stato estratto seguendo il metodo TLES modificato per l'estrazione del genoma dei geminivirus (Noris *et al.*, 1994) di seguito descritto:

- Omogeneizzare 100 mg di tessuto fogliare con azoto liquido in un mortaio, fino ad ottenere una polvere sottile;
- Aggiungere di 300 µl di buffer di estrazione TLES (50 mM TRIS pH 9 – 150 mM LiCl – 5 mM EDTA – 5 % SDS) al tessuto fogliare macinato, mescolando fino ad ottenere una soluzione uniforme;

- Effettuare due estrazioni con 300 µl fenolo–cloroformio (1:1 v/v), centrifugare a 12.000 rpm per 10 minuti e trasferire la fase acquosa in un nuovo tubo;
- Aggiungere 750 µl di etanolo freddo al 96 % e 15 µl di Na-acetato 4 M;
- Incubare per 1 ora a –80 °C;
- Centrifugare a 12.000 rpm per 30 minuti;
- Lavare il pellet contenente il DNA per due volte con etanolo al 70%;
- Risospendere il DNA in 100 µl di TE 1X.

Il DNA totale ottenuto è stato successivamente quantificato mediante spettrofotometro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Una nuova coppia di primer ToLCNDV-CP1 5'-CTCCAAGAGATTGAGAAGTCC-3' (nucleotidi 191–212; GenBank Acc. No. KF891468) e ToLCNDV-CP2 5'-TCTGGACGGGCTTACGCCCT-3' (nucleotidi 1220–1240; GenBank Acc. No. KF891468), in grado di amplificare l'intero gene AV1 che codifica per la proteina di rivestimento (coat protein – CP), è stata disegnata e utilizzata nei saggi PCR.

La miscela per la PCR è stata preparata in un volume finale di 25 µl, contenente 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs, 1 µM di primer forward, 1 µM di primer reverse, 0.08 mM KB extender buffer e 2 U Platinum *Taq* DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). È stata utilizzata una concentrazione di 10 ng/µl di DNA totale nella miscela di reazione. La PCR è stata effettuata in un termociclatore MultiGene OptiMax (Labnet International Inc.) ed ha previsto le seguenti condizioni: 94 °C per 3 min; 40 cicli da 94 °C per 50 s, 52 °C per 1 min e 72 °C per 2 min; un ciclo di elongazione finale a 72 °C per 10 min.

Dei campioni risultati positivi alla PCR ne sono stati selezionati 67 per le successive analisi filogenetiche. I prodotti di PCR dei campioni selezionati sono stati purificati mediante l'impiego del kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Germany), seguendo le indicazioni della ditta produttrice, di seguito descritte:

- Aggiungere 2 volumi di Buffer NTI al prodotto di PCR;
- Dispensare il campione su colonnina NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, centrifugare a 11.000 g per 30 secondi;
- Aggiungere 700 µl di Buffer NT3 e centrifugare a 11.000 g per 30 secondi;
- Centrifugare a 11.000 g per 1 minuto al fine di rimuovere completamente ogni traccia del Buffer NT3;
- Eluire il DNA aggiungendo 30 µl di Buffer NE; incubare a temperatura ambiente (18-25 °C) per 1 minuto e centrifugare a 11.000 g per 1 minuto.

I prodotti ottenuti sono stati sequenziati in entrambe le direzioni mediante sequenziatore ABI PRISM 3100 DNA (Applied Biosystems, CA, USA).

3.2.4 ANALISI DELLE SEQUENZE

Le analisi filogenetiche sono state condotte utilizzando le nuove sequenze nucleotidiche ottenute e le sequenze della coat protein di 38 isolati di ToLCNDV provenienti da diversi paesi, recuperate da GenBank. L'algoritmo CLUSTALW (Larkin *et al.*, 2007) è stato utilizzato per costruire un allineamento di sequenze nucleotidiche multiplo. È stato usato un modello matematico per stimare il numero di sostituzioni nucleotidiche, considerando le frequenze nucleotidiche e la variazione istantanea della frequenza (instantaneous rate change).

Il modello che si è adattato meglio al nostro studio è stato il Tamura–Nei TN93 (Tamura, 1992), utilizzando una distribuzione gamma discreta (+G) pari a 0.56 con cinque categorie di frequenza e ipotizzando che una certa frazione di siti fosse evolutivamente invariabile (+I).

Le relazioni filogenetiche sono state dedotte utilizzando il metodo Maximum Likelihood (ML) (Nei & Kumar, 2000), applicando un bootstrap di 1000 repliche al fine di calcolare statisticamente la significatività di ciascun nodo (Efron *et al.*, 1996). Gli alberi iniziali sono stati ottenuti automaticamente applicando gli algoritmi neighbour-joining e BIONJ mediante l'approccio della massima probabilità composta (maximum composite likelihood - MCL) riferito ad un sistema semplice a matrice di distanza a coppie per selezionare, infine, il più alto valore di verosimiglianza. Tutte le analisi sono state eseguite mediante il programma MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Per studiare la presenza di eventi di ricombinazione tra le sequenze nucleotidiche degli isolati italiani, sono stati utilizzati gli algoritmi GENECONV, BOOTSCAN, MAXCHI, SISCAN, 3SEQ, LARD e RDP all'interno del programma RDP4 (Martin *et al.*, 2017).

I metodi RDP, GENECONV, MAXCHI, e 3SEQ vengono automaticamente utilizzati per controllare i segnali di ricombinazione rilevati da tutti gli altri metodi, indipendentemente dal fatto che siano selezionati o meno. Il metodo LARD può essere utilizzato solo per controllare i segnali rilevati con altri metodi e deve essere selezionato solo se i set di dati sono molto piccoli (<20 sequenze). Per impostazione predefinita, l'algoritmo SISCAN viene utilizzato per controllare automaticamente i segnali di ricombinazione rilevati con tutti gli altri metodi (ovvero, viene utilizzato per scansioni di ricombinazione secondarie o di conferma) ma non viene utilizzato per analizzare eventuali nuovi segnali di ricombinazione.

È importante sottolineare che, mentre i metodi RDP, GENECONV e MAXCHI esaminano solo posizioni nucleotidiche variabili in triplette di sequenze campionate dall'allineamento, i metodi SISCAN e LARD esaminano tutte le posizioni variabili e conservate. Sebbene il metodo MAXCHI abbia una potenza complessiva maggiore rispetto agli altri metodi per rilevare la presenza di eventi di ricombinazione (ovvero se sono presenti o meno i "recombination breakpoints"), i metodi migliori per individuare con precisione le posizioni dei recombination breakpoints sono BOOTSCAN, 3SEQ e MAXCHI. I breakpoints si verificano molto spesso in coppia e quando le sequenze analizzate sono circolari vengono sempre accoppiate. Le matrici MAXCHI e LARD possono essere utilizzate per identificare le posizioni di tali punti di interruzione associati e visualizzare graficamente i relativi supporti statistici. L'interpretazione delle matrici MAXCHI e LARD è relativamente semplice in quanto le coppie di breakpoint più probabili (anche se non necessariamente corrette) corrispondono a celle di matrice che hanno i migliori p-values (Martin *et al.*, 2017). Solo i risultati concordanti tra i diversi algoritmi sono stati considerati come un risultato positivo. La diversità delle sequenze nucleotidiche del gene ToLCNDV-AV1 è stata stimata all'interno della popolazione italiana e tra paesi diversi, utilizzando per questo esperimento 114 sequenze recuperate da GenBank, le quali sono state considerate come popolazioni geografiche, applicando il modello Jukes-Cantor (Jukes & Cantor, 1969). La differenziazione genetica tra le popolazioni è stata valutata mediante tre test statistici basati sulla permutazione: K_S^* , Z^* e S_{nn} (Hudson, 2000).

Il test statistico S_{nn} è una misura della frequenza con cui le sequenze più vicine fra loro (nearest neighbor) si trovano nella stessa località. Se una popolazione è fortemente strutturata, ci si aspetta di trovare una sequenza molto vicina ad un'altra sequenza nella stessa località. Pertanto, ci si aspetta che S_{nn} sia vicino al valore 1 quando le popolazioni delle due località sono altamente differenziate e quasi la metà quando le popolazioni delle due località fanno parte della stessa popolazione panmittica (e le dimensioni dei campioni delle due località sono uguali). Al fine di valutare se S_{nn} è significativamente grande per un particolare campione (indicando che le popolazioni nelle due località sono differenziate), viene applicato il solito schema di permutazione per stimare un p-value. In dettaglio, una permutazione consiste nel riassegnare casualmente sequenze ad una località, in modo che il numero di sequenze da ciascuna località sia sempre lo stesso del campione originale. La proporzione di campioni permutati con S_{nn} maggiore o uguale al valore osservato è il valore P stimato.

Per valutare la potenza del test statistico di permutazione S_{nn} al fine di rilevare la differenziazione geografica, sono stati impiegati due ulteriori modelli riportati da Hudson e collaboratori (1992). I test statistici basati sulla permutazione K_S^* e Z^* possono essere applicati per rilevare la differenziazione genetica di sottopopolazioni in diverse località e possono rilevare la differenziazione secondo un modello a isola “Wright-Fisher” selettivamente neutro. La potenza dei test dipende dalle dimensioni del campione e dai tassi di mutazione, migrazione e ricombinazione. Per tassi di mutazione elevati o campioni di piccole dimensioni, le statistiche basate sulla sequenza sono più potenti. Per tassi di mutazione bassi o campioni di grandi dimensioni, i test basati sulle frequenze degli aplotipi risultano essere più potenti (Hudson *et al.*, 1992).

Valutata la differenziazione genetica tra le popolazioni, è stato calcolato successivamente il tasso di flusso genico della popolazione virale adattando l'indice statistico F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984). È importante notare che i virus sono aploidi e, per tale motivo, al fine di calcolare la frequenza allelica, ogni sequenza è stata codificata come aploide raddoppiata. Tali test sono stati eseguiti mediante programma DNASP v. 5.0 (Librado & Rozas, 2009). Successivamente è stato studiato il ruolo della selezione naturale degli isolati italiani valutando il tasso di sostituzione nucleotidica dei sinonimi (dS) e non sinonimi (dN). Questi valori sono stati stimati con il metodo Pamilo–Bianchi–Li (Pamilo & Bianchi, 1993) mediante il programma MEGA7. Per ultimo, la selezione in singoli siti di codoni è stata valutata statisticamente utilizzando i metodi “fixed effects likelihood” (FEL) e “single likelihood ancestor counting” (SLAC) disponibili sul server Datamonkey (<http://www.datamonkey.org>) (Kosakovsky Pond & Frost, 2005). In quest'ultimo caso sono stati considerati solo i risultati concordanti ottenuti attraverso entrambi i metodi.

3.2.5 MESSA A PUNTO DI UNA TECNICA LAMP (LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION) PER IL RILEVAMENTO RAPIDO DI TOLCNDV

La LAMP (Loop-mediated isothermal AMPLification) è una tecnica di diagnosi molecolare rapida, sensibile e a basso costo, basata sull'analisi qualitativa e quantitativa degli acidi nucleici; non necessita di strumentazioni sofisticate e di personale specializzato ed il suo utilizzo è possibile al di fuori dei laboratori diagnostici (Francois *et al.*, 2011). Tale tecnica permette quindi di abbattere in maniera significativa i lunghi tempi richiesti dai tradizionali metodi molecolari, di ottenere risultati affidabili in tempi molto più rapidi ed individuare, in maniera precoce, la presenza del patogeno all'interno delle piante ospiti.

L'amplificazione e il rilevamento di specifiche sequenze di DNA avvengono in un singolo step, ad una temperatura costante di 65 °C. Il principio di funzionamento della LAMP si basa sull'utilizzo di un enzima termostabile, la *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*) polimerasi, che ha la funzione di sintetizzare i nuovi filamenti di DNA, e un set di 4/6 primer appositamente disegnati, che ibridano in diverse regioni specifiche del DNA stampo. La *Bst* polimerasi, che funziona a temperatura costante (65 °C), oltre a sintetizzare il nuovo filamento di DNA, dissocia i legami ad idrogeno che tengono uniti i due filamenti del DNA stampo (attività di "strand displacement"); questo fa sì che la denaturazione del filamento possa avvenire indipendentemente dalle alte temperature e il DNA possa essere sintetizzato a temperatura costante, senza l'influenza della struttura secondaria del DNA stesso (Notomi *et al.*, 2000). Le coppie di primer indispensabili per il processo di amplificazione della LAMP, che riconoscono 6 regioni del DNA (regioni F3c, F2c e F1c in direzione 3' e regioni B1, B2 e B3 in direzione 5') sono:

- primer FIP (Forward Inner Primer) e BIP (Backward Inner Primer), ognuno dei quali presenta due diverse porzioni, che saranno complementari alle regioni del DNA target; infatti, i primer progettati per il funzionamento della LAMP;
- primer F3 (Forward Outer Primer) e B3 (Backward Outer Primer), disegnati sulla base delle regioni F3 e B3.

Inoltre, al fine di aumentare la velocità di amplificazione e la sensibilità della LAMP, è possibile aggiungere alla miscela di reazione una ulteriore coppia di primer (LF – Loop Forward Primer, LB – Loop Backward Primer, in quanto permette di creare nuovi siti di attacco per la *Bst* polimerasi (Notomi *et al.*, 2000) (Figura 4).

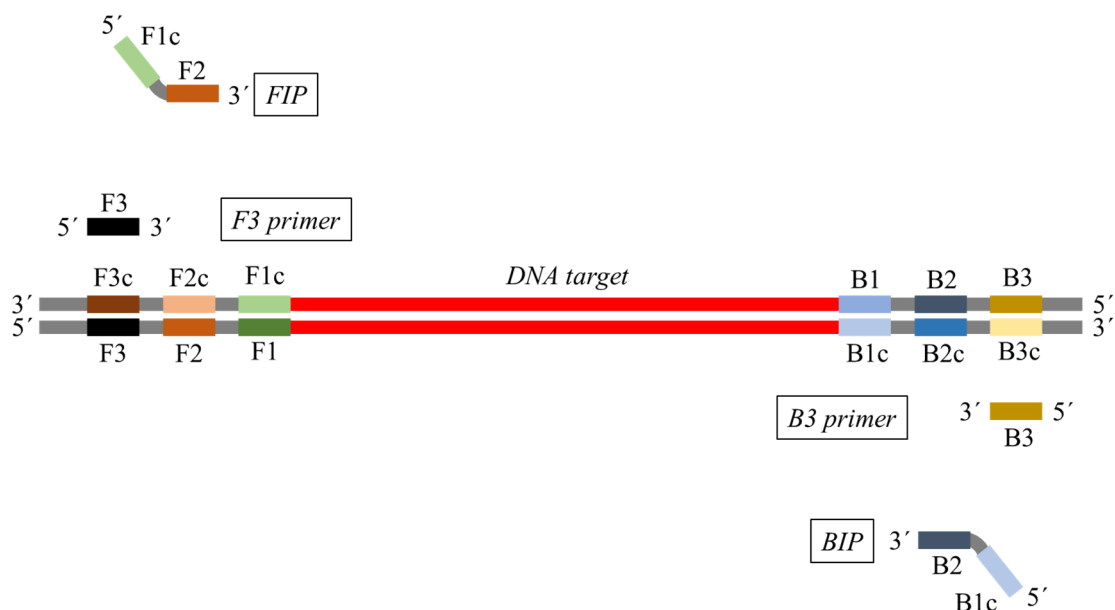


Figura 4 – Disposizione dei primer lungo la doppia elica del DNA.

3.2.6 CLONAGGIO E SEQUENZIAMENTO

Dieci prodotti di PCR (due per ogni regione analizzata) dei 67 prodotti ottenuti e sequenziati precedentemente sono stati purificati mediante kit UltraClean® PCR Clean-Up (Mo-Bio Laboratories inc., USA), secondo le seguenti indicazioni della casa costruttrice:

- Aggiungere 3 volumi di ULTRASALT buffer nel tubo contenente il prodotto di PCR;
- Incubare a 55 °C per 5 minuti;
- Aggiungere 6 µl di resina ULTRABIND (il DNA si legherà con la resina);
- Centrifugare a 11.000 g per 30 secondi;
- Risospendere il pellet in 1 ml di buffer ULTRAWASH addizionato con etanolo;
- Centrifugare a 11.000 g per 5 secondi;
- Risospendere il pellet in 12 µl di H₂O per l'eluizione;
- Centrifugare a 11.000 g per 1 minuto;
- Prelevare velocemente il surnatante contenente il DNA.

I prodotti di PCR purificati sono stati successivamente clonati utilizzando il plasmide pGEM®-T (Promega Corporation, WI, USA), linearizzato e timidilato, seguendo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. Il plasmide utilizzato presenta delle terminazioni poli-T; la presenza di tali terminazioni limitano eventuali problemi che possono insorgere durante la fase di ligazione e permettono di sfruttare al massimo le terminazioni poli-A tipiche dei prodotti di PCR ottenuti mediante l'utilizzo di *Taq* polimerasi.

In dettaglio, il protocollo per il clonaggio ha previsto l'impiego del plasmide pGEM®-T e 2X Rapid Ligation Buffer. La reazione di ligazione (Tabella 2) è stata posta in tubi da 0,2 ml ed incubata overnight ad una temperatura di 4 °C.

Tabella 2 – Mix di ligazione.

Componenti di reazione	Reazione standard	Controllo positivo	Controllo negativo
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM®-T	1 µl	1 µl	1 µl
Prodotto di PCR	3 µl	-	-
Control Insert DNA	-	2 µl	-
T4 DNA Ligase (3 U/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
H ₂ O	-	1 µl	3 µl
Volume finale	10 µl	10 µl	10 µl

Dopo la ligazione, la trasformazione è stata effettuata mediante l'utilizzo di cellule competenti ad alta efficienza di *Escherichia coli*, ceppo DH5α, al fine di ottenere un numero ragionevole di colonie. Il protocollo di trasformazione ha previsto le seguenti fasi:

- Preparazione di piastre con LB-agar, ampicillina e 40 µl di X-Gal per ogni reazione di ligazione e per determinare l'efficienza di trasformazione;
- 2 µl di ogni reazione di ligazione sono state aliquotate in di un tubo sterile da 1,5 ml in ghiaccio; al fine di determinare l'efficienza di trasformazione delle cellule competenti sono stati trasferiti in un altro tubo 0,1 ng di plasmide non tagliato;
- 50 µl di cellule competenti sono stati trasferiti in ogni tubo con i prodotti di ligazione;
- i tubi sono stati posti ad incubare per 20 minuti in ghiaccio;
- a seguito di shock termico (45-50 secondi a 42°C e successivamente in ghiaccio per 2 minuti) i prodotti di ligazione sono stati trasferiti all'interno delle cellule competenti;
- le cellule ottenute sono state incubate in LB (Luria Broth) e poste in agitazione per 1 ora a 37 °C;
- terminata l'incubazione, le colture liquide sono state trasferite in piastre contenenti LB-agar, nelle quali, precedentemente, era stata aggiunta ampicillina e 40 µl di X-Gal;
- le piastre ottenute sono state incubate a 37 °C per 16 ore.

Le colonie bianche generalmente contengono gli inserti; tuttavia, gli inserti possono anche essere presenti nelle colonie blu. Di tutte le colonie cresciute contenenti l'amplicone atteso,

10 sono state sottoposte a successiva colony-PCR. Una volta confermata la presenza dell'insero di interesse (1050 nt), le colonie sono state poste in LB ed incubate a 37 °C in agitazione per circa 12 ore. Il DNA plasmidico è stato estratto e successivamente quantificato mediante spettrofotometro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Diluizioni decimali seriali sono state preparate a partire da una concentrazione iniziale pari a circa 200 ng/μl fino a $2,0 \times 10^{-10}$ ng/μl. Tali diluizioni sono state impiegate al fine di valutare il limite di rilevamento del nuovo protocollo LAMP.

Le sequenze degli inserti ottenuti sono state verificate in entrambe le direzioni mediante sequenziatore ABI PRISM 3100 DNA (Applied Biosystems, CA, USA).

Le sequenze ottenute sono state in un primo momento confrontate tra di loro attraverso l'algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) al fine di individuare il massimo grado di similarità. Successivamente tali sequenze sono state confrontate con sequenze note e già depositate in GenBank. Al fine di verificare la presenza di zone conservate, è stato eseguito un multi download delle sequenze più simili in formato FASTA. Gli allineamenti di sequenze nucleotidiche sono stati eseguiti mediante il programma CLUSTALW versione 2.0 (Larkin *et al.*, 2007).

3.2.7 DISEGNO PRIMER LAMP E PROTOCOLLO DI AMPLIFICAZIONE

Il set di primer necessario per la reazione LAMP è stato disegnato sul gene AV1 che codifica per la proteina di rivestimento, precedentemente clonato e sequenziato. Per il disegno del set di primer è stato utilizzato il software Primer Explorer V5, disponibile online all'indirizzo web <http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html> il quale, mediante interfaccia grafica, permette di caricare online la sequenza di DNA target ed impostare diversi parametri per il disegno dei primer. I cinque parametri chiave per il corretto disegno dei primer LAMP sono: temperatura di melting (T_m), stabilità delle estremità 3' e 5' di ogni primer, contenuto di GC (Guanina – Citosina), struttura secondaria e distanza tra i primer. Una volta caricata nel programma la sequenza bersaglio ed impostati i parametri termodinamici specifici, il software ha generato automaticamente diversi set di primer. È stato quindi selezionato il set che rispettava al meglio i parametri termodinamici richiesti nella tecnica LAMP. Poiché l'ibridazione dei primer al DNA bersaglio nella fase iniziale è fondamentale per l'efficienza della reazione LAMP, le sequenze e le dimensioni dei primer sono stati scelti in modo tale che le loro temperature di melting (T_m) oscillassero tra 60-65 °C, valori di temperatura ottimali per la *Bst* polimerasi.

Per la messa a punto della tecnica LAMP e al fine di verificare il funzionamento del set di primer ottenuti nel presente lavoro e il limite di rilevamento della tecnica, nella prova sono stati impiegati i plasmidi (p#SIC1, p#SIC2, p#CAM1, p#CAM2, p#LAZ1, p#LAZ2, p#SAR1, p#SAR2, p#CAL1, p#CAL2) in concentrazione tal quale e le relative diluizioni decimali seriali, fino a raggiungere una concentrazione pari a 2.0×10^{-10} ng/ μ l. Una volta verificato il corretto funzionamento e l'affidabilità, sono stati utilizzati per i successivi test LAMP il DNA totale estratto da campioni positivi a ToLCNDV precedentemente analizzati mediante PCR end point (SIC1, SIC2, CAM1, CAM2, LAZ1, LAZ2, SAR1, SAR2, CAL1, CAL2), dai quali erano stati ottenuti i plasmidi, seguendo il metodo TLES modificato per l'estrazione del genoma dei geminivirus (Noris *et al.*, 1994), descritto precedentemente. Al fine di valutare la resistenza della tecnica LAMP in presenza di sostanze che possono fungere da inibitori della reazione, gli stessi campioni positivi sono stati successivamente testati secondo la seguente procedura: da ogni campione è stata prelevata una porzione di foglia di ~4 mm di diametro e posta all'interno di un tubo sterile da 2 ml contenente 250 μ l di Glycine Buffer (1 M EDTA; 0.05 M NaCl; 0.1 M glicina) e successivamente incubati a 100 °C per 10 minuti prima di essere caricati nella mix di reazione.

Ciascuna reazione è stata eseguita in un termociclatore real time Rotor-Gene Q 2plex HRM Platform (Qiagen, Hilden, Germany). La miscela dei primer (primer mix) LAMP è stata preparata in un volume finale di 100 μ l, così costituita: 16 μ l di primer FIP [100 mM], 16 μ l di primer BIP [100 mM], 4 μ l di primer LF [100 mM], 4 μ l di primer LB [100 mM], 2 μ l di primer F3 [100 mM], 2 μ l di primer B3 [100 mM] e 56 μ l di H₂O sterile.

La miscela di reazione LAMP è stata preparata in un volume finale di 12 μ l, così composta: 3 μ l di DNA totale/3 μ l di estratto grezzo/1 μ l di plasmide, 6,25 μ l di WarmStart LAMP 2X Master Mix (New England Biolabs Inc., MA, USA), 1,25 μ l di primer mix, 0,25 μ l Fluorescent dye (50X).

Il protocollo di reazione LAMP ha previsto 20 cicli ad una temperatura costante di 65 °C per 3 minuti. A seguire, al fine di ottenere le curve di dissociazione per ogni singolo campione testato, è stato impostato il seguente protocollo: uno step a 95 °C per 60 secondi, uno step a 40 °C per 60 secondi, uno step a 70 °C per 60 secondi, seguito da un incremento di temperatura da 70 a 95 °C con step di incremento di 0,5 °C. L'esito della reazione è stato valutato in funzione della fluorescenza emessa dalla molecola intercalante (Fluorescent Dye) inserita nella miscela, misurando la fluorescenza delle molecole di DNA alla fine di ogni ciclo da 3 minuti.

3.3 RISULTATI

3.3.1 TRASMISSIONE MECCANICA E CARATTERIZZAZIONE PRELIMINARE DELLA GAMMA DEGLI OSPITI

Mediante inoculazione meccanica gli isolati SIC17RG, CAMP16NA e LAZ16RO sono stati trasmessi con successo a *C. pepo*, *C. melo inodorus* e *C. melo cantalupensis* (Tabella 3). Tutti gli isolati hanno indotto sintomi correlati a ToLCNDV, come accartocciamento fogliare ed ingiallimento internervale nelle foglie giovani. Nessuno degli isolati di ToLCNDV testato è stato trasmesso meccanicamente a *C. sativus*, *S. lycopersicum*, *S. melongena* e *C. annuum*.

3.3.2 STUDIO DELL'INCIDENZA DI ToLCNDV MEDIANTE REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI E SUCCESSIVO SEQUENZIAMENTO

Un totale di 485 su 1.400 campioni di zucchino (34,7%) raccolti nelle diverse regioni italiane (Sicilia, Campania, Lazio, Sardegna e Calabria) dal 2015 al 2017 è risultato positivo a ToLCNDV (Tabella 4) mediante PCR con la coppia di primer ToLCNDV-CP1/ToLCNDV-CP2, che ha amplificato il frammento atteso di 1050 pb. Tale frammento comprende l'intero gene AV1 o CP (Coat Protein). Le sequenze ottenute sono state tagliate per rimuovere i nucleotidi esterni, lasciando solo il tratto di 771 nt corrispondente all'intero gene AV1. Le sequenze sono state successivamente depositate in GenBank con i numeri di accessione da MH475370 a MH475436. In dettaglio, dal 2015 al 2017, sono stati rinvenuti 307 campioni positivi provenienti dalle aree di campionamento in Sicilia, 77 dalla Campania, 51 dal Lazio, 38 dalla Sardegna e 12 dalla Calabria. Dei 485 campioni positivi, 67 ampliconi sono stati selezionati per il sequenziamento (33 provenienti dalla Sicilia, 18 dalla Campania, 12 dal Lazio, 2 dalla Sardegna e 2 dalla Calabria). In particolare, in Sicilia la dispersione del patogeno ha mostrato una tendenza al rialzo dall'11% nel 2015, al 47% nel 2016 e al 65% nel 2017. In Sardegna, dal 2016 al 2017 il virus si è mosso dalla provincia di Cagliari, luogo del primo rinvenimento nell'isola, alla provincia settentrionale di Oristano; nel Lazio il tasso di incidenza è apparso costante, nel biennio 2016-2017; infine, in Campania, l'incidenza ha mostrato un aumento moderato ma costante nel tempo, mentre in Calabria, è stato riscontrato il primo focolaio di ToLCNDV alla fine del 2017 (Tabella 4).

Tabella 3 – Gamma di ospiti di tre differenti isolati di *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) su specie diverse.

Isolati	Piante ospiti (infette/inoculate)								WPI
	<i>Cucurbita pepo</i>	<i>Cucumis melo inodorus</i>	<i>Cucumis melo cretatus</i>	<i>Cucumis sativus</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Solanum melongena</i>	<i>Capsicum annuum</i>		
SIC17RG	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	I
	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	II
	3/3	2/3	3/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	II
	3/3	2/3	3/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	IV
CAMP16NA	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	I
	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	II
	3/3	2/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	III
	3/3	2/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	IV
LAZI16RO	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	I
	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	II
	3/3	1/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	III
	3/3	1/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	IV

^aWPI, weeks post-inoculation

Tabella 4 – Incidenza di piante di pomodoro infette da *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) rilevate mediante PCR, per ogni anno di indagine in ciascuna area ispezionata, e numero di campioni utilizzati per le analisi molecolari per ciascuna regione italiana oggetto di indagine.

Regione	Area o Città	Anno					
		Incidenza (%) ^a			Numero campioni utilizzati per le analisi molecolari		
		2015	2016	2017	2015	2016	2017
Sicilia	Agrigento	0	78	84	0	3	3
	Catania	0	14	54	0	3	3
	Ragusa	0	38	60	0	3	3
	Siracusa	0	28	44	0	3	3
	Trapani	54	78	84	3	3	3
	Subtotale	11	47	65	3	15	15
Campania	Napoli	N.A.	36	38	0	8	3
	Caserta	N.A.	40	40	0	4	3
	Subtotale	N.A.	38	39	0	12	6
Lazio	Terracina	N.A.	26	26	0	7	0
	Fondi	N.A.	14	14	0	3	0
	Sabaudia	N.A.	10	10	0	2	0
	Subtotale	N.A.	17	17	0	12	0
Sardegna	Cagliari	N.A.	42	34	0	2	0
	Subtotale	N.A.	42	34	0	2	0
Calabria	Catanzaro	N.A.	N.A.	24	0	0	2
	Subtotale	N.A.	N.A.	24	0	0	2
ITALIA	TOTALE	–	–	43	3	41	23

N.A., dati non disponibili

^a50 campioni raccolti ogni anno da ogni area

3.3.3 ANALISI DELLE SEQUENZE

Sono state condotte le analisi molecolari sul gene AV1 su 68 isolati ToLCNDV italiani (67 ottenuti in questo lavoro ed un isolato già depositato in GenBank nel 2016 (Acc. No. KX826050)). Per quanto concerne le sequenze degli isolati ToLCNDV italiani, dall'analisi effettuata mediante il programma RDP3, non sono stati rilevati eventi di ricombinazione, confermando che il poco tempo intercorso tra il primo outbreak e la veloce dispersione non ha consentito l'instaurarsi di eventi di ricombinazione significativi dal punto di vista evolutivo. Le relazioni evolutive tra le sequenze di ToLCNDV utilizzate nel presente studio, rappresentate dall'albero filogenetico in Figura 5, hanno mostrato che gli isolati di ToLCNDV sono separati in due cluster statisticamente significativi: il primo composto solo da isolati del Bacino del Mediterraneo, mostrandone bassa variabilità, ed il secondo composto da isolati del continente asiatico, con una variabilità più alta.

Gli isolati italiani sono stati raggruppati in due clade: un clade, con una confidenza di bootstrap (bootstrap confidence) del 91% (sottogruppo I) comprendente gli isolati delle regioni Lazio e Campania, e un clade, con una confidenza di bootstrap (bootstrap confidence) del 54% (sottogruppo II) costituito da isolati provenienti da Sicilia, Calabria e Sardegna insieme a isolati provenienti da Spagna, Tunisia e Marocco. L'analisi della diversità nucleotidica tra i diversi paesi del Mediterraneo ha mostrato una bassissima differenziazione tra Italia e gruppi della Spagna e della Tunisia, mentre per il Marocco era impossibile calcolare la diversità nucleotidica poiché era disponibile solo una sequenza. È interessante notare che questa unica sequenza, da un punto di vista filogenetico, non è divergente dalle altre popolazioni mediterranee di ToLCNDV, mentre è stata osservata una differenza maggiore tra gli isolati del Bacino del Mediterraneo e gli altri gruppi asiatici (Tabella 5). L'analisi all'interno dei singoli gruppi ha messo in evidenza una differenziazione molto bassa nei gruppi italiani, spagnoli e tunisini, suggerendo un'origine comune, mentre un certo livello di differenziazione sembra essersi sviluppato nei paesi del continente asiatico. La differenziazione genetica tra gruppi del Bacino del Mediterraneo e gruppi asiatici è stata significativa ($P \leq 0.05$) mediante tutti i test K_S^* , Z^* e S_{nn} (dati non mostrati). Per valutare il livello di flusso genico (gene flow level) tra le diverse popolazioni, è stato calcolato il valore statistico F_{ST} ; questo parametro è stato generalmente utilizzato per valutare il "tasso di migrazione" a livello genetico tra popolazioni diverse. Quando due popolazioni hanno un valore vicino allo zero significa che hanno una distribuzione simile di varianti di sequenza, mentre quando il valore è prossimo a uno, indica una separazione totale e nessuna "migrazione" è in corso tra le due popolazioni. In tal senso, i risultati indicano

chiaramente un elevato flusso genico tra Spagna, Italia e Tunisia (e probabilmente il Marocco; tuttavia, nessun test statistico supporta questa ipotesi poiché è disponibile solo una sequenza proveniente da questo paese) e la separazione tra queste popolazioni e le popolazioni asiatiche (Tabella 5).

Analizzando le sequenze, è stato osservato un livello molto basso di variabilità genetica nella popolazione spagnola, il che spiegherebbe anche la stabilità della popolazione italiana, apparentemente derivata da quella spagnola. Questa ipotesi è supportata anche dall'analisi filogenetica (Figura 6). Il gene AV1 degli isolati italiani di ToLCNDV ha mostrato valori dN e dS di 0.012 ± 0.001 e 0.039 ± 0.010 , rispettivamente, con un rapporto dN/dS di 0,307. Questi valori, unitamente alle analisi filogenetiche e alle analisi dei flussi sembrerebbero confermare una selezione negativa che potrebbe essere facilmente spiegata con l'eccessiva velocità di dispersione del virus in Italia. Infine, l'analisi della selezione su singoli codoni effettuata solo per le sequenze italiane con gli algoritmi disponibili sul sito Datamonkey ha identificato alcuni siti selezionati positivamente (Figura 6), che potrebbero indicare il verificarsi di processi adattativi nel prossimo futuro.

Tabella 5 – Diversità nucleotidica^a, e flusso genico (F_{ST}) di *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) in differenti popolazioni geografiche.

Popolazione	n ^b	Bangladesh	India	Iran	Pakistan	Tailandia	Spagna	Tunisia	Italia
Bangladesh	7	0.047±0.004	0,062±0,004	0,047±0,005	0,049±0,004	0,048±0,005	0,080±0,007	0,086±0,007	0,085±0,007
India	73	0.041	0.071±0.005	0,055±0,004	0,058±0,004	0,068±0,006	0,090±0,007	0,096±0,007	0,095±0,007
Iran	3	0.449	0.300	0.004±0.001	0,042±0,005	0,058±0,007	0,084±0,009	0,090±0,009	0,090±0,008
Pakistan	17	0.127	0.051	0.498	0.003±0.003	0,053±0,006	0,078±0,008	0,084±0,008	0,083±0,008
Tailandia	4	0.302	0.337	0.801	0.476	0.018±0.003	0.888	0,090±0,008	0,089±0,008
Spagna	3	0.701	0.599	0.973	0.759	0,083±0,008	0±∞	0,012±0,003	0,009±0,002
Tunisia	5	0.659	0.569	0.914	0.713	0.835	0.533	0.011±0.002	0,020±0,003
Italia	68	0.628	0.541	0.899	0.682	0.809	0.180	0.336	0.015±0.001

^aDiversità nucleotidica misurata mediante il metodo Jukes-Cantor

^bNumero di isolati per ogni popolazione

La diversità nucleotidica all'interno del gruppo è riportata in grassetto nella diagonale, mentre la diversità nucleotidica tra i gruppi è riportata sopra la diagonale. Il flusso genico è mostrato sotto la diagonale.

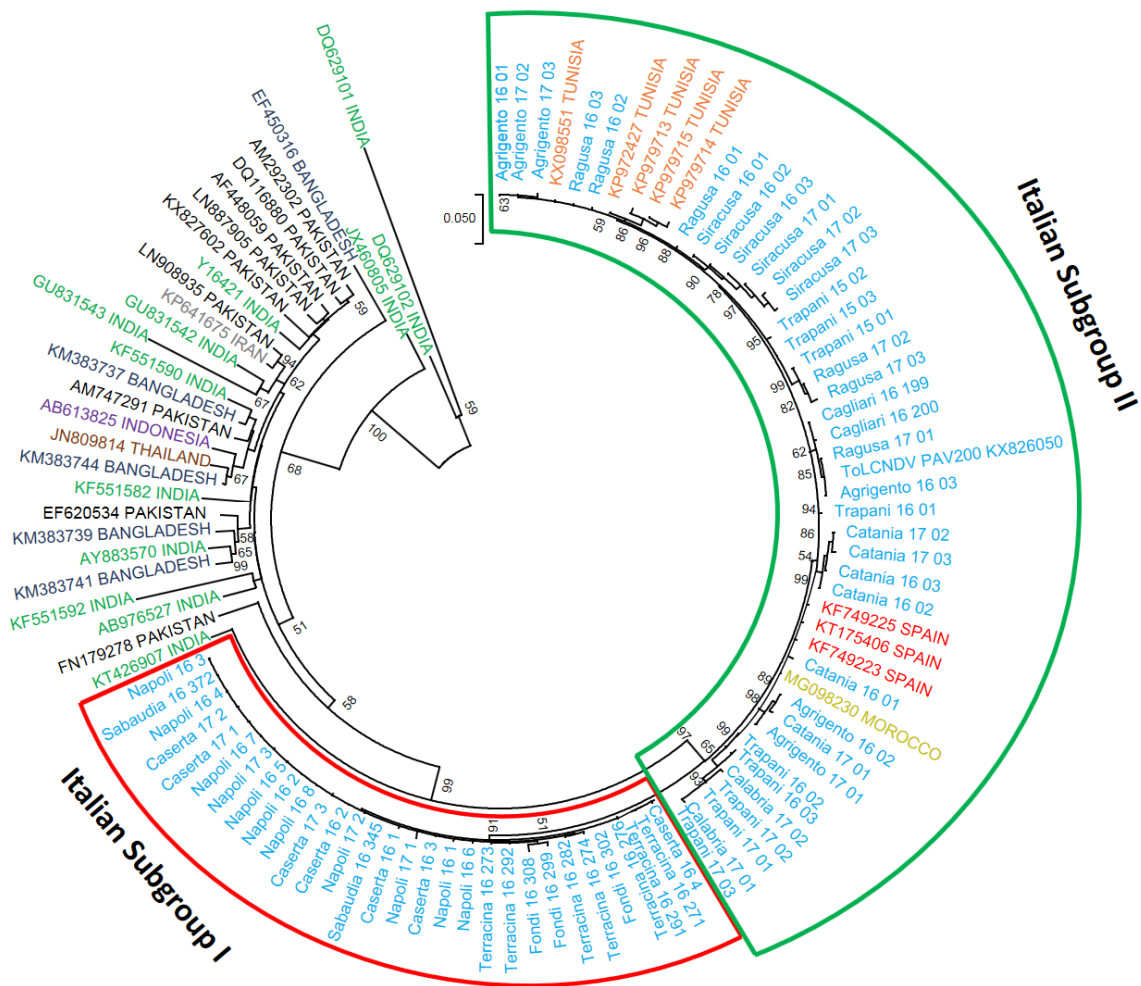


Figura 5 – Albero filogenetico che mette in relazione i diversi isolati italiani di ToLCNDV con isolati rinvenuti in altre parti del mondo. Per l’ottenimento dell’albero è stato utilizzato il metodo Maximum Likelihood (ML) basato sul modello Tamura 3-parameter, con un bootstrap di 1000 replicazioni per stimare la significatività statistica di ciascun nodo, effettuato mediante programma MEGA7. Sono indicati solo i valori di bootstrap >50%. I colori rappresentano i diversi Paesi: Italia=blu; Tunisia=arancio; Spagna=rosso; Marocco=oro; India=verde; Pakistan=nero; Bangladesh=blu scuro; India=grigio; Thailandia=marrone; Indonesia=viola.

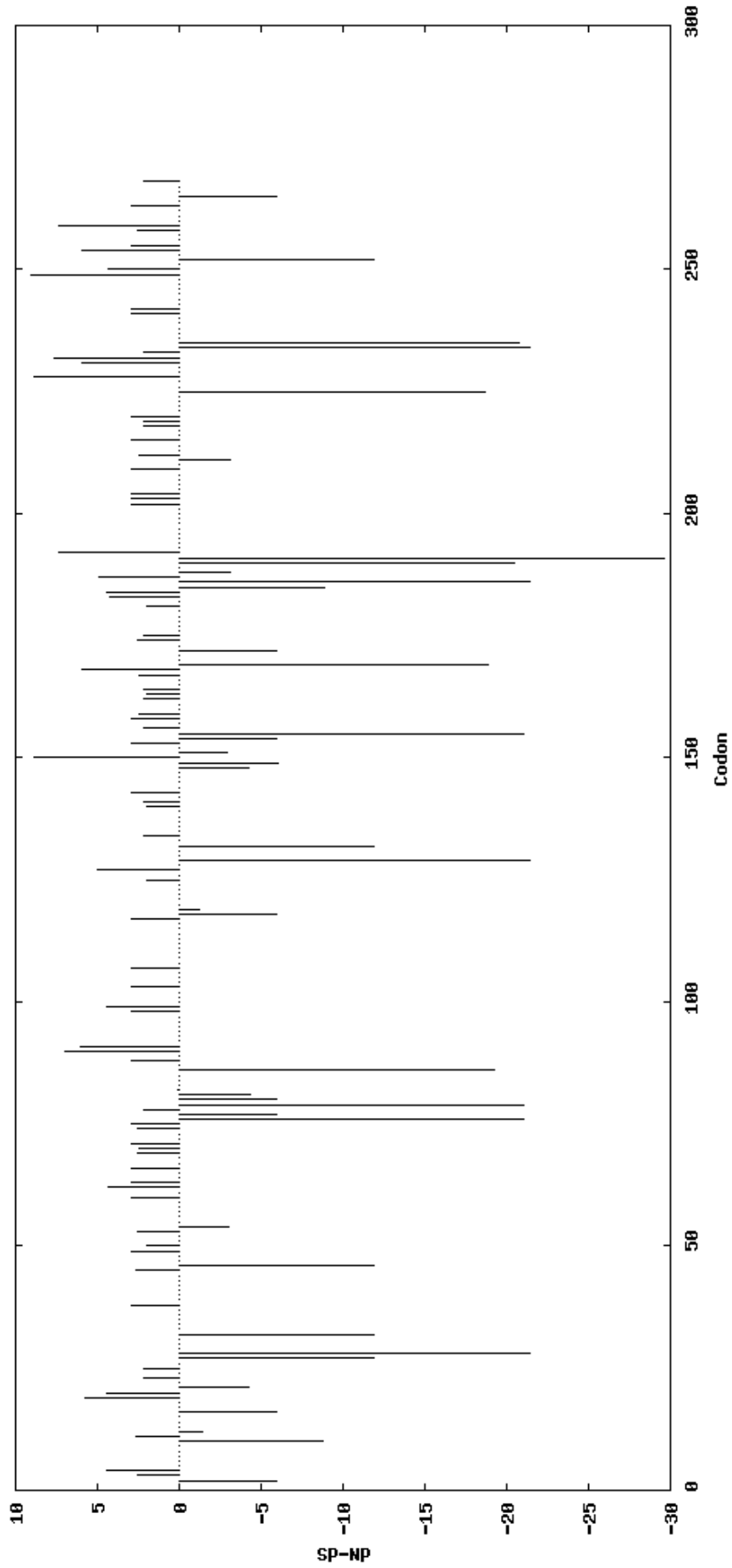


Figura 6 – Siti del gene AV1 di *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) sotto selezione positiva o negativa. L'asse x rappresenta le coordinate degli aminoacidi nella proteina di rivestimento mentre l'asse y rappresenta i valori [dN - dS] normalizzati.

3.3.4 MESSA A PUNTO DI UNA TECNICA LAMP (LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION) PER IL RILEVAMENTO RAPIDO DI ToLCNDV

Mediante l'utilizzo del software Primer Explorer V5 è stato possibile disegnare un set completo di primer sul gene AV1 che codifica per la proteina di rivestimento di ToLCNDV che rispettasse tutti i parametri chiave per il corretto funzionamento della reazione LAMP (Figura 7). In Tabella 6 vengono riportati i primer con le relative sequenze nucleotidiche e dimensioni.

UPLOAD FILE: PrimerInfo

```

1  ATGTCGAAGC GACCAGCAGA TATCATCATT TCAACTCCCG CATCGAAGGT ACGCCGACGG CTCAACTTCG ACAGCCCCTA 80
*****
81  TGGAAACCGT GCATCTGTCC CCATTGCCCG CGTCACAAAA GCAAGGGCCT CGACGAACAG GCCCATGAAC AGAAAACCCA 160
*****
161 GAATGTACAG AATGTATAGA AGTCCTGACG TGCCAAGGGG TTGTGAAGGC COTTGTAAGG TGCAATCGTT TGAATCCCGG 240
*****
241 CACGATGTCT CGCATATTGG CAAAGTCATG TGTGTTAGTG ATGTTACTCG AGGCACCGGA CTCACACATC GCGTAGGCAA 320
*****
321 GCGATTTTGT GTGAAATCTG TCTATGTACT GGGAAAAATA TGGATGGATG AAAATATCAA AACTAAAAAT CATACTAATA 400
*****
401 GTGTTATGTT CTTTCTTGTT CGTGACCGGC GTCCAACCGG AACCCCTCAA GATTTTGGGG AAGTTTTCAA TATGTTTGAT 480
*****
481 AATGAACCTA GCACAGCCAC GGTGAAGAAC ATGCATCGTG ATCGTTATCA AGTCTTACGG AAGTGGCATG CTA CTGTGTAC 560
*****
<===== F3=====>
561 GGGAGGAACG TATGCATCAA GGGAGCAAGC ATTAGTTAGG AAGTTTGTTA GGGTTAATAA TTATGTTGTT TACAATCAAC 640
*****
<===== =F2===== =>
===== F1=====
641 AAGAGGCCGG CAAGTATGAG AATCATACTG AAAATGCATT AATGTTGTAT ATGGCCTGTA CTCATGCATC AAATCCTGTG 720
*****
=====><=====B 1===== =>
<=====
721 TATGCTACTT TGAAAATCCG GATCTATTTT TATGATTCGG TCACAAATTA A 771
*****
=B2===== => <=====B3 =====>

```

Number of Primer Candidates: LF=1, LB=14
Filtering by dimer-dG.
7 Primer set(s) were generated.

1.Generate

Generate

7

sets were generated.

2.Display

Display

Page 1

Displayed.

Figura 7 – Disegno set di primer sulla sequenza del gene AV1 di ToLCNDV mediante programma Primer Explorer V5.

Tabella 6 – Sequenze nucleotidiche e dimensione di ciascun primer ottenuto per il rilevamento di ToLCNDV mediante LAMP.

Primer	Sequenza (5'-3')	Lunghezza primer (nt)
ToLCNDV-F3	GTGGCATGCTACTGTGAC	18
ToLCNDV-B3	CCGAATCATAAAAATAGATCCGG	23
ToLCNDV-BIP	CGGCAAGTATGAGAATCATACTGAACAAAAGTAGCATACACAGGATT	46
ToLCNDV-FIP	GCCTCTTGTTGATTGTAAACAACATGAGGAACGTATGCATCAAGG	45
ToLCNDV-LF	CAAACCTCCTAACTAATGCTTGCTC	25
ToLCNDV-LB	TGTTGTATATGGCCTGTACTCATG	24

Il set di primer appositamente disegnato si è rivelato particolarmente affidabile e sensibile per il rilevamento di ToLCNDV mediante LAMP.

Di seguito si riportano i risultati relativi all'andamento delle prove eseguite utilizzando i plasmidi con le relative diluizioni seriali decimali, il DNA totale estratto dai 10 campioni positivi selezionati per regione e le porzioni di tessuto fogliare infetto degli stessi campioni in Glycine buffer.

Come è possibile vedere in Figura 8, è stata ottenuta l'amplificazione a partire da tutti e 10 plasmidi tal quale selezionati per la messa a punto della tecnica; in particolare, le curve hanno assunto un andamento esponenziale tra il quarto e il quinto ciclo di amplificazione (12-15 minuti dopo la partenza del test), raggiungendo il plateau già a partire dal 11° ciclo. Dopo l'amplificazione, al fine di rilevare la variazione dell'energia di fluorescenza al variare della temperatura, sono state generate le relative curve di dissociazione per ogni plasmide. In Figura 9 è riportata a titolo esemplificativo la curva di dissociazione relativa al plasmide p#SIC1, con un picco della curva ad una temperatura di 80 °C.

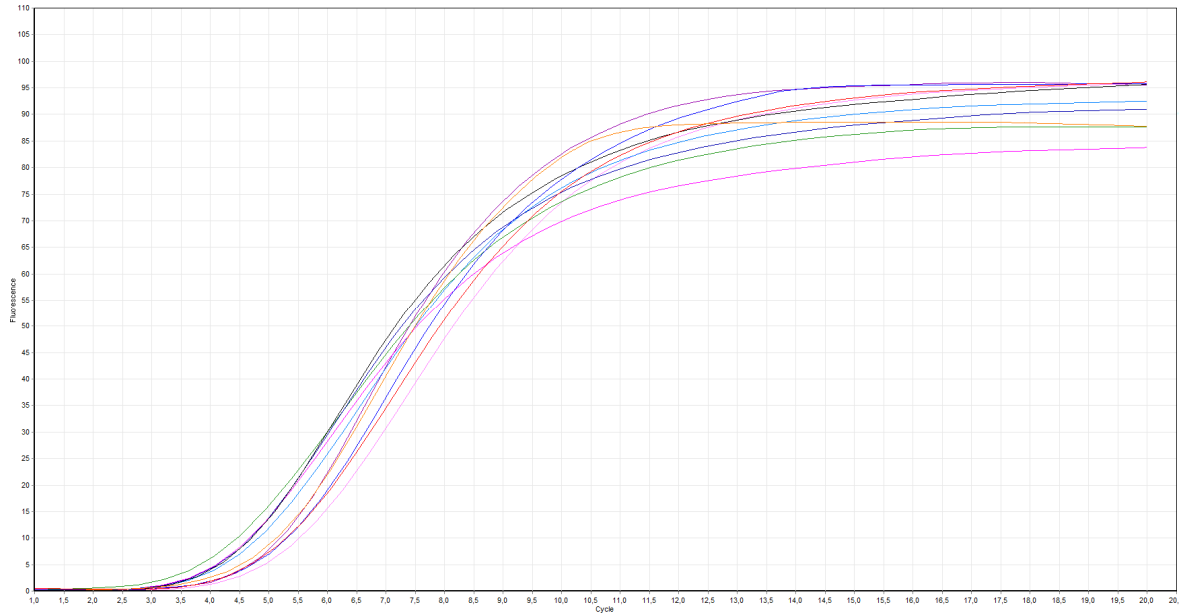


Figura 8 – Curve di amplificazione ottenute mediante prova LAMP – ToLCNDV dei 10 plasmidi (p#SIC1, p#SIC2, p#CAM1, p#CAM2, p#LAZ1, p#LAZ2, p#SAR1, p#SAR2, p#CAL1, p#CAL2).

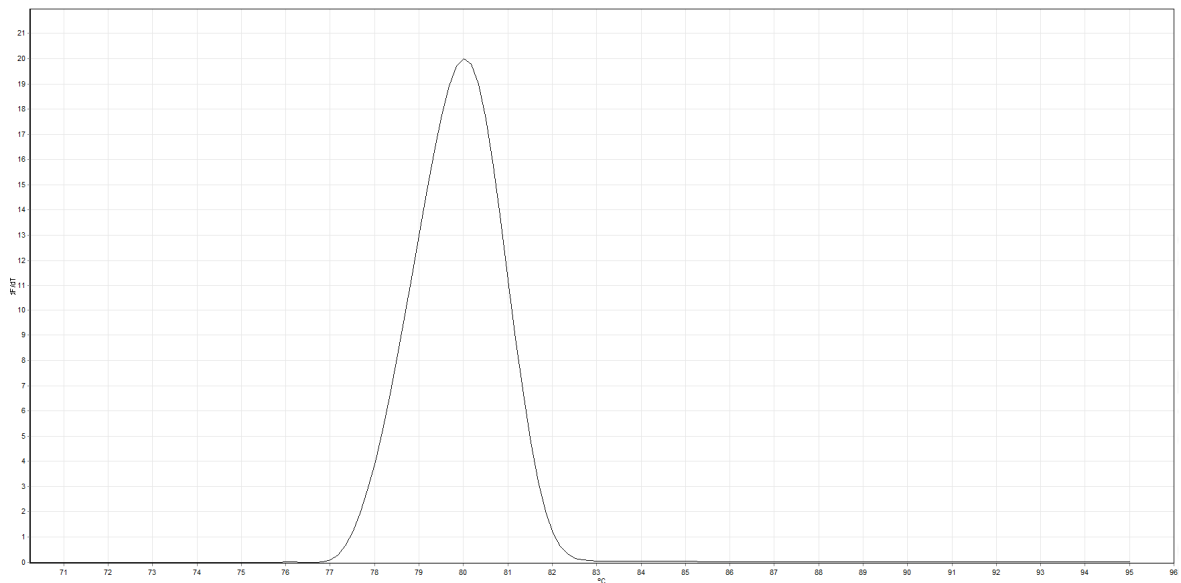


Figura 9 – Curva di dissociazione relativa al plasmide p#SIC1.

Al fine di valutare il limite di rilevamento e quindi la sensibilità della tecnica sviluppata, sono state effettuate delle prove utilizzando i 10 plasmidi e le relative diluizioni decimali seriali, partendo dal plasmide tal quale (200 ng/μl) fino ad una concentrazione di 2.0×10^{-10} ng/μl.

Con la presente tecnica è stato possibile rilevare il patogeno, con ogni singolo plasmide utilizzato, fino ad una concentrazione pari a 2.0×10^{-8} ng/ μ l (Tabella 7), mentre non è stata ottenuta alcuna amplificazione per le diluizioni successive.

Tabella 7 – Risultati ottenuti mediante prova LAMP su 10 plasmidi (2 per regione) e relative diluizioni decimali seriali.

Diluizione [ng/ μ l]	Plasmide									
	Sicilia		Campania		Lazio		Sardegna		Calabria	
	p#SIC1	p#SIC2	p#CAM1	p#CAM2	p#LAZ1	p#LAZ2	p#SAR1	p#SAR2	p#CAL1	p#CAL2
Tal quale	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.0×10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.0×10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.0×10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.0×10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.0×10^{-5}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.0×10^{-6}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.0×10^{-7}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.0×10^{-8}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.0×10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.0×10^{-10}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

In Figura 10 e 11 sono riportate rispettivamente le curve di amplificazione e dissociazione relative alla prova effettuata con il plasmide ottenuto da un campione positivo proveniente dalla Sicilia (p#SIC1). Partendo dal tal quale, con una curva di amplificazione che assume un andamento esponenziale tra il quarto e quinto ciclo (12-15 minuti), le curve relative alle diluizioni decimali seriali hanno assunto un andamento esponenziale tra il 5° e il 16° ciclo, al diminuire della concentrazione. Le curve di dissociazione ottenute, anche in questo caso, hanno restituito un picco ad una temperatura di 80 °C.

Le prove effettuate con i restanti plasmidi hanno riportato risultati del tutto comparabili a quelli appena descritti e, per tale motivo, non sono stati riportati.

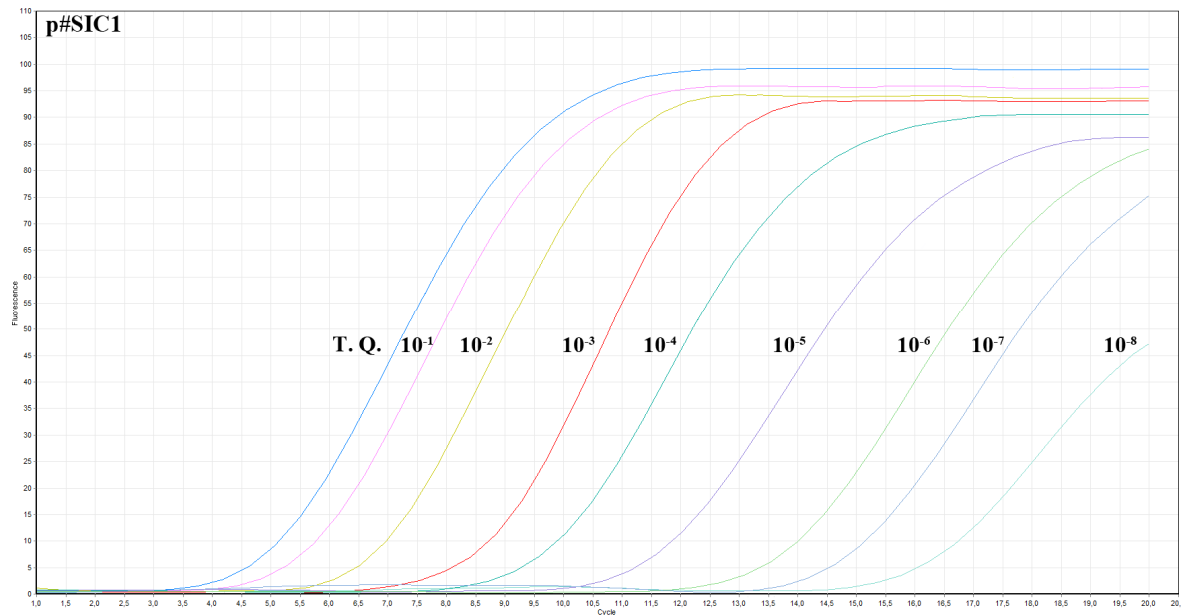


Figura 10 – Curve di amplificazione ottenute mediante prova LAMP – ToLCNDV utilizzando il plasmide p#SIC1 tal quale e le relative diluizioni decimali seriali. T.Q. = plasmide tal quale.

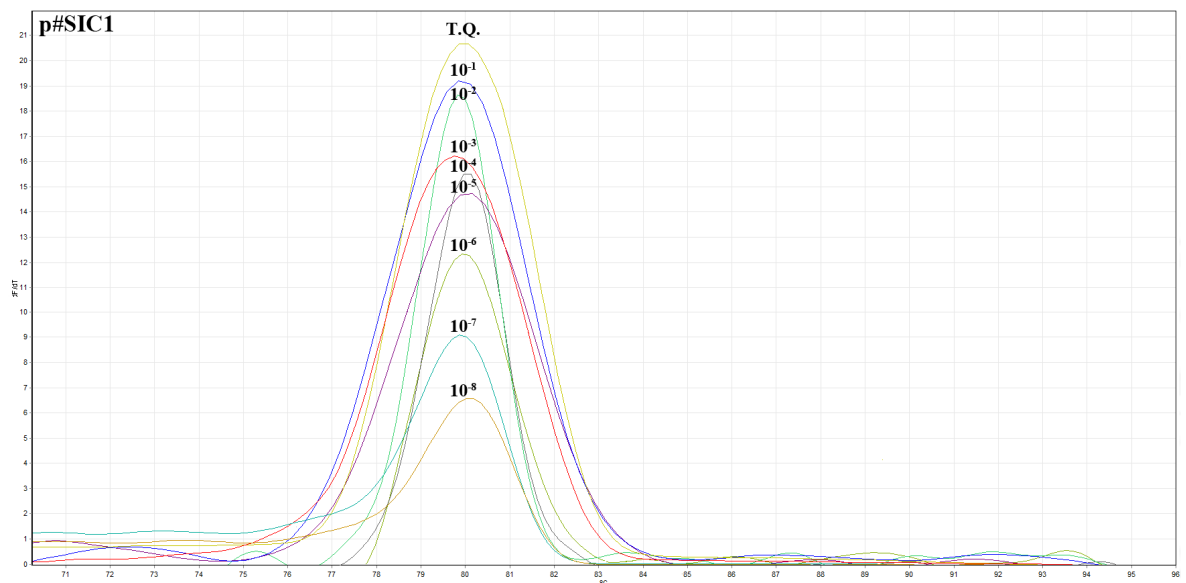


Figura 11 – Curve di dissociazione plasmide p#SIC1 e relative diluizioni seriali. T.Q. = plasmide tal quale.

L'amplificazione LAMP a partire dal DNA totale estratto ha dato esito positivo in tutti i 10 campioni selezionati per regione. In particolare, le curve hanno assunto un andamento esponenziale tra il 6° e il 10° ciclo di amplificazione, con relative curve di dissociazione con

picco ad una temperatura di 80 °C. In Figura 12 e 13 vengono riportate rispettivamente le curve di amplificazione di tutti campioni analizzati e la curva di dissociazione relativa al campione SIC1.

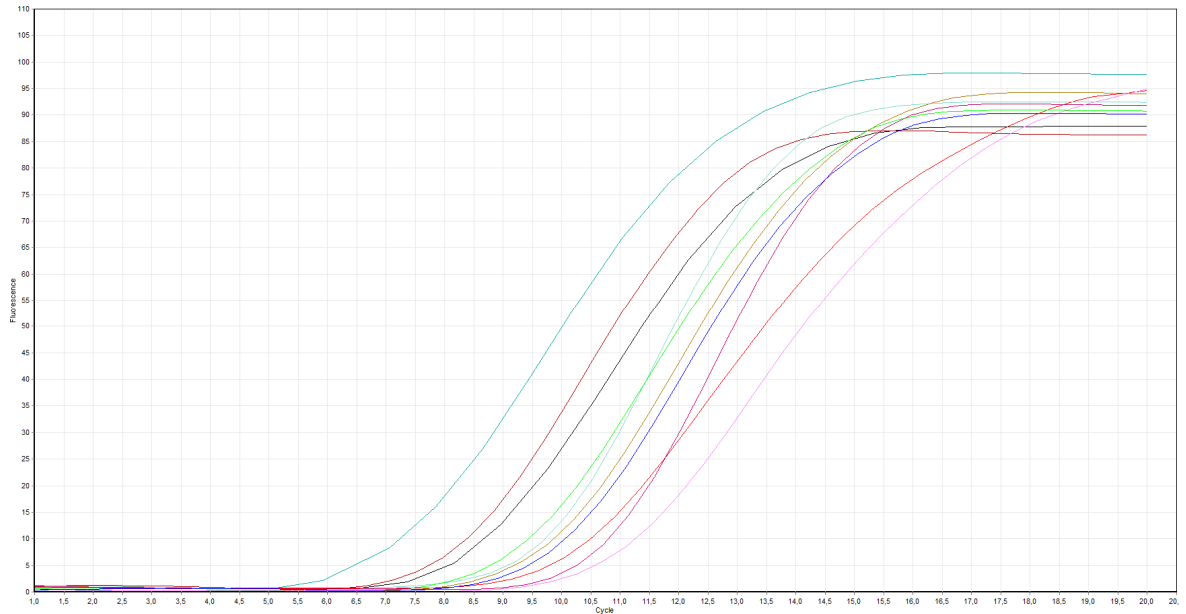


Figura 12 – Curve di amplificazione ottenute mediante prova LAMP – ToLCNDV utilizzando il DNA totale estratto dai campioni SIC1, SIC2, CAM1, CAM2, LAZ1, LAZ2, SAR1, SAR2, CAL1, CAL2.

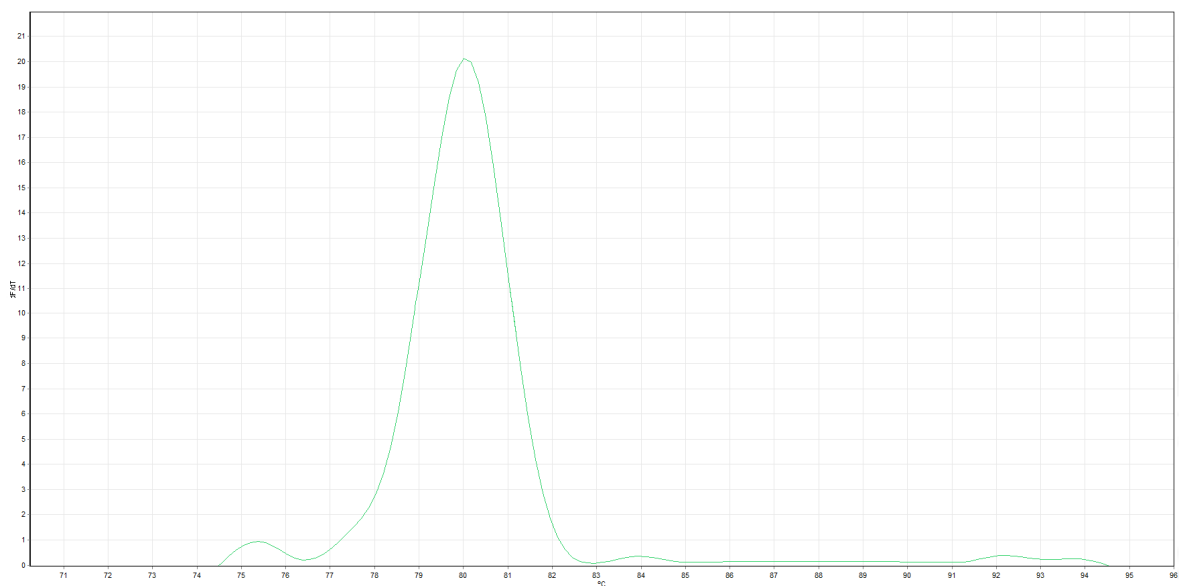


Figura 13 – Curva di dissociazione relativa al campione SIC1 a partire dal DNA totale estratto.

I 10 campioni selezionati per regione ed analizzati mediante LAMP partendo da una piccola porzione di tessuto fogliare in Glycine Buffer e quindi non utilizzando il DNA totale estratto, hanno dato esito positivo. Le curve di amplificazione hanno assunto un andamento esponenziale tra il 9° e il 13° ciclo, con relative curve di dissociazione con picco ad una temperatura di 80 °C (Figura 14 e 15).

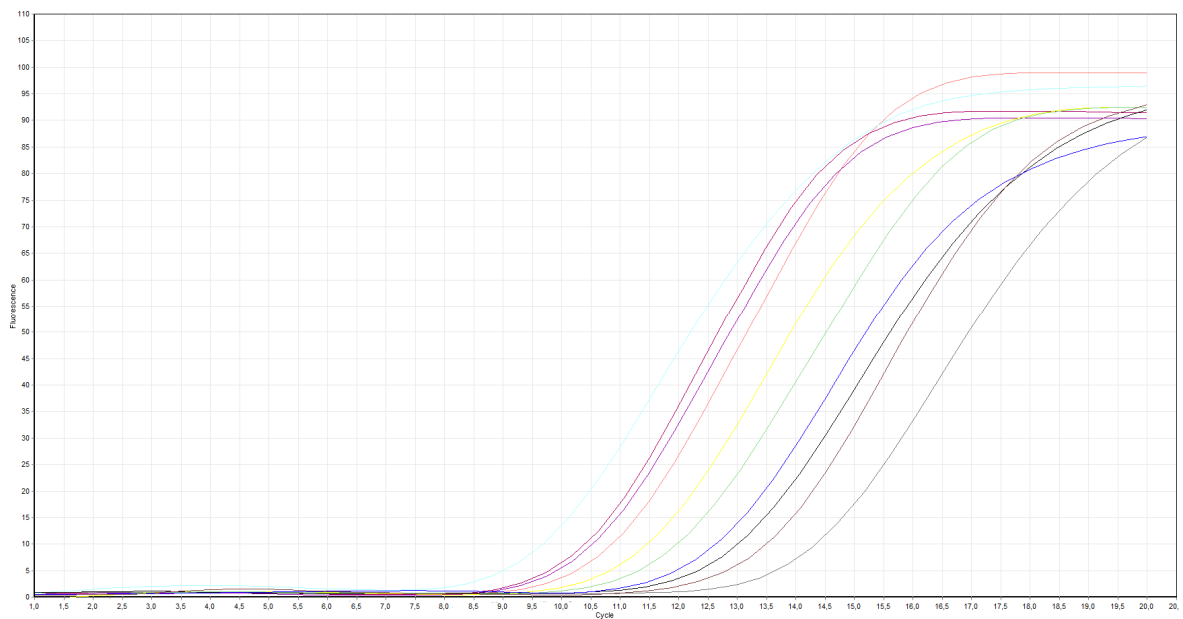


Figura 14 – Curve di amplificazione ottenute mediante prova LAMP – ToLCNDV utilizzando il tessuto fogliare in Glycine Buffer dei campioni SIC1, SIC2, CAM1, CAM2, LAZ1, LAZ2, SAR1, SAR2, CAL1, CAL2.

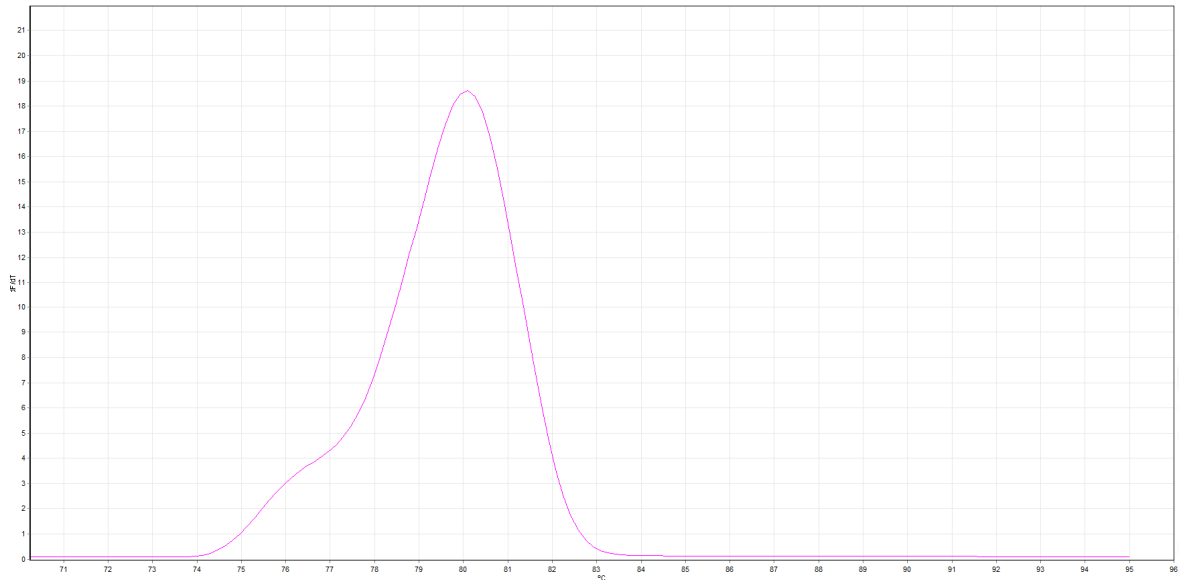


Figura 15 – Curva di dissociazione relativa al campione SIC1 partendo da tessuto fogliare in Glycine Buffer.

Analizzando più a fondo i risultati descritti finora, appare evidente come l'estrazione da tessuto fogliare utilizzata nel presente lavoro restituisce risultati del tutto soddisfacenti, soprattutto se paragonati a quanto ottenuto partendo dal DNA totale estratto. Mettendo a confronto i risultati ottenuti con i due metodi di estrazione, le curve di amplificazione inerenti ai campioni sottoposti ad estrazione da tessuto fogliare in Glycine Buffer raggiungono la fase esponenziale circa 4-5 cicli più tardi rispetto agli stessi campioni sottoposti ad estrazione del DNA totale (Figura 16 e 17), non pregiudicando comunque in nessun caso la buona riuscita dell'analisi. Tali risultati sono particolarmente incoraggianti, in quanto questa tecnica permette il rilevamento del virus anche a partire da materiale vegetale ed in presenza di sostanze inibitrici; inoltre, tale tecnica consente una notevole riduzione dei costi, poiché non è necessaria l'estrazione del DNA totale, nonché un risparmio in termini di tempo e manodopera.

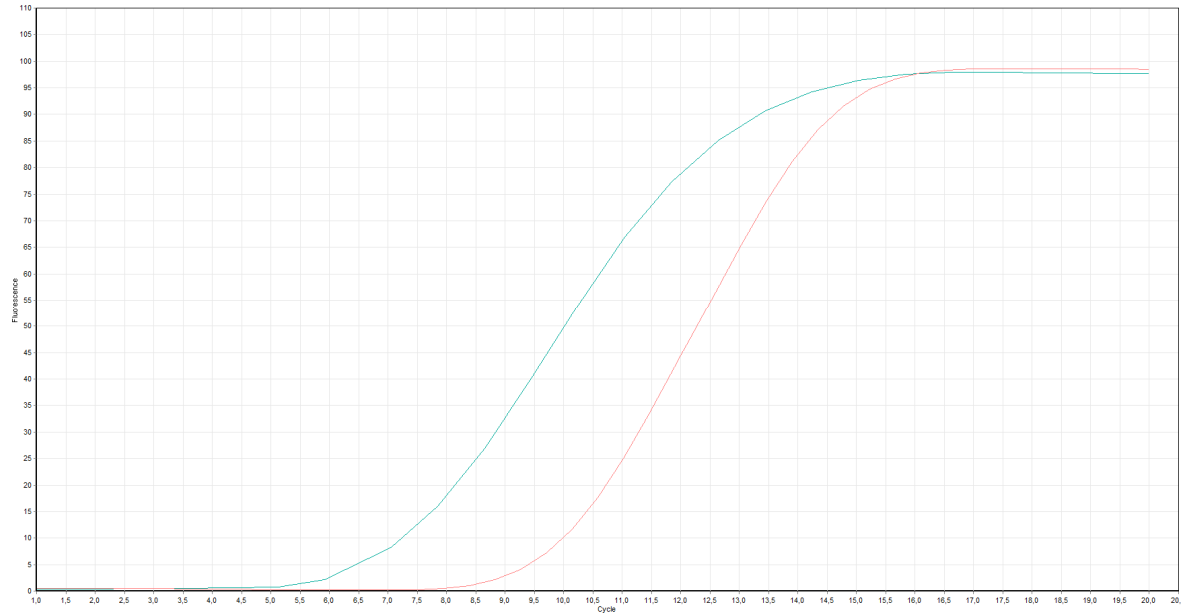


Figura 16 – Confronto curve di amplificazione relative al campione SIC1 (Sinistra: DNA totale estratto; Destra: tessuto fogliare in Glycine Buffer).

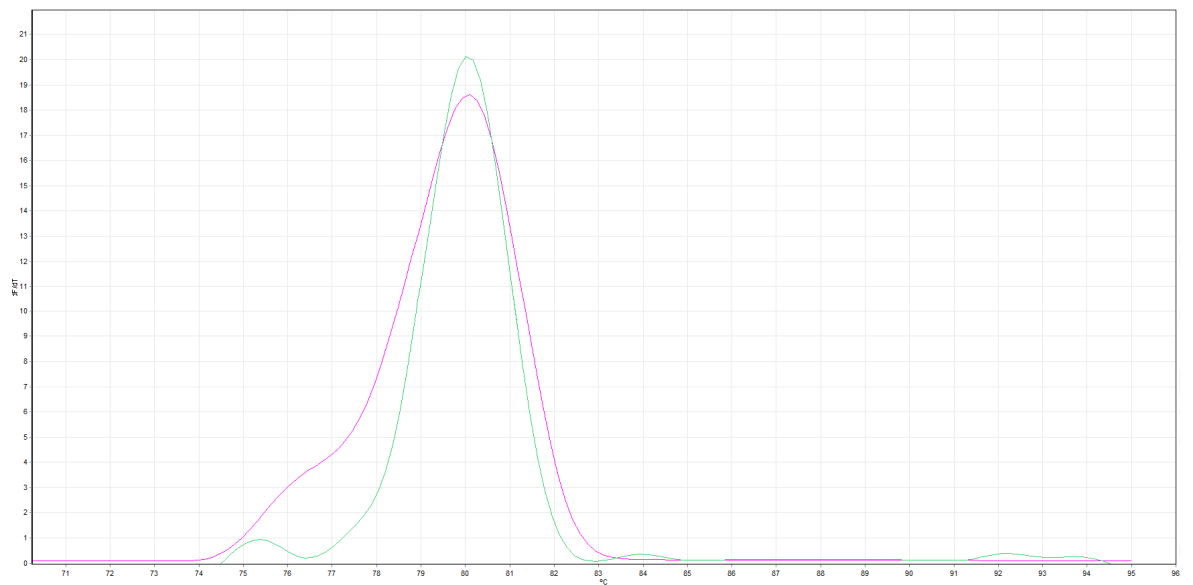


Figura 17 – Confronto curve di dissociazione DNA totale estratto – tessuto fogliare in Glycine Buffer, relative al campione SIC1.

3.4 CONCLUSIONI

Tomato leaf curl New Delhi virus è stato recentemente introdotto in Europa, prima in Spagna (Juárez *et al.*, 2014) nel 2012 e negli anni successivi in diversi Paesi del bacino del Mediterraneo, come la Tunisia e l'Italia (Mnari-Hattab *et al.*, 2015; Panno *et al.*, 2016). È stato dimostrato che gli isolati che stanno emergendo nel bacino del Mediterraneo occidentale costituiscono un gruppo di isolati strettamente correlati, secondo i criteri attualmente accettati dall'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), ovvero che l'identità di sequenza nucleotidica $\geq 91\%$ e $\geq 94\%$ rappresenta per i begomovirus la linea di demarcazione di specie e ceppi, rispettivamente (Brown *et al.*, 2015). Pertanto, questi isolati costituiscono un nuovo ceppo di questo virus, per il quale è stato proposto il nome ES (ToLCNDV-ES) (Moriones *et al.*, 2017). Le relazioni evolutive tra le sequenze di ToLCNDV utilizzate in questo studio hanno mostrato come tutti gli isolati italiani sono strettamente correlati a quelli provenienti da Spagna, Tunisia e Marocco e quindi si può assumere un'origine comune per questi isolati, identificabile in ToLCNDV-ES. Poiché ToLCNDV si è rapidamente diffuso in pochi anni nell'area del Mediterraneo, il basso livello di variabilità riscontrato tra gli isolati supporta l'ipotesi del "founder effect" associato a un collo di bottiglia della popolazione durante la diffusione in questa nuova area (Moriones *et al.*, 2017). Come riportato da diversi autori (Juarez *et al.*, 2014; Mnari-Hattab *et al.*, 2015; Luigi *et al.*, 2016; Panno *et al.*, 2016; Moriones *et al.*, 2017), ToLCNDV ha trovato lo zucchini come suo ospite principale nel bacino del Mediterraneo. In questi paesi, tale cucurbitacea viene intensamente coltivata durante tutto l'anno sia in pieno campo (colture estive) che in serra (colture autunnali-primaverili). La presenza prolungata di questo ospite, così come il clima mite che favorisce i cicli sovrapposti dell'insetto vettore, hanno facilitato la rapida diffusione del virus. È stato dimostrato che ToLCNDV-ES è probabilmente il risultato della ricombinazione genetica tra un isolato tipo di ToLCNDV ed altri begomovirus (Moriones *et al.*, 2017). Gli eventi di ricombinazione a livello di intraspecie e interspecie, dovuti a infezione mista nello stesso ospite, sono frequenti nei begomovirus e considerati più significativi della mutazione come forza trainante nell'evoluzione dei begomovirus, aumentando così la variabilità genetica e consentendo l'adattamento a nuovi contesti agro-ecologici, tra cui nuovi ospiti (Davino *et al.*, 2009, 2012). Per tali motivi, la comparsa di nuove varianti di ToLCNDV in Italia non può essere esclusa a causa di eventi di

ricombinazione con begomovirus endemici. A tal proposito, nuovi ospiti di significativo valore economico, come pomodoro, melanzana e peperone potrebbero subire perdite significative in futuro.

Ad oggi, è stata riscontrata una bassissima diversità genetica tra gli isolati italiani (0.015 ± 0.001) e tra gli isolati italiani e spagnoli (0.009 ± 0.002). È interessante notare che la diversità genetica tra isolati italiani e tunisini e tra isolati spagnoli e tunisini è più elevata (rispettivamente $0,020 \pm 0,003$ e 0.012 ± 0.003) rispetto a quella riscontrata tra isolati italiani e spagnoli, rafforzando l'ipotesi dell'origine spagnola degli isolati italiani. Un basso livello di variabilità è stato osservato tra gli isolati italiani, probabilmente a causa della recente introduzione e della rapida diffusione di ToLCNDV in Italia, quindi un arco di tempo ristretto in cui si sono accumulate poche mutazioni. Inoltre, l'ipotesi più probabile sembra essere che il virus sia stato introdotto in Sicilia attraverso mosche bianche virulifere su piante di fragola (*Fragaria spp.*) importate dalla Spagna. Tuttavia, considerando il basso livello del flusso genico, non è chiaro se vi sia stato un altro ingresso di ToLCNDV in Sicilia proveniente dalla Tunisia o se la struttura della popolazione degli isolati siciliani e tunisini sia strettamente correlata a causa della loro origine comune dalla Spagna.

I risultati ottenuti nel presente lavoro mostrano come la Sicilia abbia il più alto numero di piante infette tra le regioni italiane, a causa del fatto che il primo focolaio di ToLCNDV in Italia è stato rilevato proprio in questa regione e che la malattia si sia spostata nelle altre regioni un anno dopo. Tuttavia, tra il 2016 e il 2017, anche nelle altre regioni italiane l'incidenza di ToLCNDV è risultata critica e, di conseguenza, ToLCNDV deve essere costantemente monitorato per comprenderne meglio l'epidemiologia e prevenire qualsiasi salto di specie. Infatti, è di fondamentale importanza impedire al virus di infettare anche le colture di pomodoro che, ad oggi, rappresentano una delle colture economicamente più importanti dell'Italia meridionale.

Come riportato da Lopez e collaboratori (2015), ToLCNDV può essere trasmesso su *C. melo*. Il presente studio ha confermato la trasmissione meccanica del virus su *C. pepo*, *C. melo inodorus* e *C. melo cantalupensis*.

Nel presente lavoro è stata inoltre sviluppata una tecnica LAMP che si è rivelata particolarmente affidabile e veloce, mostrando inoltre una sensibilità superiore rispetto ad alte tecniche di diagnosi molecolare impiegate finora per il rilevamento di ToLCNDV.

L'elevata facilità di impiego, i minori costi di gestione e la maggiore rapidità di esecuzione, permettono di ottenere risultati soddisfacenti, anche con operatori meno esperti. La tecnica LAMP, associata alla contemporanea lettura in tempo reale dell'amplificazione dell'acido nucleico, nonché ad una estrazione rapida del DNA, rappresenta un rilevante avanzamento tecnologico nell'ambito della diagnosi precoce in patologia vegetale.

CAPITOLO 4

CASO STUDIO *TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS* (ToBRFV)

Il lavoro di ricerca presentato in questo capitolo è stato incluso nelle seguenti pubblicazioni:

Real-time reverse transcription polymerase chain reaction development for rapid detection of *Tomato brown rugose fruit virus* and comparison with other techniques

Panno S, Ruiz-Ruiz S, Caruso AG, Alfaro-Fernandez A, Font San Ambrosio MI, Davino S, (2019). *PeerJ*, 7:e7928.

First report of *Tomato brown rugose fruit virus* on tomato crops in Italy

Panno S, Caruso AG, Davino S, (2019). *Plant Disease*, 103(6), 1443-1443.

CAPITOLO 4. CASO STUDIO *TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS* (TOBRFV)

4.1 INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, diverse malattie emergenti causate da virus sono state importanti fattori limitanti in diverse colture, come il pomodoro, causando considerevoli perdite economiche (Hanssen *et al.*, 2010). Infatti, la produzione in serra di pomodoro in Italia ha subito importanti perdite a causa dell'infezione di differenti virus: *Pepino mosaic virus* (PepMV) (Davino *et al.*, 2008; Davino *et al.*, 2017a), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Panno *et al.*, 2012), *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) (Panno *et al.*, 2019a), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) – *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) e loro ricombinanti (Davino *et al.*, 2009, 2012, Panno *et al.*, 2018) e alla fine del 2018 *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) (Panno *et al.*, 2019b). La globalizzazione del commercio internazionale e il movimento delle merci nell'area di libero scambio per i Paesi che si affacciano sul bacino del Mediterraneo rendono più difficile il controllo dei patogeni. In questo contesto, il controllo dei patogeni trasmessi mediante seme risulta estremamente difficile. Questo è il caso della recente diffusione di ToBRFV in Sicilia, che, molto probabilmente, è stato introdotto nell'isola attraverso semi infetti e/o attraverso frutti infetti e loro successiva manipolazione.

Tomato brown rugose fruit virus appartiene al genere *Tobamovirus*, famiglia *Virgaviridae*. I tobamovirus sono gli unici membri di questa famiglia ad avere un genoma non suddiviso. È il genere più grande della famiglia per numero di specie (King *et al.*, 2011). Possiedono un genoma a RNA a singolo filamento con polarità positiva, ssRNA+, di ~6.400 nucleotidi (nt), con una tipica organizzazione genomica che consiste in 4 frammenti aperti di lettura (Open Reading Frames – ORFs) che codificano per 4 prodotti proteici: le proteine 126 kDa e 183 kDa, coinvolte nella replicazione virale e tradotte direttamente dall'ORF presente al 5' dell'RNA genomico, dove la proteina 126 kDa contiene domini metiltransferasi ed elicasi, mentre la proteina di 183 kDa contiene in aggiunta il dominio polimerasi (RdRp, RNA dipendente RNA polimerasi), sintetizzata da occasionali “readthrough” del codone di terminazione dell'ORF della proteina da 126 kDa. Gli ORF presenti al 3' dell'RNA genomico codificano per una proteina di movimento (movement protein – MP) di 30 kDa (ORF3), coinvolta nella traslocazione del virus da cellula a cellula e una proteina di

rivestimento (coat protein – CP) di circa 17,5 kDa (ORF4), tradotte dai loro rispettivi RNA subgenomici (sgRNA) co-terminali al 3' (Salem *et al.*, 2016) (Figura 1).

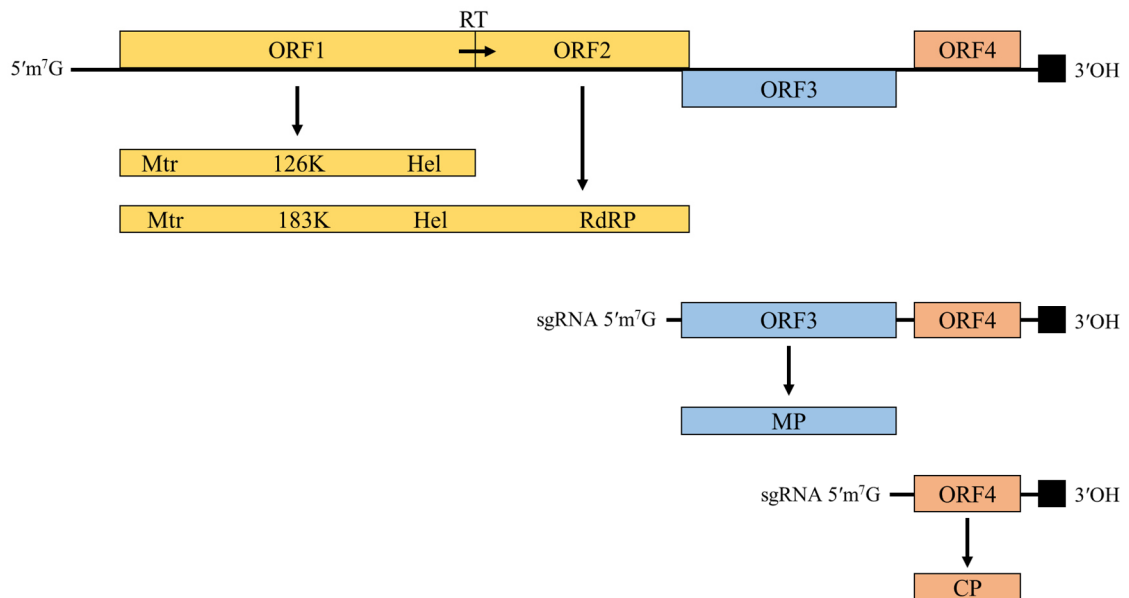


Figura 1 – Tipica organizzazione genomica di un tobamovirus. Il genoma è monopartito, lineare, a ssRNA (+) di 6,3-6,5 kb. Il terminale 3' ha una struttura simile a tRNA. Il terminale 5' ha un capsido nucleotidico metilato ($m^7G5'pppG$). Il genoma codifica 4 ORF (di cui una è una piccola subunità della replicasi); RdRp (RNA-dipendente RNA polimerasi), MP (proteina di movimento), CP (proteina di rivestimento).

ToBRFV è stato descritto per la prima volta nel 2016 in Giordania da Salem e collaboratori (2016) su piante di pomodoro cv. Candela coltivate in serra le quali mostravano, con un'incidenza prossima al 100%, lievi sintomi fogliari alla fine della stagione, ma forti sintomi necrotici di colore marrone su frutti che hanno fortemente compromesso il valore di mercato del raccolto. Nel 2017 è stato segnalato per la prima volta in Israele su piante di pomodoro con gene di resistenza *Tm-2²* (Luria *et al.*, 2017), in Messico su colture di pomodoro e peperone (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018) e successivamente si è diffuso in Germania, Stati Uniti (California), Palestina, Italia, Turchia e Regno Unito (Menzel *et al.*, 2019; Ling *et al.*, 2019; Alkowni *et al.*, 2019; Panno *et al.*, 2019b; Fidan *et al.*, 2019; EPPO, 2019). In Figura 2 è riportata la mappa della attuale distribuzione mondiale di ToBRFV. Date le sue caratteristiche, che lo rendono molto simile a ToMV, si presume che il suo *modus operandi* sia molto simile, anche se non si dispone al momento di dati certi.

In Tabella 1 è possibile vedere lo stato attuale della presenza del virus nei Paesi in cui è stato segnalato, secondo gli ultimi dati riportati dalla EPPO.

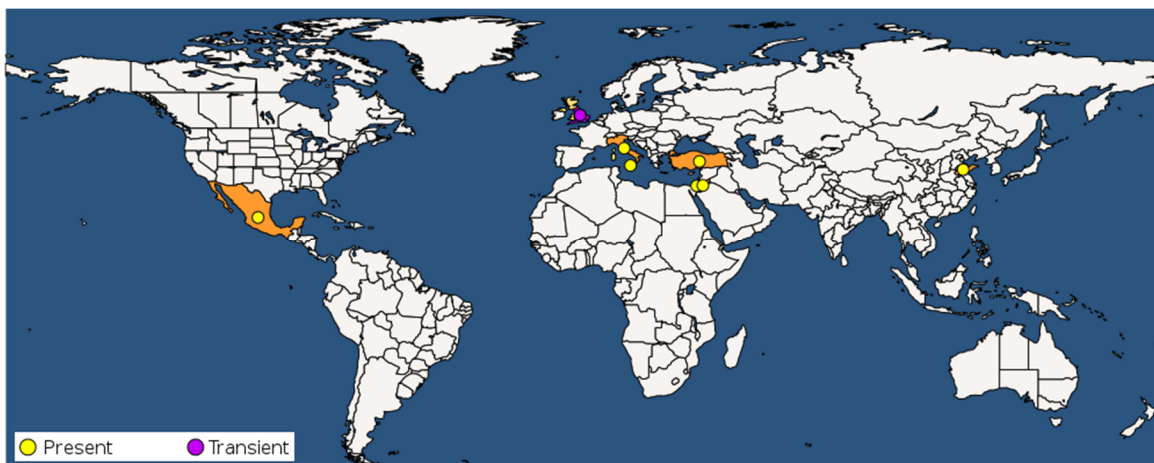


Figura 2 – Mappa di distribuzione mondiale di *Tomato brown rugose fruit virus* (EPPO, 2019).

Tabella 1 – Paesi in cui è stato segnalato ToBRFV e stato attuale della presenza del virus (EPPO, 2019).

Continente	Paese	Regione	Presenza del virus
America	Messico		Presente, distribuzione limitata
	USA	California	Assente, eradicato
Asia	Cina	Shandong	Presente, rinvenimenti limitati
	Israele		Presente
	Giordania		Presente
Europa	Germania		Assente, eradicato
	Italia	Sicilia	Presente, distribuzione limitata
	Turchia		Presente, rinvenimenti limitati
	Regno Unito	Inghilterra	Transitorio, sotto eradicazione

I sintomi di ToBRFV sono tipici delle infezioni da tobamovirus e consistono principalmente in ingiallimenti internodali e deformazioni su foglie di pomodoro, mosaico, deformazione e necrosi sulle foglie giovani, necrosi e deformazione a carico dei sepali e decolorazione, deformazione e necrosi sui frutti giovani. A causa dei sintomi appena descritti e dell'abilità di ToBRFV di trasmettersi mediante contatto, (attrezzi da lavoro contaminati, manipolazione, contatto diretto pianta-pianta), materiale di propagazione, insetti impollinatori (Levitzky *et al.*, 2019) e seme rappresenta una grave minaccia per le colture di pomodoro.

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 PRIMO CASO DI *TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS* SU POMODORO IN ITALIA

Nell'ottobre 2018, sono stati osservati sintomi ascrivibili a virus su piante di pomodoro in quattro differenti serre della provincia di Ragusa (Sicilia – Italia). I sintomi osservati consistevano principalmente in: decolorazione a mosaico, deformazione e necrosi a carico delle foglie giovani, decolorazione, deformazione e necrosi a carico dei giovani frutti e necrosi e deformazioni dei sepali (Figura 3). In totale sono stati raccolti 40 campioni sintomatici (10 per serra).



Figura 3 – Ingiallimenti internervali e necrosi a carico dei frutti su piante di pomodoro causati da ToBRFV.

Al fine di identificare l'agente causale, tutti i campioni prelevati sono stati testati per otto virus che causano una sintomatologia simile a quella precedentemente descritta su pomodoro; in particolare i campioni sono stati testati per *Tobacco etch virus* (TEV), *Tomato necrotic streak virus* (TomNSV), *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV), *Parietaria mottle*

virus (PMoV), *Tomato necrotic stunt virus* (ToNSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV).

L'RNA totale è stato estratto dai 40 campioni fogliari mediante kit di estrazione Qiagen RNeasy Plant Minikit (Qiagen, Hilden, Germany) seguendo le indicazioni della casa produttrice, apportando alcune opportune modifiche per l'omogeneizzazione del campione.

In dettaglio, il protocollo ha previsto il susseguirsi delle seguenti fasi:

- Omogeneizzare ~100 mg di tessuto fogliare in 1000 µl di extraction buffer (1.3 g di Sodio solfito anidro, 20 g di Polivinilpirrolidone (PVP) MW 24-40,000, 2 g di siero albumina Grade II, 20 g di Tween-20 disciolti in 1 L di H₂O distillata, pH 7.4);
- Prelevare il lisato e trasferirlo in un tubo eppendorf da 1,5 ml.;
- Aggiungere 450 µl di Buffer RLT, vortexare vigorosamente;
- Trasferire il lisato nelle colonnine QIAshredder spin column posizionate all'interno dei Collection Tube da 2 ml. Centrifugare a 11.000 g per 2 minuti. Trasferire il surnatante in un nuovo tubo da 1,5 ml senza disturbare il pellet formatosi;
- Aggiungere 0,5 volumi di etanolo (96-100%) al lisato e pipettare delicatamente;
- Trasferire il campione all'interno delle colonnine RNeasy Mini spin posizionate all'interno dei Collection Tube da 2 ml. Centrifugare a ≥ 8000 g per 1 minuto. Eliminare il flow-through;
- Aggiungere 700 µl di Buffer RW1 alla colonnina RNeasy Mini spin. Centrifugare a ≥ 8000 g per 1 minuto. Eliminare del flow-through;
- Aggiungere 500 µl di Buffer RPE alla colonnina RNeasy Mini spin. Centrifugare a ≥ 8000 g per 1 minuto. Eliminare del flow-through;
- Aggiungere 500 µl di Buffer RPE alla colonnina RNeasy Mini spin. Centrifugare a ≥ 8000 g per 1 minuto. Eliminare del flow-through;
- Inserire la colonnina in un nuovo collection tube e centrifugare alla massima velocità per 1 minuto affinché vengano eliminate le tracce residue di buffer;
- Posizionare le colonnine in tubi eppendorf sterili da 1,5 ml. Aggiungere 50 µl di RNase-free water e centrifugare a ≥ 8000 g per 1 minuto.

I campioni estratti sono stati sottoposti a RT-PCR end point con coppie di primer specifici (Tabella 2) (Zhang *et al.*, 2013; Badillo-Vargas *et al.*, 2016; Sui *et al.*, 2017, Galipienso *et*

al., 2015; Bratsch *et al.*, 2018; Webster *et al.*, 2013; Camelo-García *et al.*, 2014; Luria *et al.*, 2017).

Tabella 2 – Lista dei primer impiegati per il rilevamento di *Tobacco etch virus* (TEV), *Tomato necrotic streak virus* (TomNSV), *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV), *Parietaria mottle virus* (PMoV), *Tomato necrotic stunt virus* (ToNSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV).

Virus	Primer	Sequenza (5'-3')	GenBank ID	Posizione nucleotidica (nt)	Amplicone (nt)
TEV	TEF2	AGGCAGTGATGACAGCCTATG	NC_001555	8791-8811	316
	TER2	AACGCATAGCGTGACAAACTC		9086-9106	
TomNSV	RNA3_MPv	CCCCTACTAMTYAACTGTGGAT	NC_039076	2-25	1185
	RNA3_MPvc	CCCAAATMAGGGTATCCATCCCAC		1163-1186	
ToMMV	ToMMV-F	CGACCCTGTAGAATTAATAAATATT	NC_022230	5775-5799	289
	ToMMV-R	CACTCTGCGAGTGGCATCCAAT		6063-6042	
PMoV	PMoV-CP-F	AGTCGCTTTTGGAAATTAC	NC_005854	1281-1300	688
	PMoV-CP-R	GAACCGTCGGTAACAACCAT		1969-1988	
ToNSV	ToNSV-CP-For	ATGTCTGCGAATCAAGGGAACGGT	NC_017824	-	615
	ToNSV-CP-Rev	ATTCTGGTGGATGGAATCAATGA		-	
TCSV	TCSV-Nv2	CCTAAAGCTTCTTTAGTGTTATACTTCG	NC_035484	2620-2647	530
	TCSV-Nvc2	CTAACTCAGGCTGGAGAAATCGAG		3126-3149	
GRSV	GRSVnF	TCTTGTGCATCATCCATTGT	MH742958	2262-2281	614
	GRSVnR	GCGGCTACAGTGTTGCACTT		2939-2959	
ToBRFV	F-3666	ATGGTACGAACGGCGGCAG	KT383474	3666-3685	1052
	R-4718	CAATCCTTGATGTGTTAGCAC		4718-4696	

Al fine di verificare la reale presenza di ToBRFV nei campioni analizzati, è stata disegnata una nuova coppia di primer specifica per una porzione del gene che codifica per la proteina di rivestimento (Coat protein – CP). Tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi RT-PCR end point. La miscela per la RT-PCR in singolo step è stata preparata in un volume finale di 25 µl, contenente 2 µl di RNA totale precedentemente estratto mediante kit, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs, 1 mM di primer forward, 1 mM di primer reverse, 4U di RNaseOut (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), 20 U di enzima Superscript II reverse transcriptase-RNaseH (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) e 2U di enzima *Taq* DNA polimerasi (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Il protocollo di RT-PCR è stato avviato con le seguenti condizioni: un ciclo di retroscrittura a 42 °C per 45 minuti; un ciclo di denaturazione a 95 °C per 5 minuti; 40 cicli a 95 °C per 30 secondi, 55 °C per 30 secondi e 72 °C per 30 secondi; seguiti da un ciclo di elongazione finale a 72 °C per 10 minuti. I prodotti di RT-PCR ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su

gel di agarosio al 2%, successivamente colorato con SybrSafe e visualizzato mediante transilluminatore UV.

I prodotti di amplificazione di 37 campioni ottenuti mediante l'uso della coppia di primer appositamente disegnata sono stati purificati da gel mediante kit UltraClean® PCR Clean-Up kit (Mo-Bio Laboratories inc., USA) seguendo le indicazioni della casa produttrice:

- Aggiungere 3 volumi di ULTRASALT buffer nel tubo contenente il prodotto di PCR;
- Incubare a 55°C per 5 minuti;
- Aggiungere 6 µl di resina ULTRABIND (il DNA si legherà con la resina);
- Centrifugare a 11.000 g per 30 secondi e rimuovere del surnatante;
- Risospendere del pellet in 1 ml di buffer ULTRAWASH addizionato con etanolo;
- Centrifugare a 11.000 g per 5 secondi;
- Rimuovere il surnatante (in questa fase il DNA presente nel pellet è puro);
- Risospendere il pellet in 12 µl di H₂O per l'eluizione;
- Centrifugare a 11.000 g per 1 minuto;
- Recuperare velocemente l'acqua contenente il DNA.

I prodotti purificati sono stati sequenziati in entrambe le direzioni mediante sequenziatore ABI PRISM 3100 DNA (Applied Biosystems, USA, MA). Le sequenze ottenute sono state confrontate tra di loro attraverso l'algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) al fine di individuare il massimo grado di similarità e successivamente confrontate con sequenze note e già depositate in GenBank.

Infine, è stata effettuata l'inoculazione meccanica di 4 differenti campioni positivi, recuperati da 4 diverse serre, in 12 piante di pomodoro cv Marmande (3 piante per isolato). In dettaglio, ~200 mg di tessuto fogliare fresco di sono stati macinati in un mortaio a cui sono stati aggiunti 6 ml di tampone fosfato pH 7 (0,2 M NaH₂PO₄, 0,2 M Na₂HPO₄ x 7H₂O). L'omogenato è stato successivamente distribuito mediante sfregamento sulla superficie fogliare delle piantine precedentemente cosparse con carburo di silicio (Carborundum, 320 mesh) al fine di causare microlesioni e facilitare il passaggio dei virioni. Le piante inoculate sono state poste in terreno sterilizzato all'interno di serre con reti anti-insetto, con un fotoperiodo di 14 ore di luce ed una temperatura target di 28/20 °C giorno/notte. I sintomi sono stati registrati settimanalmente.

4.2.2 RACCOLTA MATERIALE VEGETALE

A partire dallo stesso mese di ottobre 2018 è stata avviata un'indagine in diverse aree della Sicilia e sono stati collezionati campioni con sintomi ascrivibili a ToBRFV (Figura 4).

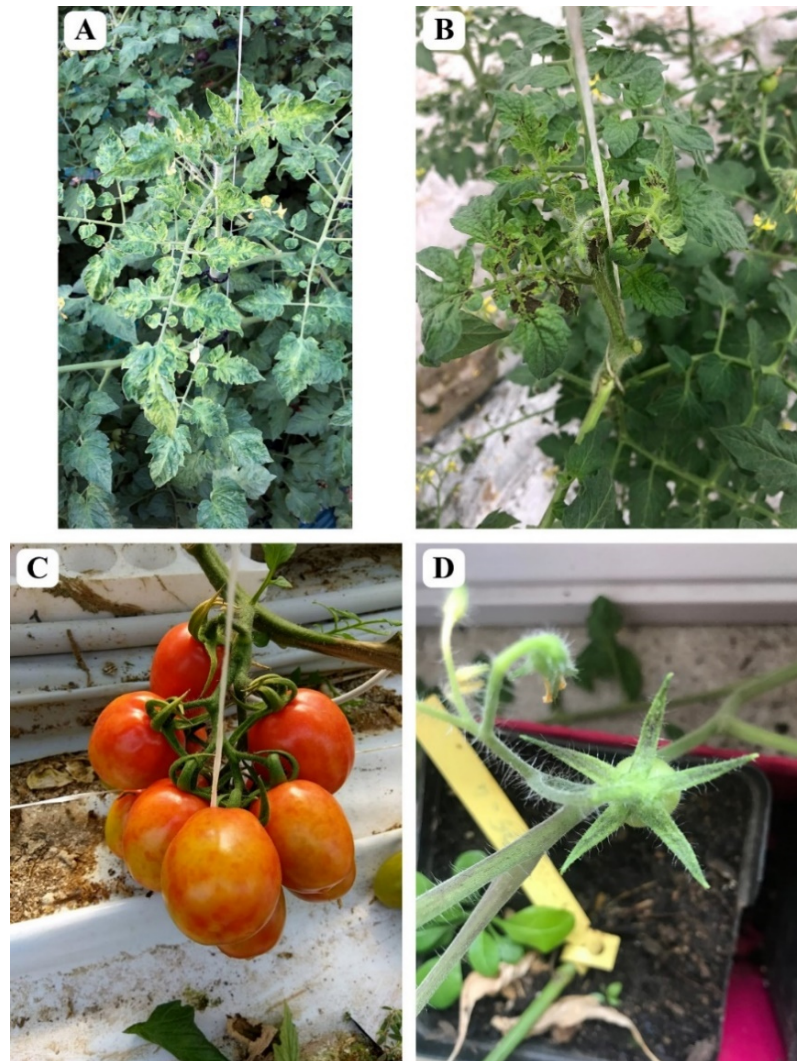


Figura 4 – Caratteristica sintomatologia causata *Tomato brown rugose fruit virus*. A: grave mosaico ed ingiallimenti a carico delle foglie adulte; B: deformazioni e necrosi su foglie giovani; C: decolorazione e marmorizzazione dei frutti; D: necrosi a carico dei sepali.

I campioni inclusi in questo studio sono stati raccolti da quattro differenti aree della Sicilia, all'interno delle province di Agrigento, Caltanissetta, Ragusa e Siracusa. Per ogni area, sono stati prelevati 15 campioni da due differenti serre, secondo il seguente schema: su 60 filari di piante, 3 sono stati selezionati (uno ogni 20 filari) e quindi, su ogni filare selezionato, è

stato prelevato un campione ogni 10 piante, per un totale di cinque campioni per filare (Panno *et al.*, 2019b). Il campionamento è stato ripetuto 3 volte: il primo campionamento a ottobre 2018, il secondo a dicembre 2018 e il terzo alla fine di febbraio 2019. Sono stati raccolti un totale di 360 campioni, geo-localizzati mediante applicazione mobile PLANTHOLOGY (Davino *et al.*, 2017b).

4.2.3 ANALISI DI TOBRFV MEDIANTE RT-PCR END POINT

La RT-PCR end point in one-step dei 360 campioni raccolti è stata eseguita in un volume finale di reazione di 25 µl contenenti 2 µl di RNA totale, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs, 1 mM di primer forward e 1 mM di primer reverse (Panno *et al.*, 2019b), 4U di RNaseOut (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), 20U di SuperScript II Reverse Transcriptase-RNaseH (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) e 2U di *Taq* DNA polimerasi (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). La reazione è stata eseguita in un termociclatore MultiGene OptiMax (Labnet International Inc, Edison, NJ, USA). Il protocollo di RT-PCR ha previsto le seguenti condizioni: 42 °C per 45 minuti, 95 °C per 5 minuti; 40 cicli a 95 °C per 30 secondi, 55 °C per secondi e 72 °C per 30 secondi e una fase di elongazione finale a 72 °C per 10 minuti.

I prodotti di RT-PCR ottenuti sono stati visualizzati in gel di agarosio al 1,5% successivamente colorato con SybrSafe (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) e visualizzato mediante transilluminatore UV.

4.2.4 TRASMISSIONE MECCANICA

Al fine di caratterizzare biologicamente l'isolato denominato ToB-SIC01/19 di ToBRFV riscontrato in Sicilia, questo è stato inoculato meccanicamente in tre distinti ospiti (*Solanum lycopersicum* L., *Solanum melongena* L. and *Capsicum annuum* L.) utilizzando tre piantine per ciascun ospite. Circa 200 mg di tessuto fogliare fresco proveniente da una pianta infetta ToB-SIC01/19 sono stati macinati in un mortaio a cui sono stati aggiunti 6 ml di tampone fosfato pH 7 (0,2 M NaH₂PO₄, 0,2 M Na₂HPO₄ x 7H₂O). L'omogenato è stato successivamente distribuito mediante sfregamento sulla superficie fogliare delle piantine precedentemente cosparse con carburo di silicio (Carborundum, 320 mesh) al fine di causare microlesioni e facilitare il passaggio dei virioni. Le piante sono state poste in terreno

sterilizzato all'interno di serre dotate di reti anti-insetto, con un fotoperiodo di 14 ore di luce ed una temperatura target di 28/20 °C giorno/notte. I sintomi sono stati registrati settimanalmente e la presenza di ToBRFV è stata valutata a 30 dpi (days post inoculation) mediante RT-PCR precedentemente descritta.

4.2.5 SEQUENZIAMENTO COMPLETO DEL GENOMA

Al fine di studiare meglio l'isolato virale presente in Sicilia è stato effettuato il sequenziamento completo del genoma mediante la strategia "primer walking" (Knippers & Alpert, 1999), utilizzando specifiche coppie di primer sviluppate da Luria e collaboratori (2017) (Figura 5). In dettaglio, sono state utilizzate quattro coppie di primer specifiche per ToBRFV: F-3666, R-4718, F1-R1572, F1534-R3733, F4587-R6392 (Tabella 3). La RT-PCR è stata eseguita in un termociclatore MultiGene OptiMax (Labnet International Inc, Edison, NJ, USA).

Per ottenere le terminazioni 3' e 5' del genoma è stata effettuata un'amplificazione delle estremità del cDNA mediante RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) con le seguenti coppie di primer: R-Ex-480, R-In-408, F-Ex-5931, F-In-6041 (Tabella 4), mediante kit SMARTer® RACE 5'/3' (Takara Bio, USA), seguendo le istruzioni della casa produttrice.

In dettaglio:

- Step 1: Preparazione della PCR Master Mix (15,5 µl PCR-Grade H₂O; 25 µl 2X SeqAmp Buffer; 1 µl SeqAmp DNA Polymerase) per ogni 50 µl di reazione PCR;
- Step 2: Preparazione della reazione di PCR (2,5 µl 5'- o 3'-RACE-Ready cDNA; 5 µl 10X UPM; 1 µl 5'- o 3'- Gene-Specific Primer [10µM]; 41,5 µl PCR Master Mix) in un volume finale di 50 µl.

Il protocollo della RACE ha previsto le seguenti condizioni: 25 cicli da 30 secondi a 94 °C, 30 secondi a 68 °C e 3 minuti a 72 °C.

Tutti i prodotti ottenuti sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 1.5 % colorato con SybrSafe. Tali prodotti estratti da gel sono stati purificati mediante kit commerciale UltraClean® PCR Clean-Up (Mo-Bio Laboratories Inc., USA), seguendo le indicazioni della casa produttrice, riportate di seguito:

- Aggiungere 3 volumi di ULTRASALT buffer nel tubo contenente il prodotto di PCR;
- Incubare a 55°C per 5 minuti;

- Aggiungere 6 µl di resina ULTRABIND (il DNA si legherà con la resina);
- Centrifugare a 11.000 g per 30 secondi e rimozione del surnatante;
- Risospendere il pellet in 1 ml di buffer ULTRAWASH addizionato con etanolo;
- Centrifugare a 11.000 g per 5 secondi;
- Rimuovere del surnatante (in questa fase il DNA presente nel pellet è puro);
- Risospendere del pellet in 12 µl di H₂O per l'eluizione;
- Centrifugare a 11.000 g per 1 minuto;
- Recuperare velocemente l'acqua contenente il DNA.

I prodotti purificati sono stati clonati mediante sistema TA-cloning (Promega, WIS, USA). Il protocollo ha previsto l'impiego del plasmide pGEM®-T e 2X Rapid Ligation Buffer. Il primo step ha richiesto una centrifugazione rapida del plasmide pGEM®-T e del control insert DNA nonché una rapida agitazione mediante vortex del 2X Rapid Ligation Buffer prima dell'uso; successivamente, la reazione di ligazione (5 µl 2X Rapid Ligation Buffer/T4 DNA Ligase, 1 µl pGEM®-T, 3 µl prodotto di PCR, 1 µl T4 DNA Ligase (3 U/µl) è stata posta in tubi da 0,2 ml ed incubata overnight ad una temperatura di 4 °C.

La successiva trasformazione è stata effettuata mediante cellule competenti ad alta efficienza di *Escherichia coli*, ceppo DH5α. Il protocollo di trasformazione ha previsto le seguenti fasi:

- Preparazione di piastre con LB-agar, ampicillina e 40 µl di X-Gal per ogni reazione di ligazione e per determinare l'efficienza di trasformazione;
- Centrifugazione dei tubi contenenti le reazioni di ligazione al fine di recuperare il contenuto sul fondo. Sono stati posti successivamente 2 µl di ogni reazione di ligazione all'interno di un tubo sterile da 1,5 ml in ghiaccio; al fine di determinare l'efficienza di trasformazione delle cellule competenti sono stati trasferiti in un altro tubo 0,1 ng di plasmide non tagliato;
- 50 µl di cellule competenti sono stati trasferiti in ogni tubo con i prodotti di ligazione;
- i tubi sono stati posti ad incubare per 20 minuti in ghiaccio;
- a seguito di shock termico (45-50 secondi a 42°C e successivamente in ghiaccio per 2 minuti) i prodotti di ligazione sono stati trasferiti all'interno delle cellule competenti;

- le cellule ottenute sono state incubate in LB (Luria broth) e poste in agitazione per 1 ora a 37 °C;
- terminata l'incubazione, le colture liquide sono state trasferite in piastre contenenti LB-agar, nelle quali, precedentemente, era stata aggiunta ampicillina e 40 µl di X-Gal;
- le piastre ottenute sono state incubate a 37 °C per 16 ore.

Le colonie di colore bianco che presumibilmente dovrebbero contenere l'amplicone desiderato sono state poste in LB (Luria Bertani broth) ed incubate a 37 °C in agitazione per circa 12 ore. Successivamente sono stati estratti i plasmidi mediante kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Germany) seguendo le istruzioni della ditta produttrice, riportate di seguito:

- Centrifugare 5 ml del brodo di coltura in LB a 5.000 g per 10 minuti;
- Eliminare il surnatante lasciandone ~1,5 ml per risospendere il pellet, centrifugare a 11.000 g per 30 secondi ed eliminare il surnatante residuo;
- Aggiungere 250 µl di Buffer A1 e risospendere il pellet;
- Aggiungere 250 µl di Buffer A2 ed invertire delicatamente i tubi 6-8 volte; incubazione a temperatura ambiente per almeno 5 minuti fino a che il lisato appare trasparente;
- Aggiungere 300 µl di Buffer A3 ed invertire vigorosamente i tubi 6-8 volte;
- Centrifugare il lisato a 11.000 g per 5 minuti;
- Dispensare il campione su colonnina NucleoSpin Plasmid, centrifugare a 11.000 g per 1 minuto ed eliminare lo scarto (flow-through);
- Aggiungere 600 µl di Buffer A4 all'interno della colonnina NucleoSpin Plasmid, centrifugare a 11.000 g per 1 minuto ed eliminare lo scarto (flow-through);
- Centrifugare a 11.000 g per 2 minuti al fine di rimuovere completamente ogni traccia del Buffer A4;
- Eluire il DNA aggiungendo 50 µl di Buffer AE all'interno della colonnina posta all'interno di un tubo sterile da 1,5 ml, successiva incubazione a temperatura ambiente (18-25 °C) per 1 minuto e centrifugazione a 11.000 g per 1 minuto.

Per ogni prodotto sono stati selezionati cinque plasmidi e quantificati mediante spettrofotometro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, MA, USA). Gli inserti all'interno dei plasmidi sono stati sequenziati in entrambe le direzioni mediante sequenziatore ABI PRISM 3100 DNA (Applied Biosystems, CA, USA).

Tabella 3 – Set di primer utilizzati in RT-PCR per ottenere la sequenza completa di ToBRFV (Luria *et al.*, 2017).

Nome primer	Posizione nucleotidica (nt)	Sequenza (5'-3')
F-3666	3666	ATGGTACGAACGGCGGCAG
R-4718	4718	CAATCCTTGATGTGTTTAGCAC
F-1	1	GTGTATTTTTTACAACATATACCAAC
R-1572	1572	CTAATGCGTCTCCCGACT
F-1534	1534	AGATTTCCCTGGCTTTTGGA
R-3733	3733	ATCATCGCCACCAAATTTTC
F-4587	4587	CCAACCTTATGTGGAATTTTCG
R-6392	6392	GAACCCCGGTAGGGGCCCA

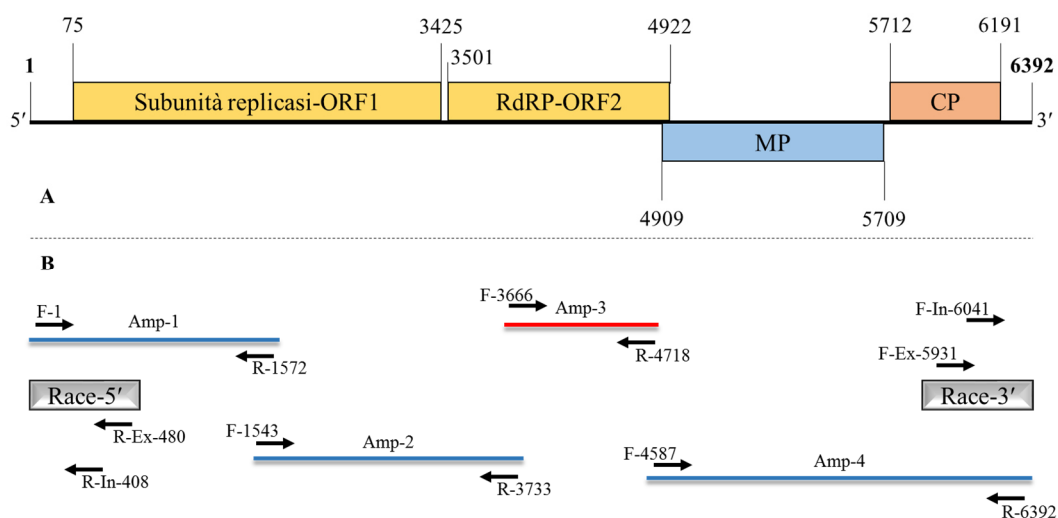


Figura 5 – Rappresentazione schematica dell'organizzazione genomica e strategia di sequenziamento per il recupero della sequenza del genoma dell'isolato di tobamovirus. (A) Organizzazione del genoma mostrante i quattro ORF previsti. I valori agli estremi di ciascun ORF rappresentano la posizione nucleotidica dei codoni di inizio e di fine di ciascun ORF. (B) RT-PCR e set di primer impiegati per mappare e validare il genoma virale completo. Le linee grigie rappresentano le RACE 5' e 3' utilizzate per ottenere entrambe le regioni virali non tradotte (UTR).

Tabella 4 – Set di primer utilizzati per l’amplificazione mediante RACE del genoma di ToBRFV (Luria *et al.*, 2017).

Nome primer	Posizione nucleotidica (nt)	Sequenza (5'-3')
R-Ex-480	480	TTATGTCGCGGACATCAAGA
R-In-408	408	GTGAACATATGCCCGTCCTT
F-Ex-5931	5931	ACAATGCGGTACTAGATCCTCT
F-In-6041	6041	GACGCAACGGTGGCTATAAG

Al fine di ottenere *de novo* la sequenza full-length del genoma di ToBRFV, tutte le sequenze ottenute di ogni regione sono state assemblate mediante programma ContigExpress, implementato nel programma Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen, CA, USA). Il modulo ContigExpress consente all’utente di assemblare piccoli frammenti di DNA in sequenze contigue più lunghe, comunemente denominate “contigs”, in formato testo o cromatogramma. La sequenza completa ottenuta è stata confrontata con le altre sequenze depositate in GenBank.

4.2.6 DISEGNO DEI PRIMER, SONDA TAQMAN MGB E SCELTA DELLA MIGLIOR COPPIA DI PRIMER

Quattro sequenze complete del genoma di ToBRFV recuperate da GenBank (Numeri di accessione: MK133095, MK133093, KT383474, KX619418) e la sequenza assemblata nel presente lavoro sono state allineate mediante il programma ClustalX2 (Larkin *et al.*, 2007) al fine di disegnare diverse coppie di primer specifiche per il rilevamento di ToBRFV. I primer ottenuti sono stati testati *in vitro* mediante algoritmo Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) al fine di valutare la possibilità di ibridazione con altri organismi. Gli stessi primer sono stati inoltre testati mediante programma Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen, CA, USA) con le sequenze complete dei tobamovirus più affini, al fine di valutare la percentuale di omologia con essi. I tobamovirus inclusi nella seguente analisi sono stati: *Bell pepper mottle virus* (1 sequenza), *Brugmansia mild mottle virus* (1 sequenza), *Obuda pepper virus* (2 sequenze), *Paprika mild mottle virus* (2 sequenze), *Pepper mild mottle virus* (13 sequenze), *Rehmannia mosaic virus* (6 sequenze), *Tobacco mild green mosaic virus* (7 sequenze), *Tobacco mosaic virus* (10 sequenze), *Tomato mottle mosaic virus* (5 sequenze) and *Tomato mosaic virus* (10 sequenze).

Sono state ottenute un totale di 5 coppie di primer, le quali sono state testate mediante real-time RT-PCR con SYBR Green per valutare quale coppia ha il valore di Ct più basso. La real time RT-PCR è stata eseguita in un termociclatore Q2plex HRM Platform (Qiagen, Hilden, Germany), in un volume finale di reazione di 20 µl, contenente 1 µl di RNA totale (~10 ng RNA/µl) estratto da piante infette con ToB-SIC01/19, 1 mM di ciascun primer, 10 µl di Master mix QuantiNOVA SYBR Green (Qiagen, Hilden, Germany) e H₂O Dietilpirocarbonato (DEPC). RNA estratto da pianta di pomodoro sana e acqua sono stati utilizzati come controlli negativi. Ogni campione è stato analizzato in duplicato. Il protocollo di reazione ha previsto una fase di retrotrascrizione a 48 °C per 10 minuti, una fase di incubazione a 95 °C per 5 minuti, 45 cicli da 95 °C per 2 secondi e 62 °C per 20 secondi, con acquisizione della fluorescenza alla fine di ogni ciclo. Gli step per la curva di melting sono stati aggiunti alla fine del protocollo, di seguito descritti: 95 °C per 1 minuto, 40 °C per 1 minuto, 70 °C per 1 minuto e un aumento di temperatura fino a 95 °C con incremento di 0,5 °C/s per step.

Successivamente è stata disegnata una sonda TaqMan MGB specifica per ToBRFV in un dominio conservato all'interno della regione compresa dai primer. La sonda, con una lunghezza di 22 nucleotidi, è stata marcata all'estremità 5' con un reporter FAM (6-carboxyfluorescein) e all'estremità 3' con un non-fluorescent quencher (MGB NFQ). Le sonde di tipo TaqMan MGB includono un motivo all'estremità 3' (Minor Groove Binder – MGB) che permette di aumentare la temperatura di melting (T_m) della sonda e stabilizza gli ibridi sonda/target, fornendo una migliore discriminazione di sequenza.

I primer e la sonda sono stati disegnati in modo da avere valori di T_m di 59-60 °C e 67 °C, rispettivamente, calcolati mediante programma Primer Express Software v3.0.1. (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Le sequenze dei primer e della sonda sono riportate in Tabella 10.

4.2.7 MESSA A PUNTO DELLA REAL TIME RT-PCR CON SONDA TAQMAN MGB PER IL RILEVAMENTO DI TOBRFV

Il saggio real-time RT-PCR con sonda TaqMan MGB è stato eseguito in un termociclatore Rotor-Gene Q2plex HRM Platform (Qiagen, Hilden, Germany) in 12 µl di volume finale di reazione, contenente 1 µl of RNA totale alla concentrazione di ~10 ng RNA/µl, 0.5 µM di

primer forward e primer reverse, utilizzando la coppia di primer che ha restituito il Ct più basso (vedi paragrafo precedente), 0.25 μ M di sonda TaqMan MGB, 0.5 μ l di RNase Inhibitor (Applied Biosystems), 6 μ l di 2X QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix, 0.2 μ l di QN Probe RT-Mix e H₂O DEPC per raggiungere il volume finale. Per eseguire questo saggio, è stato utilizzato l'RNA totale estratto da 5 piante infette con ToBRFV e 8 da piante di pomodoro infettate con *Cucumber green mottle virus* (CGMV), *Paprika mild mottle virus* (PaMMV), *Pepper mild mottle virus* (PMMV), *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) e *Zucchini green mottle mosaic virus* (ZGMMV). I campioni di controllo in ciascuna analisi includevano l'RNA totale estratto da una pianta di pomodoro sana, acqua in sostituzione del campione e almeno due diluizioni di un RNA trascritto (vedere paragrafo successivo).

Ogni campione è stato analizzato in duplicato in due saggi real-time RT-PCR indipendenti. Le sonde TaqMan MGB incorporano un NFQ per assorbire (estinguere) il segnale del fluorescent dye posto all'estremità 3' della sonda. Le proprietà del non-fluorescent quencher combinate con la lunghezza della sonda MGB producono un rumore di fondo inferiore rispetto alle sonde NFQ non MGB. Un limitato rumore di fondo si traduce in una maggiore sensibilità e precisione.

Il protocollo di reazione ha previsto una fase di retrotrascrizione a 45 °C per 10 min, una fase di denaturazione dell'enzima a 95 °C per 10 min, e 45 cicli a 95 °C per 5 sec e 60 °C per 60 sec con acquisizione della fluorescenza alla fine di ogni ciclo. Il valore medio (X) Ct e la deviazione standard (SD) per ciascun campione di pomodoro sono stati calcolati a partire dai quattro valori di Ct ottenuti.

4.2.8 CURVA STANDARD

Al fine di generare una curva standard e per determinare la sensibilità del protocollo real-time RT-PCR con sonda TaqMan MGB, sono state utilizzate le diluizioni seriali dei trascritti *in vitro* di uno specifico tratto dell'RNA genomico che codifica per la proteina di movimento.

Il "templato" per la trascrizione *in vitro* è stato ottenuto mediante RT-PCR end point, utilizzando l'RNA totale estratto da piccioli fogliari provenienti da piante di pomodoro

infettate artificialmente con l'isolato siciliano ToB-SIC01/19. L'amplicone è stato clonato su vettore plasmidico pGEM-T, linearizzato mediante l'impiego dell'enzima *SalI* e trascritto *in vitro* mediante T7 RNA polimerasi (New England Biolabs, MA, USA), seguendo le istruzioni della casa produttrice. In dettaglio, la miscela di reazione (Tabella 5) è stata posta in tubi da 0,2 ml ed incubata per 1 ora ad una temperatura di 37 °C.

Tabella 5 – Miscela di reazione per la trascrizione *in vitro* mediante T7 RNA polimerasi.

Componenti di reazione	Reazione standard	Concentrazione
H ₂ O	X µl	
10X Reaction Buffer	2 µl	
NTP	X µl	0.5 mM
DNA	X µl	0.2–1 µg
T7 RNA Polimerasi	2 µl	
Volume finale	20 µl	

I trascritti ottenuti sono stati trattati due volte con RNase-free DNase (10 U/µl) (Turbo DNA-free, Ambion), incubati a 37 °C per 10 minuti e posti in ghiaccio. Successivamente sono stati purificati mediante RNaid Spin kit (Bio101, CA, USA), secondo le istruzioni della casa produttrice:

- Aggiungere 3 volumi di RNA Binding Salt e miscelare;
- Stimare la quantità di trascritto e aggiungere 1-2 µl di RNAMATRIX® per µg di RNA (minimo 5µl di RNAMATRIX®). Mescolare bene e incubare a temperatura ambiente per 5 minuti per consentire l'adsorbimento dell'RNA alla matrice;
- Centrifugare a 20.000 g per 1 minuto ed eliminare il surnatante;
- Effettuare due lavaggi con 500 µl di Wash Solution e risospendere il pellet completamente mediante pipettaggio. Centrifugare a 20.000 g e rimuovere il surnatante;
- Rimuovere le tracce residue di liquido ed eluire l'RNA con un volume adeguato di H₂O DEPC risospendendo accuratamente il pellet e incubando a 50 ° C per 3 minuti. Centrifugare per 1 minuto e rimuovere il surnatante contenente l'RNA.

La concentrazione dei trascritti è stata determinata in duplicato mediante spettrofotometro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

Per le analisi in real-time RT-PCR con sonda TaqMan MGB sono state utilizzate 10 diluizioni decimali seriali di ogni trascritto (contenenti da 10^{10} a 10^1 copie) in RNA totale estratto da piante di pomodoro sane ($10 \text{ ng}/\mu\text{l}$), con e senza trascrittasi inversa.

La concentrazione (pmol) dell'RNA trascritto in ogni diluizione è stata calcolata con la seguente formula:

$$\mu\text{g RNA trascritto} \times \frac{106 \text{ pg}}{1 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ pmol}}{340 \text{ pg}} \times \frac{1}{n. \text{ basi del trascritto}}$$

mentre il numero di copie di RNA è stato ottenuto utilizzando il valore della concentrazione, precedentemente calcolato, moltiplicato per la costante di Avogadro.

La curva standard è stata calcolata incrociando i valori di Ct (cycle threshold), ottenuti da due diversi test con 4 replicazioni per diluizione standard, con il logaritmo della concentrazione di RNA presente nelle diluizioni seriali.

L'efficienza di amplificazione (E), rappresentata dalla pendenza della curva è stata calcolata utilizzando la formula $10^{(-1/\text{pendenza della curva standard})}$. L'accuratezza della retta di calibrazione è stata verificata valutando il valore del coefficiente di correlazione R^2 della retta. Quanto più R^2 è prossimo al valore "1" tanto più la retta riproduce l'andamento dei dati sperimentali.

4.2.9 DIFFERENTI METODI DI PREPARAZIONE DEL CAMPIONE E COMPARAZIONE DI DIFFERENTI TECNICHE PER IL RILEVAMENTO DI TOBRFV

Al fine di valutare il miglior metodo di preparazione del campione, 40 dei 360 campioni precedentemente analizzati mediante RT-PCR end-point (10 per provincia), piante di pomodoro infette con l'isolato siciliano ToB-SIC01/19 caratterizzato nel presente lavoro e un controllo negativo di pianta di pomodoro sono stati usati per valutare quattro differenti procedure di preparazione del campione. Inoltre, i risultati ottenuti sono stati confrontati con le tecniche DAS-ELISA e RT-PCR end point.

1) Immunocattura in piastre da Real Time RT-PCR: Una piastra da 96 pozzetti per real-time PCR è stata incubata a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ per 1 ora con $100 \mu\text{l}$ di una soluzione di anticorpi policlonali per *Tobacco mosaic virus* (TMV) (AGDIA, IN, USA) in diluizione 1:200 in coating buffer (Carbonato di sodio anidro 1.59 g, Bicarbonato di sodio 2.93 g, Sodio azide 0.2 g in 1 L di H_2O distillata, pH 9.6). Come riportato dal protocollo della casa produttrice,

questi anticorpi reagiscono con diversi virus appartenenti al genere *Tobamovirus*, come *Cucumber green mild mottle virus* (CGMMV), *Kyuri green mottle mosaic virus* (KGMMV), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) e *Tomato mosaic virus* (ToMV).

Dopo l'incubazione sono stati effettuati tre lavaggi. Successivamente, 100 µl di ciascun campione, ottenuto macinando i piccioli fogliari con extraction buffer (1.3 g di Sodio solfito anidro, 20 g di Polivinilpirrolidone (PVP) MW 24-40,000, 2 g di siero albumina Grade II, 20 g di Tween-20 disciolti in 1 L di H₂O distillata, pH 7.4) sono stati caricati nella piastra. Dopo un'incubazione di 1 h a temperatura ambiente la piastra è stata lavata con washing buffer, asciugata e preparata per le successive analisi.

2) Estrazione RNA totale: l'RNA totale dei campioni oggetto di studio è stato estratto da 100 mg di picciolo fogliare mediante kit commerciale RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) seguendo le istruzioni della casa produttrice, come descritto precedentemente. L'RNA estratto è stato risospeso in 30 µl di RNase-free water, quantificato mediante spettrofotometro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) e portato ad una concentrazione di ~10 ng/µl.

3) Estrazione diretta da picciolo: una porzione di ~ 0.4 mm di picciolo fogliare è stata posta direttamente all'interno di un tubo Eppendorf da 1.5 ml contenente 0.5 ml di Glycine buffer (EDTA 1 mM, NaCl 0.05 M, Glicina 0.1 M), messo in agitazione tramite vortex per 30 secondi ed incubato a 95 °C per 10 minuti. Per le successive analisi sono stati utilizzati 3 µl dell'estratto.

4) Impronta su membrane di nylon: 5 piccioli fogliari per ogni campione sono stati tagliati ed impressi a formare un singolo spot in un riquadro delle dimensioni di 1 cm² di membrana di nylon Hybond®-N+ hybridization membrane (GE Healthcare, IL, USA). L'impronta ottenuta, una volta asciugata a temperatura ambiente, è stata posta all'interno di un tubo Eppendorf da 1.5 ml contenente 1 ml di Glycine buffer. I tubi sono stati messi in agitazione mediante vortex per 30 secondi e riscaldati a 95 °C per 10 minuti. Sono stati utilizzati 3 µl di estratto per le successive analisi.

I 42 campioni preparati con le diverse metodiche appena descritte sono stati testati mediante DAS-ELISA, impiegando un kit commerciale di anticorpi policlonali per *Tobacco mosaic virus* (TMV) il quale ha l'abilità di rilevare anche il ToBRFV (AGDIA, IN, USA), mediante

RT-PCR end-point utilizzando la coppia di primer TBRFV-F-5722/TBRFV-R-6179 e mediante Real Time RT-PCR-MGB-probe seguendo i protocolli precedentemente descritti. In base ai risultati ottenuti, al fine di confermare l'assenza di falsi positivi nel saggio real time RT-PCR, i prodotti di amplificazione dei campioni 1A, 3C, 7R, 8R e 9R, ottenuti partendo da estrazione diretta da picciolo e impronta su membrana di nylon, sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% e visualizzati mediante transilluminatore UV.

Il protocollo DAS-ELISA ha previsto le seguenti fasi:

- incubazione della piastra di polistirene a 37 °C per 4 ore con 100 µl di una soluzione di anticorpi policlonali per *Tobacco mosaic virus* (TMV) (AGDIA, IN, USA) in diluizione 1:200 in coating buffer (Carbonato di sodio anidro 1.59 g, Bicarbonato di sodio 2.93 g, Sodio azide 0.2 g in 1 L di H₂O distillata, pH 9.6).
- Quattro lavaggi da 5 minuti ciascuno con PBST buffer (wash buffer) (8 g NaCl, 1,15 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄, 0,2 KCl, 0,5 g Tween-20 disciolti in 1 l di H₂O, pH 7,4);
- 100 µl di ciascun campione macinato con extraction buffer (1.3 g di Sodio solfito anidro, 20 g di Polivinilpirrolidone (PVP) MW 24-40,000, 2 g di siero albumina Grade II, 20 g di Tween-20 disciolti in 1 L di H₂O distillata, pH 7.4) sono stati caricati nella piastra ed incubati overnight a 4 °C;
- Quattro lavaggi da 5 minuti ciascuno con Washing buffer;
- incubazione della piastra 37°C per 4 ore con 100 µl di una soluzione di anticorpi coniugati per *Tobacco mosaic virus* in diluizione 1:200 in conjugate buffer (2 g BSA, 20 g di Polivinilpirrolidone (PVP) MW 24-40,000, 0,2 g di Sodio azide disciolti in 1 l di 1X PBST, pH 7,4);
- Quattro lavaggi da 5 minuti ciascuno con PBST buffer (wash buffer);
- Aggiunta di 100 µl di substrato PNP per ogni pozzetta;
- Lettura della piastra a 10, 30 e 60 minuti mediante spettrofotometro a 405 nm.

Il protocollo della RT-PCR end point in one-step, eseguita in un volume finale di reazione di 25 µl ha previsto le seguenti condizioni:

- 42 °C per 45 minuti;
- 95 °C per 5 minuti;

- 40 cicli a 95 °C per 30 secondi, 55 °C per secondi e 72 °C per 30 secondi;
- 72 °C per 10 minuti.

I prodotti di RT-PCR ottenuti sono stati visualizzati in gel di agarosio al 1.5% successivamente colorato con SybrSafe (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) e visualizzato mediante transilluminatore UV.

4.2.10 DISPERSIONE NELL'AREALE SICILIANO DI TOBRFV

Al fine di studiare lo stato attuale della dispersione di ToBRFV in Sicilia, sono stati prelevati ed analizzati un totale di 3.000 campioni, costituiti da lotti di seme, plantule e piante adulte di pomodoro di diverse varietà commerciali e provenienti da diverse località. I campionamenti sono iniziati a ottobre 2018 e interrotti a fine ottobre 2019.

Per quanto concerne i campioni costituiti da piante adulte, i campionamenti sono stati effettuati in 20 aziende dislocate in quattro differenti aree della Sicilia, precisamente nelle province di Ragusa, Agrigento, Siracusa e Caltanissetta; sono stati prelevati un totale di 1.000 campioni. Si è proceduto inizialmente ad effettuare un report fotografico di tutte le piante oggetto di campionamento (Figura 6). Per ciascuna provincia sono state individuate 5 aziende (Tabella 6); per ogni azienda, sono stati prelevati un totale di 50 campioni, secondo il seguente schema: su 100 filari di piante, ne sono stati selezionati 10 (uno ogni 10 filari). Quindi, su ciascun filare selezionato sono stati prelevati campioni fogliari a partire sia da piante sintomatiche che asintomatiche, per un totale di 5 piante per filare selezionato.

Per i campioni costituiti da seme, sono stati analizzati un totale di 100 lotti provenienti da 20 diverse ditte sementiere (5 lotti per ditta). Il campionamento ha previsto le seguenti modalità: da ogni lotto di seme omogeneo sono stati prelevati ~3.000 semi (quantità fisicamente identificabile ed uniforme) i quali costituivano un campione. Ogni lotto prelevato è stato successivamente suddiviso in 10 subcampioni costituiti da 300 semi cadauno al fine di avere una maggiore probabilità di individuare anche pochi semi infetti. Ad ogni campione e subcampione sono stati assegnati i relativi codici identificativi.

Infine, per quanto concerne le plantule, sono stati analizzati un totale di 1.000 campioni. I prelievi sono stati effettuati in 10 diversi vivai ricadenti nelle province di Ragusa, Agrigento e Siracusa; ogni campione era costituito da 5 foglie raccolte da 5 piante diverse dello stesso lotto.

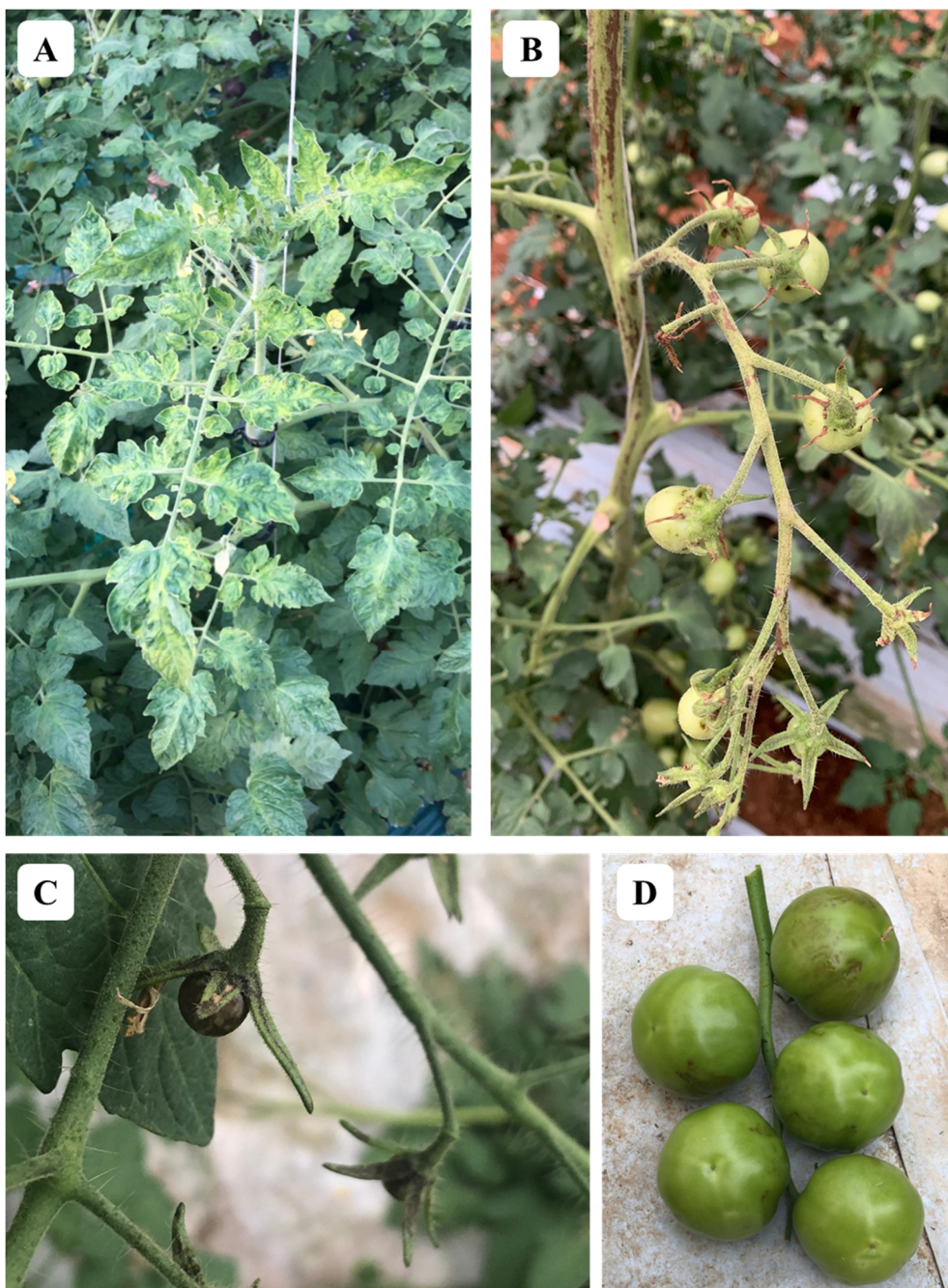


Figura 6 – Sintomi riscontrati su piante di pomodoro durante i campionamenti effettuati nel periodo ottobre 2018/ottobre 2019 A: grave mosaico ed ingiallimenti a carico delle foglie adulte; B: necrosi su piccoli frutti, sepali e rametti; C: necrosi a carico dei sepali; D: decolorazione e marmorizzazione dei frutti.

Tabella 6 – Dati relativi al campionamento delle piante adulte di pomodoro.

Provincia	Identificativo azienda	Codice campione	N° piante prelevate	Totale piante prelevate/azienda
Ragusa	Azienda 1R	1R1 – 1R10	50	250
	Azienda 2R	2R1 – 2R10	50	
	Azienda 3R	3R1 – 3R10	50	
	Azienda 4R	4R1 – 4R10	50	
	Azienda 5R	5R1 – 5R10	50	
Agrigento	Azienda 1A	1A1 – 1A10	50	250
	Azienda 2A	2A1 – 2A10	50	
	Azienda 3A	3A1 – 3A10	50	
	Azienda 4A	4A1 – 4A10	50	
	Azienda 5A	5A1 – 5A10	50	
Siracusa	Azienda 1S	1S1 – 1S10	50	250
	Azienda 2S	2S1 – 2S10	50	
	Azienda 3S	3S1 – 3S10	50	
	Azienda 4S	4S1 – 4S10	50	
	Azienda 5S	5S1 – 5S10	50	
Caltanissetta	Azienda 1C	1C1 – 1C10	50	250
	Azienda 2C	2C1 – 2C10	50	
	Azienda 3C	3C1 – 3C10	50	
	Azienda 4C	4C1 – 4C10	50	
	Azienda 5C	5C1 – 5C10	50	
Totale piante adulte prelevate				1.000

Tutti i campioni prelevati sono stati registrati e geo-referenziati tramite l'applicazione Planthology (Davino *et al.*, 2017b) e a ciascuno di essi è stato associato un codice identificativo univoco.

Per diritto alla riservatezza e alla protezione dei dati personali, non vengono riportati i dati relativi alle varietà di pomodoro analizzate e alle aziende che hanno fornito i campioni.

Per tutti i campioni è stata effettuata l'immobilizzazione su membrana di nylon; nel caso dei campioni costituiti da piante adulte, da ognuno di esso sono stati prelevati ~100 mg di tessuto fogliare fresco per la successiva fase di immobilizzazione. Tale procedura ha previsto le seguenti fasi:

- ogni campione è stato posto all'interno di un sacchetto di estrazione (BIOREBA AG, Switzerland), nel quale sono stati aggiunti 3-5 ml di tampone di estrazione (1.3 g di

Sodio solfito anidro, 20 g di Polivinilpirrolidone (PVP) MW 24-40,000, 2 g di siero albumina Grade II, 20 g di Tween-20 disciolti in 1 L di H₂O distillata, pH 7.4);

- i campioni sono stati quindi omogeneizzati mediante omogeneizzatore HOMEX 6 (BIOREBA AG, Switzerland);
- da ogni campione sono stati prelevati 3 µl, con i quali è stato eseguito uno spot su membrana di nylon Hybond®-N+ hybridization membrane (GE Healthcare. IL, USA).

Una volta asciugato a temperatura ambiente, lo spot ottenuto è stato ritagliato mediante bisturi sterile e posto all'interno di un tubo Eppendorf sterile da 2 ml contenente 500 µl di Glycine buffer (1 M EDTA; 0.05 M NaCl; 0.1 M glicina); i tubi contenenti gli spot su membrana in Glycine buffer sono stati messi in agitazione per 30 secondi mediante vortex e incubati a 95 °C per 10 minuti. Infine, sono stati utilizzati 3 µl di tale miscela per la successiva analisi real time RT-PCR seguendo il protocollo precedentemente descritto.

4.3 RISULTATI

4.3.1 PRIMO CASO DI *TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS* SU POMODORO IN ITALIA

Trentasette campioni su 40 analizzati sono risultati positivi solamente a ToBRFV. Al fine di confermare la presenza di ToBRFV nei campioni analizzati, è stata disegnata una nuova coppia di primer specifica per una porzione del gene che codifica per la proteina di rivestimento (Coat protein – CP) (Figura 7), denominati TBRFV-F-5722 e TBRFV-R-6179 (Tabella 7).

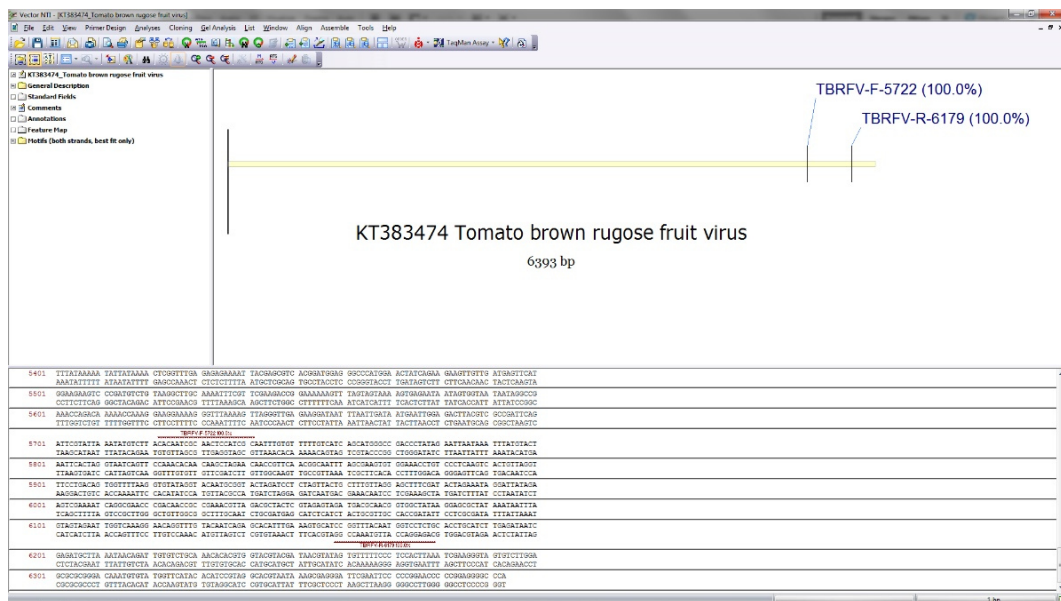


Figura 7 – Screenshot del programma Vector NTI con sequenza di riferimento (Acc. No. KT383474) e primer appositamente disegnati per il rilevamento di ToBRFV mediante RT-PCR end point.

Tabella 7 – Coppia di primer specifica per *Tomato brown rugose fruit virus*.

Primer	Sequenza	Regione target	Dimensione amplicone (nt)	Sequenza di riferimento (Acc. No.)
TBRFV-F-5722	5'-CACAAATCGCAACTCCATCGC-3'	5722-5742	478	KT383474
TBRFV-R-6179	5'-CAGAGGACCATTGTAAACCGG-3'	6179-6200		

Dalla RT-PCR end point con la nuova coppia di primer è stato ottenuto l'amplicone della dimensione attesa di 478 bp (Figura 8) confermando i risultati precedentemente ottenuti con la coppia di primer F-3666/R-4718 (Luria *et al.*, 2017).

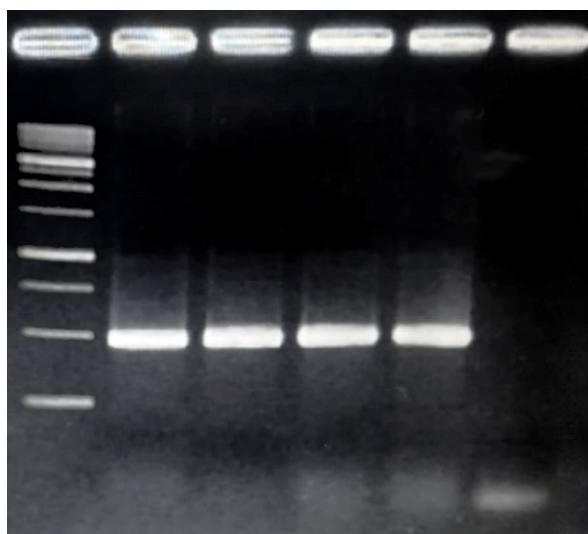


Figura 8 – Gel di agarosio al 2% colorato con SybrSafe mostrante l’esito positivo di alcuni campioni analizzati per ToBRFV utilizzando la coppia di primer TBRFV-F-5722/TBRFV-R-6179. Marker 1Kb DNA Ladder (Nippon Genetics).

Le sequenze ottenute dai 37 campioni hanno mostrato un grado di omologia del 99% tra di loro. L’analisi mediante algoritmo BLAST ha mostrato una omologia >99% con gli isolati ToBRFV Tom1-Jo (Acc. No. KT383474) e TBRFV-IL (Acc. No. KX619418). È stata quindi depositata una sola sequenza in GenBank con il numero di accessione MK313803.

Tutte le 12 piante di pomodoro cv. Marmande inoculate meccanicamente hanno mostrato i sintomi precedentemente descritti causati da ToBRFV a 30 dpi (days post inoculation).

Questa è stata la prima segnalazione di ToBRFV in Italia e nel sud Europa.

4.3.2 ANALISI PRELIMINARE PER TOBRFV MEDIANTE RT-PCR END POINT

Dalle analisi effettuate mediante RT-PCR end point, eseguite a partire dall’RNA totale estratto dai campioni prelevati, è stato possibile confermare come 129 dei 360 campioni di pomodoro analizzati sono risultati positivi a ToBRFV, ovvero il 35.83%. In Tabella 8 vengono riportati il numero di piante infette per provincia. L’incidenza di ToBRFV è stata più elevata nelle serre situate nelle province di Ragusa e Siracusa, con una percentuale di infezione, rispettivamente, del 93,3% e del 70%, rispetto alle serre situate nelle province di Agrigento e Caltanissetta, con una percentuale di piante infette del 16,6% e 6,66%, rispettivamente.

Analizzando i tre campionamenti eseguiti nelle 4 province, la malattia ha mostrato un trend negativo. In particolare, nella provincia di Ragusa vi è stata una diminuzione dal 93,3% del primo campionamento al 63,3% del terzo campionamento; nella provincia di Siracusa dal 70% al 40% e Agrigento e Caltanissetta dal 16,6% e il 6,6%, rispettivamente, a zero.

Tabella 8 – Risultati RT-PCR end point per ToBRFV.

Provincia	Numero piante infette/piante analizzate		
	Ottobre 2018	Dicembre 2018	Febbraio 2019
Agrigento	2/30	0/30	0/30
Caltanissetta	5/30	0/30	0/30
Ragusa	28/30	22/30	19/30
Siracusa	21/30	20/30	12/30

4.3.3 TRASMISSIONE MECCANICA

L'isolato siciliano ToB-SIC01/19 è stato trasmesso con successo mediante inoculazione meccanica in tutte le piante di *Solanum lycopersicum* e *Capsicum annuum*, mentre non vi è stata nessuna trasmissione in *Solanum melongena* (Tabella 8).

Le piante di pomodoro inoculate non hanno mostrato alcun sintomo fino a 22 dpi. Dal 22° giorno, le piante di pomodoro hanno iniziato a mostrare gradualmente un ingiallimento internervale, deformazione e mosaico a carico delle giovani foglie. Nelle piante di peperone inoculate, i sintomi sono comparsi dopo 23 dpi e consistevano in un leggero ingiallimento internervale sulle giovani foglie e necrosi a carico dello stelo. Dopo 30 dpi, è stata confermata, mediante RT-PCR end point, la presenza di ToBRFV nelle piante di pomodoro e peperone e l'assenza nelle piante di melanzana (Tabella 9).

Tabella 9 – Inoculazione meccanica e sintomi causati dall'isolato ToB-SIC01/19 isolate su specie differenti.

Specie	Tempo dopo l'inoculazione (settimane)					RT-PCR	% piante infette
	1	2	3	4	5		
<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-	-	Ii, Mfg	Ii, Mfg, Dfg	+	100%
<i>Capsicum annuum</i>	-	-	-	Iil	Iil, Ns	+	100%
<i>Solanum melongena</i>	-	-	-	-	-	-	-

Ii: ingiallimento internervale; Mfg: mosaico su foglie giovani; Dfg: deformazioni su foglie giovani; Iil: ingiallimento internervale leggero su foglie giovani; Ns: necrosi dello stelo

4.3.4 SEQUENZIAMENTO COMPLETO DEL GENOMA

Nel presente lavoro, mediante l'impiego di specifiche coppie di primer (Luria *et al.*, 2017) e successivo sequenziamento dei prodotti di RT-PCR e RACE, è stato ottenuto il genoma completo dell'isolato virale di ToBRFV presente in Sicilia, denominato ToB-SIC01/19.

Per ogni amplicone, ottenuto mediante RT-PCR E RACE, costituente un frammento del genoma completo, sono stati di seguito individuati cinque diversi cloni. Una volta effettuato il confronto delle sequenze nucleotidiche degli stessi è stato possibile ottenere la sequenza dell'isolato con un alto grado di accuratezza.

La sequenza di ToB-SIC01/19, assemblata mediante programma Contig implementato nel programma Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen, CA, USA), è stata depositata in GenBank con il numero di accessione MN167466.

Il genoma dell'isolato siciliano ToB-SIC01/19 ha una lunghezza di 6.391 nucleotidi ed ha un'organizzazione genomica tipica di ToBRFV (Luria *et al.*, 2017).

ToB-SIC01/19 ha mostrato una similarità di sequenza del 99.8%, 99.7%, 99.7% e 99.7% con le sequenze TBRFV-P12-3H (Germania; Acc. No. MK133095), TBRFV-P12-3G (Germania; Acc. No. MK133093), Tom1-Jo (Giordania, Acc. No. KT383474) e TBRFV-IL (Israele, Acc. No. KX619418), rispettivamente.

Successivamente è stata confrontata l'identità nucleotidica dei singoli geni dell'isolato ToB-SIC01/19 con i corrispettivi geni delle sequenze TBRFV-P12-3H, TBRFV-P12-3G, Tom1-Jo e TBRFV-IL. Il gene che codifica per la proteina di rivestimento ha mostrato un'identità nucleotidica del 100%, 99.8%, 99.8% e 99.8% con le sequenze TBRFV-P12-3G (Germania; Acc. No. MK133093), TBRFV-P12-3H (Germania; Acc. No. MK133095), Tom1-Jo (Giordania, Acc. No. KT383474) e TBRFV-IL (Israele, Acc. No. KX619418), rispettivamente. Il gene che codifica per la proteina di movimento ha mostrato un'identità nucleotidica del 99.9%, 99.9%, 99.8% e 99.8% con le sequenze TBRFV-P12-3G (Germania; Acc. No. MK133093), Tom1-Jo (Giordania, Acc. No. KT383474), TBRFV-P12-3H (Germania; Acc. No. MK133095) e TBRFV-IL (Israele, Acc. No. KX619418), rispettivamente. Il gene che codifica per la proteina 126 KDa ha mostrato un'identità nucleotidica del 99.8%, 99.8% 99.8% e 99.7% con le sequenze TBRFV-P12-3H (Germania; Acc. No. MK133095), Tom1-Jo (Giordania, Acc. No. KT383474), TBRFV-IL (Israele, Acc. No. KX619418) e TBRFV-P12-3G (Germania; Acc. No. MK133093), rispettivamente. Il

gene che codifica per la proteina 183 KDa ha mostrato un'identità nucleotidica del 99.8% con le sequenze TBRFV-P12-3H (Germania; Acc. No. MK133095), TBRFV-P12-3G (Germania; Acc. No. MK133093), Tom1-Jo (Giordania, Acc. No. KT383474) e TBRFV-IL (Israele, Acc. No. KX619418).

Infine è stata confrontata l'identità proteica delle singole proteine virali dell'isolato ToB-SIC01/19 con le corrispettive proteine delle sequenze TBRFV-P12-3H, TBRFV-P12-3G, Tom1-Jo e TBRFV-IL. La proteina di rivestimento ha mostrato un'identità proteica del 100%, 99.4%, 99.4% e 99.4% con le proteine degli isolati TBRFV-P12-3G (Acc. No. MK133093, protein Acc. No. AZQ25014), TBRFV-P12-3H (Germania; Acc. No. MK133095, protein Acc. No. AZQ25023), Tom1-Jo (Giordania, Acc. No. KT383474, protein Acc. No. ALP48479) e TBRFV-IL (Israele, Acc. No. KX619418, protein Acc. No. APB87946), rispettivamente. La proteina di movimento ha mostrato un'identità proteica del 99.6%, 99.6%, 99.6% e 99.2% con le proteine degli isolati TBRFV-P12-3G (Acc. No. MK133093, protein Acc. No. AZQ25013), TBRFV-P12-3H (Germania; Acc. No. MK133095, protein Acc. No. AZQ25022), Tom1-Jo (Giordania, Acc. No. KT383474, protein Acc. No. ALP48478) e TBRFV-IL (Israele, Acc. No. KX619418, protein Acc. No. APB87945), rispettivamente. La proteina 126 KDa ha mostrato un'identità proteica del 99.8%, 99.7%, 99.6% e 99.2% con le proteine degli isolati Tom1-Jo (Giordania, Acc. No. KT383474, protein Acc. No. ALP48477), TBRFV-P12-3G (Acc. No. MK133093, protein Acc. No. AZQ25015), TBRFV-P12-3H (Germania; Acc. No. MK133095, protein Acc. No. AZQ25024) e TBRFV-IL (Israele, Acc. No. KX619418, protein Acc. No. APB87944), rispettivamente. La proteina 183 KDa ha mostrato un'identità proteica del 99.8%, 99.8%, 99.6% e 99.2% con le proteine degli isolati TBRFV-P12-3G (Acc. No. MK133093, protein Acc. No. AZQ25012), Tom1-Jo (Giordania, Acc. No. KT383474, protein Acc. No. ALP48476), TBRFV-P12-3H (Germania; Acc. No. MK133095, protein Acc. No. AZQ25021) e TBRFV-IL (Israele, Acc. No. KX619418, protein Acc. No. APB87943), rispettivamente.

4.3.5 DISEGNO DEI PRIMER, SONDA TAQMAN MGB E VALIDAZIONE

Le analisi *in vitro* mediante l'algoritmo Primer-BLAST delle 5 coppie di primer disegnate, specifiche per un tratto del gene che codifica per la proteina di movimento (Movement Protein – MP) non hanno mostrato alcuna corrispondenza rilevante con altri organismi. Tutte le coppie di primer ottenute sono state testate mediante Real Time RT-PCR con SYBR Green per valutare la coppia di primer con la massima sensibilità intesa come vale più basso di Ct. In Tabella 10 sono riportate le 5 coppie di primer disegnate. Tra le cinque coppie di primer testate, due non hanno restituito alcun segnale (ToB5461F/ToB5592R e ToB5461F/ToB5593R), mentre con la coppia di primer ToB5520F/ToB5598R è stato ottenuto il valore di Ct più basso. Tali primer sono stati utilizzati per il successivo sviluppo della Real Time RT-PCR con sonda TaqMan (Figura 9).

Tabella 10 – Coppie di primer e sonda (ToB-probe) sviluppati per analisi mediante Real Time RT-PCR con sonda Taqman MGB.

Sonda – Coppie primer	Posizione genomica	Sequenza (5'-3')	Tm (IDT)	Amplicone (nt)	Sequenza di riferimento	Ct value
ToB-probe5558	5558	FAM-GTTTAGTAGTAAAAAGTGAGAAAT-MGB	45.7 (66)	–		
ToB5520F	5520	GTAAGGCTTGCAAAATTCGTTCG	55.6	102	KT383474	5.0
ToB5598R	5598	CTTGGTTTGTCTGGTTCCGG	55.1			
ToB5498F	5498	CATGGAAGAAGTCCCGATGT	54.5	205		20.8
ToB5683R	5683	ATCTGAATCGGCGACGTAAG	54.7			
ToB5461F	5461	GGCCCATGGAACATCAGAA	54.4	242		25.6
ToB5683R	5683	ATCTGAATCGGCGACGTAAG	54.7			
ToB5461F	5461	GGCCCATGGAACATCAGAA	54.4	151		n.a.
ToB5592R	5592	TTGTCTGGTTTCGGCCCTATT	54.2			
ToB5461F	5461	GGCCCATGGAACATCAGAA	54.4	152		n.a.
ToB5593R	5593	TTTGTCTGGTTTCGGCCCTAT	54.2			

n.a.: nessuna amplificazione

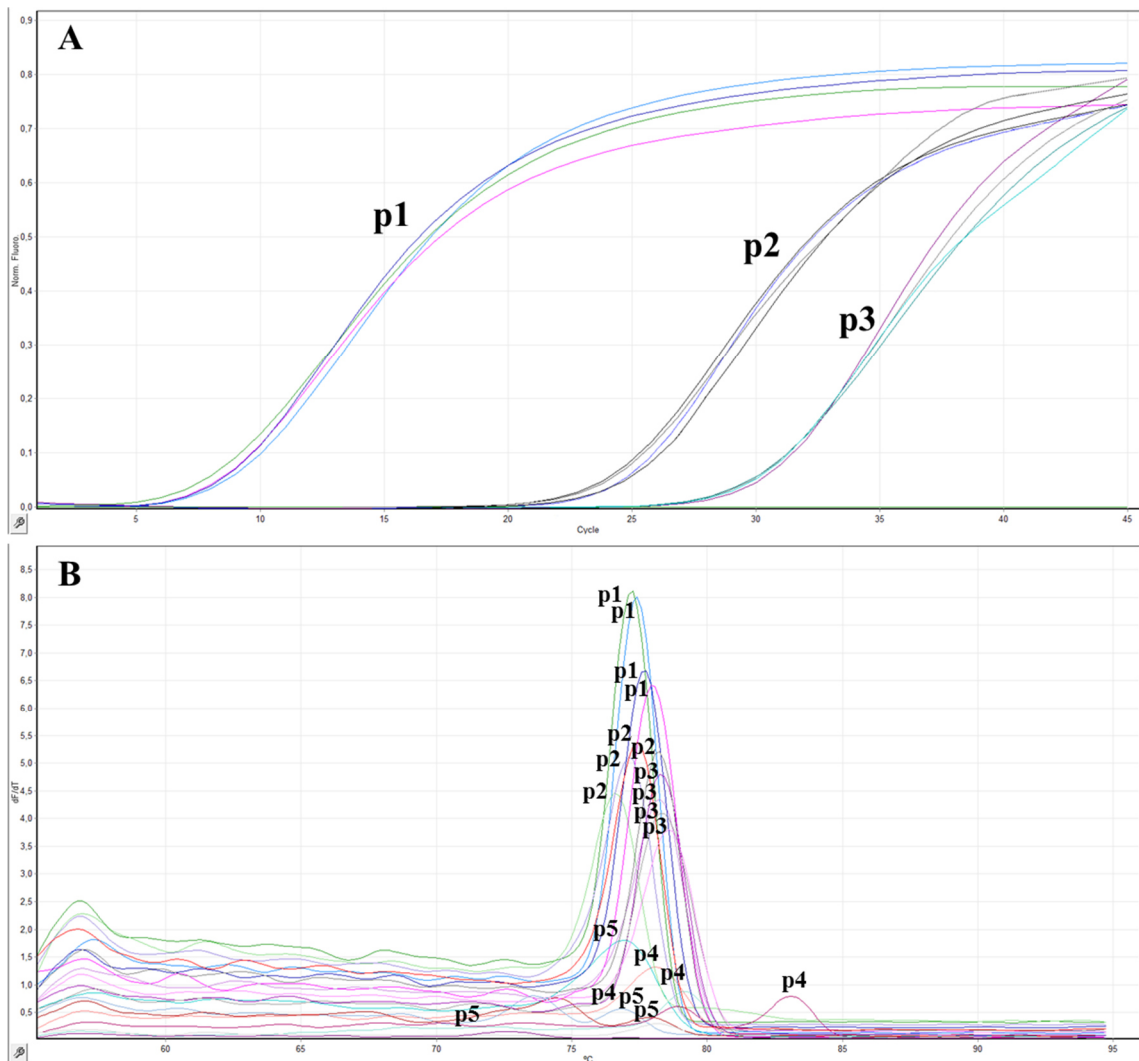


Figura 9 – Real time RT-PCR mediante metodo SYBR Green con le differenti coppie di primer appositamente disegnate. (A) Curve di amplificazione e al time RT-PCR mediante SYBR green con le seguenti coppie di primer: p1 (ToB5520F/ToB5598R), p2 (ToB5498F/ToB5683R), p3 (ToB5461F/ToB5683R), p4 (ToB5461F/ToB5592R) e p5 (ToB5461F/ToB5593R). Le coppie p4 e p5 non hanno mostrato alcuna amplificazione, mentre la coppia p1 ha mostrato il valore Ct più basso. (B) Curve di melting delle curve di amplificazione precedentemente ottenute con le 5 differenti coppie di primer.

Le successive analisi *in vitro* della coppia di primer ToB5520F/ToB5598R mediante programma Vector NTI 11.5 (Invitrogen, CA, USA) non hanno mostrato ibridazione specifica con altri tobamovirus; pertanto è ipotizzabile che le basse percentuali di affinità ottenute e la posizione genomica di ibridazione escludono qualsiasi reazione aspecifica (Tabella 11).

Tabella 11 – Percentuale di similarità (%) e posizione genomica di ibridazione (nt) ottenute mediante analisi *in vitro* della coppia di primer ToB5520F–ToB5598R e sonda ToB-probe5558 su sequenze complete di virus appartenenti al genere *Tobamovirus* che attaccano pomodoro e peperone. In tabella sono riportati solo i valori con la più alta omologia.

Nome virus	Sequenze complete analizzate	ToB5520F		ToB-probe5558		ToB5598R		Numero accessione
		Posizione (nt)	%	Posizione (nt)	%	Posizione (nt)	%	
<i>Bell pepper mottle virus</i>	1	5492	79.2	3120	68.2	23	65.2	DQ355023
<i>Brugmansia mild mottle virus</i>	1	4216	65.2	5599	63.6	5360	65.2	AM398436
<i>Obuda pepper virus</i>	2	2196	62.5	2815	68.2	4893	65.2	D13438 - L11665
<i>Paprika mild mottle virus</i>	2	392	66.7	3225	63.6	3206	60.9	KX187305 - AB089381
<i>Pepper mild mottle virus</i>	13	5306	66.7	4005	63.6	3560	69.6	KP345899 - MH063882 - KR108207 - KR108206 - MG515725 - AB069853 - KU312319 - LC082100 - LC082099 - AB550911 - AB126003 - AB000709 - AJ308228
<i>Rehmannia mosaic virus</i>	6	5518	75	6094	68.2	6283	65.2	KU133476 - EF375551 - MF348202 - JX575184 - AB628188 - MG418836
<i>Tobacco mild green mosaic virus</i>	7	2584	66.7	3556	63.6	2810	65.2	M34077 - KM596785 - MH730970 - DQ821941 - JX534224 - EF469769 - AB078435
<i>Tobacco mosaic virus</i>	10	5515	79.2	6094	72.7	6283	60.9	AF395129 - AF395128 - AF395127 - MK087763 - MG516107 - AF165190 - KY810785 - KF972436 - KF972435 - KF972434
<i>Tomato brown rugose fruit virus</i>	5	5520	100	5556	100	5598	100	KX619418 - MK133095 - MK133093 - KT383474 - MN167466
<i>Tomato mosaic virus</i>	10	5518	70.8	3863	63.6	5733	60.9	KR537870 - AF155507 - KX711903 - X02144 - AF332868 - AJ417701 - MH507166 - MH507165 - MG456601 - KY912162
<i>Tomato mottle mosaic virus</i>	5	5522	79.2	4913	63.6	3919	65.2	MH128145 - KR824951 - KR824950 - KT810183 - KP202857

4.3.6 MESSA A PUNTO DELLA REAL TIME RT-PCR CON SONDA TAQMAN MGB PER IL RILEVAMENTO DI TOBRFV

Per determinare la specificità della Real Time RT-PCR con sonda Taqman MGB, sono stati analizzati 17 campioni. Come riportato in Tabella 12, i due trascritti di RNA hanno restituito un valore di Ct compreso tra 5.0 e 5.1 nei quattro saggi differenti. L'RNA totale proveniente dalle piante inoculate artificialmente con ToBRFV ha restituito anch'esso un segnale positivo, con un valore di Ct compreso tra 12.2 ± 0.2 e 18.1 ± 0.1 , mentre gli altri tobamovirus utilizzati come outgroup non hanno restituito alcun segnale.

Tabella 12– Valori di Ct ottenuti mediante Real Time RT-PCR con sonda TaqMan MGB.

Isolato virale	Ct \pm SD
ToB-SIC01/19-P1	18.1 \pm 0.1
ToB-SIC01/19-P2	14.2 \pm 0.3
ToB-SIC01/19-P3	12.2 \pm 0.2
ToB-SIC01/19-P4	13.5 \pm 0.2
ToB-SIC01/19-P5	12.9 \pm 0.1
tRNA1	5.1 \pm 0.0
tRNA2	5.0 \pm 0.0
CGMV	-
PaMMV	-
PMMV	-
TMGMV	-
TMV	-
ToMMV	-
ToMV	-
ZGMMV	-
Pianta pomodoro sana	-

4.3.7 CURVA STANDARD

Per poter calcolare il numero di copie di RNA e la soglia di sensibilità della tecnica sviluppata, è stata generata una curva standard utilizzando come modello le diluizioni decimali seriali di un trascritto di RNA *in vitro* (da 10^{10} a 10^1 copie) sospeso in RNA estratto da pomodoro sano. La curva standard ha mostrato una forte relazione lineare, con un ampio intervallo dinamico (intervallo di concentrazione nel quale il segnale varia linearmente con

la concentrazione) compreso tra 10^9 e 10^1 copie; il coefficiente di correlazione (R^2) ha assunto un valore di 0.9997. Tale prova ha permesso di ottenere una efficienza di amplificazione (E) del 100% (Figura 10 e 11).

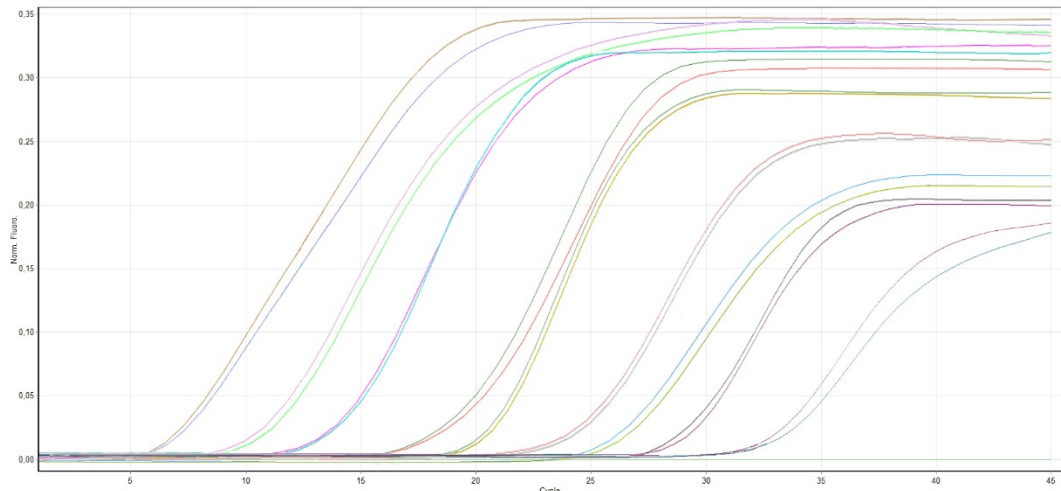


Figura 10 – Curve standard delle 10 diluizioni decimali seriali dei trascritti di RNA *in vitro* dell'isolato ToB-SIC01/19 ottenute mediante real time RT-PCR con sonda TaqMan MGB.

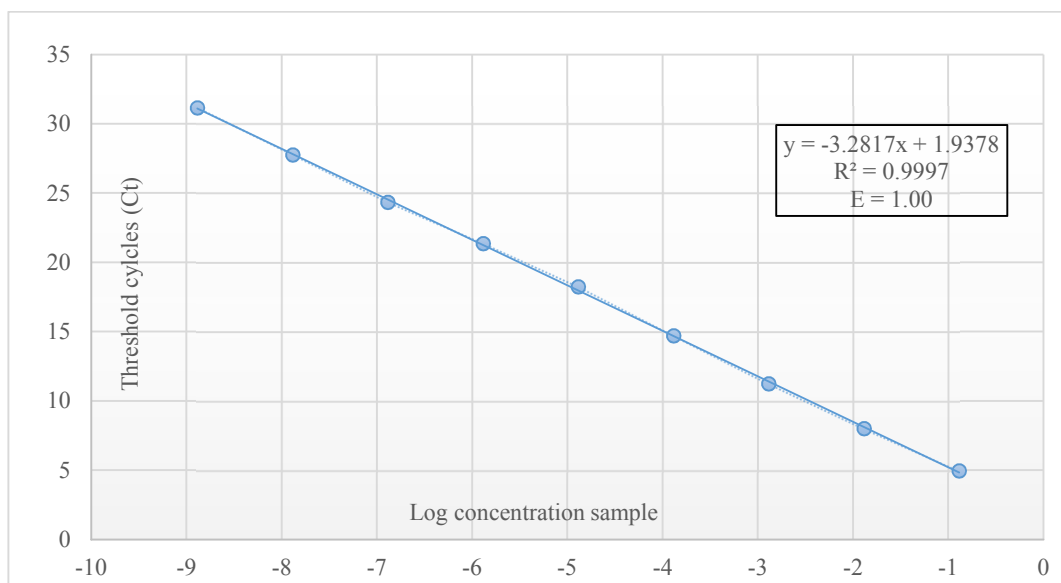


Figura 11 – Analisi di regressione lineare, ottenuta incrociando i valori di Ct (cycle threshold) nell'asse Y ottenuti da due diversi test con 4 repliche per diluizione standard rispetto al logaritmo della concentrazione di RNA presente nelle diluizioni seriali (asse X). Ogni punto tracciato rappresenta il valore Ct medio, calcolato dai quattro diversi esperimenti con due replicati.

4.3.8 DIFFERENTI METODI DI PREPARAZIONE DEL CAMPIONE E COMPARAZIONE DI DIFFERENTI TECNICHE DI DIAGNOSI PER IL RILEVAMENTO DI ToBRFV

Per valutare il miglior metodo di preparazione del campione, sono state valutate quattro differenti procedure, includendo un totale di 42 campioni (10 per provincia, l'isolato siciliano ToB-SIC01/19 e un controllo di pomodoro sano). I risultati ottenuti con i quattro differenti metodi di preparazione dei campioni sono stati confrontati tra di loro e con i risultati ottenuti mediante DAS-ELISA e RT-PCR end-point.

Tutti e quattro i differenti metodi di preparazione (immunocattura in piastre da real time PCR, estrazione RNA totale, estrazione diretta da picciolo, impronta su membrane di nylon) sono risultati efficaci per il rilevamento di ToBRFV mediante real-time RT-PCR. Analizzando in dettaglio i risultati ottenuti con le differenti procedure, l'immunocattura in piastre da real time PCR ha restituito valori di Ct compresi tra 16 e 28, mentre per l'RNA totale estratto sono stati ottenuti valori di Ct compresi tra 14 e 23, per l'estrazione diretta da picciolo valori compresi tra 17 e 35 ed infine, per l'impronta su membrane di nylon, valori di Ct compresi tra 17 e 37.

Per quanto riguarda il confronto tra la real time RT-PCR sviluppata nel presente lavoro e altre tecniche, la real time RT-PCR ha mostrato una maggiore sensibilità rispetto a DAS-ELISA; infatti, 11 campioni che risultavano negativi in DAS-ELISA sono risultati positivi in Real Time RT-PCR (Tabella 13). Confrontando la real time RT-PCR la RT-PCR end-point, le due tecniche hanno restituito gli stessi risultati con i campioni estratti mediante immunocattura in piastre da real time ed estrazione dell'RNA totale mediante kit commerciale, mentre, utilizzando i metodi di estrazione diretta da picciolo ed impronta su membrane di nylon, la RT-PCR end-point non è stata in grado di fornire un risultato affidabile.

I prodotti di amplificazione dei campioni 1A, 3C, 7R, 8R e 9R sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% e visualizzati mediante transilluminatore UV per confermare l'assenza di falsi positivi nel saggio real time RT-PCR. I campioni 7R, 8R e 9R hanno restituito il frammento atteso mentre i campioni 1A, 3C, la pianta di pomodoro sana e l'acqua non hanno dato nessuna amplificazione (Figura 12). Il sequenziamento dei campioni 7R, 8R and 9R con i metodi di preparazione 3* e 4* (Tabella 13) ha confermato la presenza di ToBRFV.

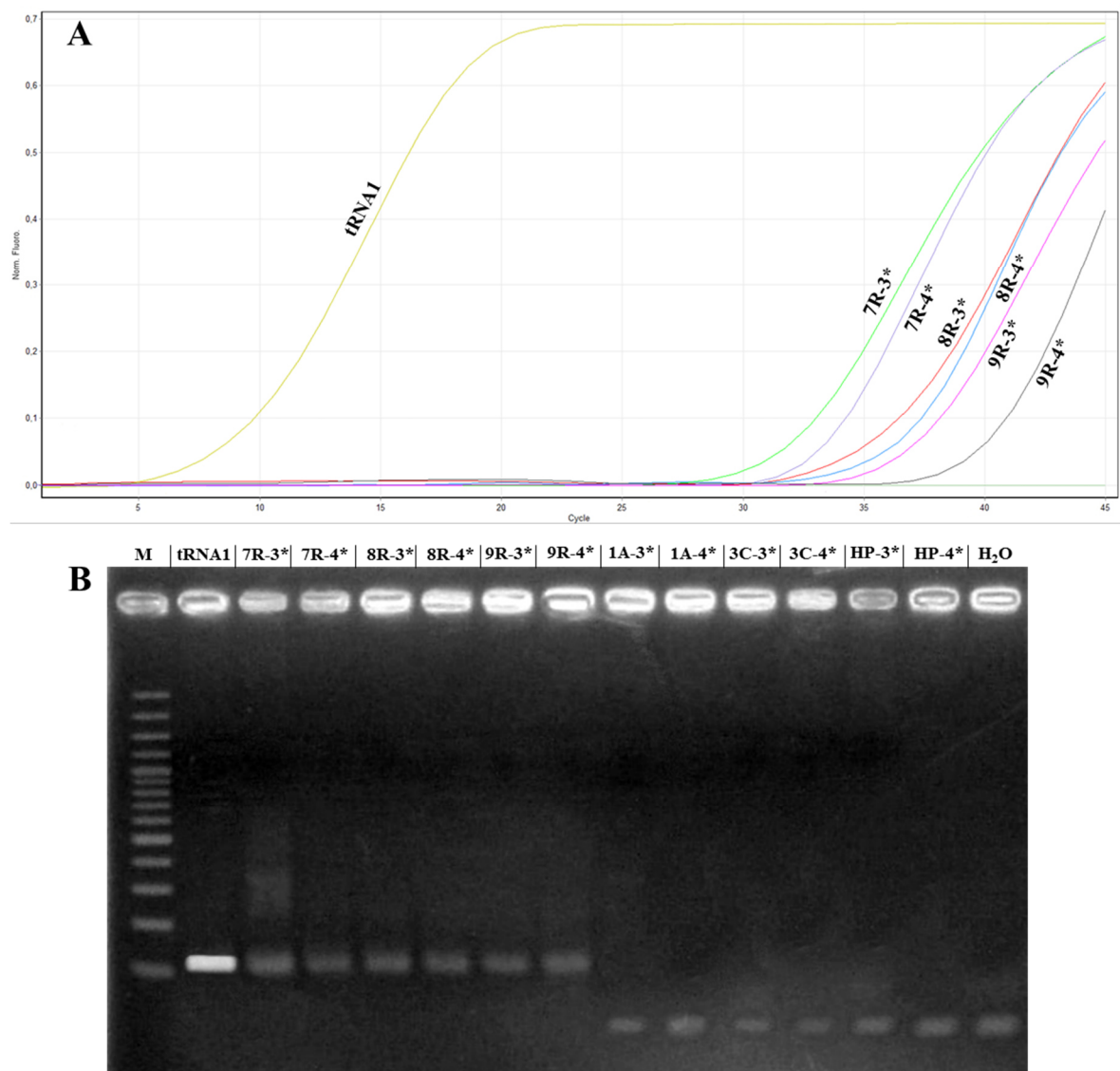


Figura 12 – Comparazione di alcuni campioni mostranti valori alti di Ct in real time RT-PCR con corsa elettroforetica. (A) Curve di amplificazione ottenute con la coppia di primer ToB5520F/ToB5598R e sonda ToBprobe-5558 di alcuni campioni riportati in Tabella 13, denominati: 1A, 3C, 7R, 8R e 9R (HP: pianta sana), I codici 3* e 4* indicano i differenti metodi di preparazione dei campioni riportati in Tabella 13. (B) Gel di agarosio al 2% dei prodotti di real-time RT-PCR. M: 100 bp marker (Thermo Fischer Scientific, MA, USA).

Tabella 13 – Analisi dei 42 campioni con differenti metodi di preparazione, confronto risultati ottenuti mediante Real Time RT-PCR con tecniche DAS-ELISA e RT-PCR end point.

Provincia	Campione	DAS-ELISA	RT-PCR end point				Real Time RT-PCR (probe ct value)			
			1*	2*	3*	4*	1*	2*	3*	4*
Agrigento	1A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9A	-	+	+	-	-	18	18	26	26
	10A	-	+	+	-	-	21	19	27	28
Caltanissetta	1C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5C	-	+	+	-	-	20	17	30	30
	6C	-	+	+	-	-	20	17	25	25
	7C	+	+	+	+	+	22	18	31	32
	8C	+	+	+	-	-	22	19	31	33
	9C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10C	-	+	+	-	-	24	21	32	32
Ragusa	1R	+	+	+	+	-	22	18	30	25
	2R	+	+	+	+	-	22	18	28	29
	3R	-	+	+	-	-	26	21	32	32
	4R	-	+	+	-	-	26	19	33	34
	5R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6R	+	+	+	+	+	26	17	31	27
	7R	+	+	+	+	+	24	17	30	32
	8R	-	+	+	-	-	28	19	33	34
	9R	-	+	+	-	-	28	21	35	37
	10R	+	+	+	-	-	26	19	32	31
Siracusa	1S	+	+	+	-	-	26	19	32	32
	2S	+	+	+	-	-	22	18	30	29
	3S	+	+	+	-	-	22	17	31	31
	4S	-	+	+	-	-	26	21	32	33
	5S	-	+	+	-	-	26	23	34	34
	6S	+	+	+	+	-	23	19	32	32
	7S	+	+	+	+	+	20	17	29	29
	8S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ToB-SIC01/19	+	+	+	-	-	16	14	17	17
	Pianta sana	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1* Immunocattura in piastre da real time PCR

2* Estrazione RNA totale

3* Estrazione diretta da picciolo

4* Impronta su membrane di nylon

4.3.9 DISPERSIONE NELL'AREALE SICILIANO DI ToBRFV

Allo scopo di studiare la dispersione di *Tomato brown rugose fruit virus*, sono stati analizzati 3.000 campioni, costituiti da lotti di seme, plantule e piante di pomodoro sintomatiche, nel periodo ottobre 2018/ottobre 2019.

Analizzando in dettaglio i risultati ottenuti, per quanto concerne i lotti di seme di pomodoro, è stata riscontrata una percentuale di campioni positivi a ToBRFV del 8%, ovvero 8 lotti su un totale di 100. Una percentuale di campioni positivi a ToBRFV decisamente più bassa è stata riscontrata per i lotti di plantule analizzate, pari allo 0,3%, ovvero 3 lotti su un totale di 1.000 analizzati (Tabella 14).

Infine, per quanto riguarda i campioni di piante adulte di pomodoro analizzate, la dispersione di ToBRFV è stata valutata nelle province di Ragusa, Siracusa, Agrigento e Caltanissetta. In tali province oggetto di campionamento è stata riscontrata la percentuale più alta di campioni positivi a ToBRFV, pari al 94,4%, ovvero 944 campioni positivi su un totale di 1000 analizzati (Tabella 12). In dettaglio, il 100% delle piante prelevate dalle aziende situate nelle province di Ragusa, Siracusa ed Agrigento sono risultate positive a ToBRFV, mentre nella provincia di Caltanissetta è stata registrata una percentuale di piante positive del 77,6% (194 positive su un totale di 250) (Tabella 15). Da ciò si evince come ToBRFV si sia diffuso nelle principali province siciliane coinvolte nella produzione commerciale di pomodoro.

Tabella 14 – Risultati relativi ai lotti di seme e plantule analizzati per ToBRFV mediante real time RT-PCR.

Tipologia campione	Lotti analizzati	Lotti positivi	% lotti positivi
Seme	100 lotti	8 lotti	8
Plantula	1000 lotti	3 lotti	0,3

Tabella 15 – Risultati campioni di piante adulte prelevate provincia ed analizzate per ToBRFV mediante real time RT-PCR.

Provincia	Identificativo azienda	Codice campione	Campioni positivi	Totale campioni positivi per provincia
Ragusa	Azienda 1R	1R1 – 1R10	50	250
	Azienda 2R	2R1 – 2R10	50	
	Azienda 3R	3R1 – 3R10	50	
	Azienda 4R	4R1 – 4R10	50	
	Azienda 5R	5R1 – 5R10	50	
Agrigento	Azienda 1A	1A1 – 1A10	50	250
	Azienda 2A	2A1 – 2A10	50	
	Azienda 3A	3A1 – 3A10	50	
	Azienda 4A	4A1 – 4A10	50	
	Azienda 5A	5A1 – 5A10	50	
Siracusa	Azienda 1S	1S1 – 1S10	50	250
	Azienda 2S	2S1 – 2S10	50	
	Azienda 3S	3S1 – 3S10	50	
	Azienda 4S	4S1 – 4S10	50	
	Azienda 5S	5S1 – 5S10	50	
Caltanissetta	Azienda 1C	1C1 – 1C10	50	194
	Azienda 2C	2C1 – 2C10	32	
	Azienda 3C	3C1 – 3C10	29	
	Azienda 4C	4C1 – 4C10	43	
	Azienda 5C	5C1 – 5C10	40	
Totale piante adulte positive a ToBRFV				944

I dati ottenuti confermano quanto precedentemente detto sulle modalità di trasmissione di ToBRFV. La presenza di seme contaminato non si traduce sempre in una effettiva trasmissione per seme, questo perché le particelle virali sembrano essere localizzate solamente al tegumento esterno senza raggiungere l’embrione. Ciò sembra essere confermato dalla bassissima percentuale di lotti di plantule infette (3 su 1.000).

La bassa percentuale di seme e plantule positivi a ToBRFV riscontrata nel corso dei campionamenti non esclude la necessità di una diagnosi precoce, poiché anche la presenza di un numero estremamente limitato di seme e/o plantule positive a ToBRFV, può innescare una rapida diffusione dello stesso.

Dai dati raccolti, si evince come la percentuale di piante adulte positive a ToBRFV riscontrata nel corso dei campionamenti sia estremamente alta. Infatti, la presenza di una singola pianta positiva infetta all’interno di una serra o in pieno campo, può compromettere

le sorti dell'intera coltura, data l'elevatissima percentuale di trasmissione per contatto diretto pianta-pianta, mediante attrezzi da lavoro o semplice manipolazione da parte degli operatori agricoli. La situazione risulta essere aggravata dall'assenza, al momento, di varietà commerciali che esprimano resistenza o quantomeno tolleranza alla malattia.

I risultati ottenuti da tale studio sono estremamente importanti al fine di determinare quanto può incidere la presenza di materiale di propagazione infetto sulla diffusione del patogeno. Da quanto detto, è importante quindi acquisire informazioni sull'ecologia e distribuzione della malattia, poter programmare ed attivare piani di controllo e monitoraggio, valutare attentamente gli effetti economici analizzando i costi/benefici derivanti dalla presenza del patogeno, nonché mettere in atto strategie di miglioramento genetico al fine di costituire nuove varietà tolleranti/resistenti.

4.4 CONCLUSIONI

La Sicilia è una delle regioni del Bacino del Mediterraneo con la più importante produzione di pomodoro e, a causa della sua posizione geografica, rappresenta uno dei principali punti di accesso di materiale vegetale nel territorio europeo. Questa situazione aumenta notevolmente il rischio di introduzione di nuovi patogeni nei nostri ambienti e ciò comporta un grave rischio legato alla biosicurezza per l'agricoltura e la produzione alimentare nazionale, mettendo a rischio il futuro dell'orticoltura italiana. La recente comparsa nel territorio italiano di *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) rappresenta una minaccia a causa delle differenti modalità di trasmissione di questo virus e all'assenza, al momento, di varietà di pomodoro e peperone resistenti o tolleranti. Allo stato attuale, sono disponibili in commercio varietà ibride con i geni *Tm-1*, *Tm-2* e *Tm-2²*, i quali conferiscono resistenza nei confronti di *Tomato mosaic virus* (ToMV) e *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Pelham, 1966), ma che non esprimono alcun tipo di resistenza o quantomeno tolleranza nei confronti di ToBRFV. Ciò si traduce in una rapida diffusione del virus in tutte le aree di coltivazione del pomodoro. Quindi, per quanto concerne questo patogeno, ad oggi gli unici due strumenti disponibili sono: la diagnosi precoce e l'implementazione di misure preventive nella gestione delle colture, che possono essere un valido aiuto nel ridurre l'introduzione e la successiva diffusione di ToBRFV negli ambienti di coltivazione. Di conseguenza, oggi è necessario sviluppare metodi diagnostici alternativi, che siano al contempo sensibili e molto affidabili, per la diagnosi dei virus delle piante, che stanno compromettendo le coltivazioni di pomodoro in diverse aree sia italiane che internazionali (Hanssen *et al.*, 2010; Puchades *et al.*, 2017; Ferriol *et al.*, 2015, Panno *et al.*, 2014). Nella presente tesi è stato caratterizzato un isolato di *Tomato brown rugose fruit virus*, recentemente scoperto in Sicilia (Panno *et al.*, 2019b) ed è stato sviluppato un metodo di diagnosi sensibile, specifico, rapido ed economico per il rilevamento di tale patogeno in piante e semi.

La caratterizzazione biologica dell'isolato siciliano ToB-SIC01/19 ha dimostrato la possibilità di trasmissione meccanica su piante di pomodoro e peperone, come precedentemente riportato da Luria e collaboratori (2017), mentre su melanzana non è stato possibile trasmetterlo. La trasmissione meccanica è particolarmente importante poiché potrebbe semplificare le attività di miglioramento genetico, al fine di costituire nuovo germoplasma tollerante/resistente nei confronti di ToBRFV. La caratterizzazione

molecolare ha mostrato come l'isolato siciliano ToB-SIC01/19 presenta una percentuale di similarità del 99% con le sequenze recuperate da GenBank provenienti da Germania, Giordania e Israele (Menzel *et al.*, 2019; Salem *et al.*, 2016; Luria *et al.*, 2017).

Dal momento che ToBRFV si è diffuso in pochi anni in alcuni paesi del Bacino del Mediterraneo (Israele e Italia) e in America centrale, il bassissimo livello di variabilità riscontrato tra gli isolati supporta l'ipotesi della recente introduzione in Italia, probabilmente a causa di semi infetti.

La capacità del virus di trasmettersi per contatto pianta-pianta, per manipolazione e per seme, facilita enormemente la rapida diffusione del patogeno, soprattutto se in presenza di sovrapposizione dei cicli colturali.

A causa di questa rapida diffusione, è essenziale quindi disporre di una metodologia di diagnosi che sia affidabile ed estremamente sensibile.

Attualmente, l'impiego di test immunoenzimatici, come il DAS-ELISA non si è rivelato affidabile, a causa del basso titolo virale presente nelle piantine da vivaio o nei primi stadi dell'infezione, o a causa dell'assenza di anticorpi specifici. Questo tipo di test quindi restituisce risultati non sempre affidabili, ottenendo "falsi negativi" (Jacobi *et al.*, 1998).

Per tale motivo, è stato sviluppato un metodo di rilevamento rapido per la diagnosi di ToBRFV basato sulla tecnica real-time RT-PCR con sonda TaqMan MGB. Questo metodo permette il rilevamento di ToBRFV con differenti procedure di preparazione dei campioni; i metodi di preparazione dei campioni basati sull'estrazione diretta da picciolo ed impronta su membrane di nylon sono stati utilizzati con successo al fine di evitare l'estrazione dell'RNA totale, abbreviando i tempi di preparazione, consentendo l'analisi simultanea di più campioni e, infine, riducendo drasticamente il costo totale per singola analisi. L'elevata specificità della tecnica real time RT-PCR sviluppata è rilevante come criterio per ridurre al minimo i falsi positivi ed ottenere una corretta discriminazione di ToBRFV da altri virus appartenenti al genere *Tobamovirus*. Inoltre, l'utilizzo di tale tecnica associata alla preparazione diretta del campione mediante estrazione diretta da picciolo, può essere applicata per effettuare diagnosi in campo, utilizzando dei dispositivi portatili, consentendo un notevole risparmio in termini di tempo e costi.

Il metodo basato sulla tecnica real-time RT-PCR con sonda TaqMan MGB sviluppato nella presente tesi, potrebbe rappresentare uno strumento valido ed affidabile da inserire nei programmi di certificazione.

CAPITOLO 5

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

CAPITOLO 5. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'attività agricola in molte regioni del mondo è continuamente compromessa da una serie di epidemie devastanti causate da nuovi agenti patogeni di natura virale. I virus, quando introdotti in nuove aree indenni, possono diffondersi rapidamente, cambiando la loro gamma di ospiti, effettuando salti di specie, o possono essere soggetti a frequenti eventi di ricombinazione e/o mutazione. In tal modo acquisiscono nuovi fattori di virulenza o modificano i loro schemi epidemiologici

Sebbene la comparsa e diffusione di tali patogeni sia solitamente associata al cambiamento climatico o alle pratiche agronomiche che portano al contatto dei serbatoi di inoculo con le specie ospiti, è evidente che il quadro è molto più complesso e deriva da un processo evolutivo in cui i principali attori sono i cambiamenti nei fattori ecologici, la predisposizione dei virus a mutare per adattarsi a nuovi ambienti ed ospiti, i numerosi fattori coinvolti nella replicazione virale e una forte componente stocastica. A tali variabili si aggiungono fattori correlati alla ormai massiccia presenza antropica, rappresentata da intensi scambi commerciali di merci, controlli fitosanitari non sufficienti a garantire un alto livello di sicurezza e movimentazione incontrollata di materiale vegetale che può fungere da serbatoio di inoculo.

Vi sono diverse definizioni di “virus emergente”. In alcuni casi tale denominazione viene spesso usata per descrivere la comparsa di un'infezione virale finora non riconosciuta o di una precedentemente riconosciuta ma che si è espansa in una nuova nicchia o zona geografica, spesso accompagnata da un significativo aumento della gravità dei sintomi (Cleaveland *et al.*, 2007).

Secondo il Center for Disease Control and Prevention (USA), un virus emergente dovrebbe soddisfare la seguente definizione: una malattia di origine infettiva la cui incidenza è aumentata negli ultimi decenni o minaccia di aumentare nel prossimo futuro (United States Center for Disease Control and Prevention, 2019); tale definizione però può risultare in molti casi fuorviante, in quanto un virus può essere classificato come emergente per altre ragioni, come l'acquisizione dettagliata di informazioni sui danni causati, l'adozione di migliori strumenti diagnostici o la scoperta di agenti precedentemente non caratterizzati per malattie già note; ragioni che hanno poco a che vedere con lo spirito del termine “emergente”. Allo

stesso modo, i virus realmente emergenti potrebbero non essere riconosciuti come tali a causa della scarsa segnalazione dei casi o di difficoltà nella diagnosi.

Una definizione più rigorosa di virus emergente sarebbe la seguente: agente causale di “una malattia infettiva la cui incidenza è in aumento a seguito della sua prima introduzione in una nuova popolazione ospite o la cui incidenza è in aumento in una popolazione ospite esistente a seguito di cambiamenti a lungo termine nella sua epidemiologia”. Questa definizione implica che il virus si sta diffondendo nella popolazione ospite e non ha alcuna relazione con i cambiamenti nella sintomatologia (Woolhouse & Dye, 2001).

Si arriva quindi alla conclusione finale che, indipendentemente dalla definizione che si vuole dare di “virus emergente”, l’unico strumento di difesa che attualmente si ha a disposizione in un contesto di lotta preventiva si basa essenzialmente sull’identificazione del patogeno e il monitoraggio continuo delle colture, in particolare quelle condotte in condizioni di monocoltura in cui la comparsa e la diffusione di un virus può essere estremamente rapida. Le colture ortive in questo contesto subiscono ingenti danni a causa della comparsa e diffusione di agenti patogeni virali, in funzione della regione di coltivazione, dell’eventuale presenza di insetti vettori, delle condizioni climatiche e in parte dalle differenti pratiche agronomiche e forme di allevamento.

È diventato di primaria importanza quindi comprendere la diffusione di un patogeno virale, il livello di diversità genetica all’interno della popolazione virale, nonché sviluppare nuovi strumenti diagnostici in grado di identificare rapidamente l’agente patogeno. Con lo sviluppo di tecniche di diagnosi molecolare real time RT-PCR o LAMP, diventa estremamente semplice rilevare infezioni virali in campo e in vivaio.

Per i due casi trattati nella presente tesi di dottorato, ovvero *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) e *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV), sono stati valutati per entrambi l’epidemiologia, la gamma degli ospiti e l’attuale stato di diffusione rispettivamente nel territorio italiano e siciliano; infine sono state messe a punto delle metodologie diagnostiche essenziali per la diagnosi precoce.

Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) (famiglia *Geminiviridae*, genere *Begomovirus*) venne identificato per la prima volta nel 1995 in Asia; in Italia è stato segnalato per la prima volta alla fine del 2015 nella provincia di Trapani (Sicilia) su piante di zucchini, diffondendosi successivamente in Campania, Lazio, Sardegna e Calabria. Lo

studio da me condotto è stato focalizzato sull'analisi della dispersione e diversità genetica degli isolati di ToLCNDV in Italia e la messa a punto di una tecnica LAMP. Sono state analizzate un totale di 1400 piante. L'analisi filogenetica ha mostrato una bassa variabilità tra gli isolati italiani, probabilmente a seguito della recente introduzione e della rapida diffusione di questo virus in Italia. Sono stati identificati due cluster statisticamente significativi: uno costituito solamente da isolati italiani e l'altro costituito da isolati italiani, spagnoli, tunisini e marocchini. Inoltre, la più alta incidenza di ToLCNDV è stata osservata in Sicilia, anche se la malattia sembra essere critica anche in altre regioni italiane. È stata effettuata con successo la trasmissione meccanica di ToLCNDV in *Cucurbita pepo*, *Cucumis melo inodorus* e *Cucumis melo cantalupensis*. Da tale prova si può ipotizzare che la localizzazione di ToLCNDV in alcune specie, come ad esempio lo zucchini, non sia ristretta solamente al floema, avendo dimostrato per la prima volta come un begomovirus possa passare da un ospite all'altro per trasmissione meccanica.

La tecnica LAMP sviluppata ha mostrato un'ottima affidabilità e sensibilità per l'identificazione di ToLCNDV. Partendo da una concentrazione iniziale di plasmidi pari a 200 ng/μl, è stato possibile rilevare la presenza del patogeno fino ad una concentrazione pari a 2.0×10^{-8} ng/μl; tali risultati sono estremamente soddisfacenti in quanto non ottenibili con altre tecniche molecolari (PCR) né tantomeno immunoenzimatiche. Tale tecnica, associata all'estrazione diretta del campione a partire da tessuto fogliare, caratterizzato dalla presenza di sostanze inibitrici, permette di ridurre i tempi e i costi necessari allo svolgimento dell'analisi.

La rapida diffusione di ToLCNDV nel bacino del Mediterraneo rappresenta tuttora una minaccia per la produzione orticola; è di primaria importanza quindi sviluppare adeguate pratiche di gestione delle colture, applicando strategie di lotta basate essenzialmente sulla diagnosi precoce e misure fitosanitarie più restrittive.

Successivamente, la nostra attenzione si è concentrata sul *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV), un virus altamente infettivo che causa una sintomatologia molto grave su piante di pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.). La recente identificazione (Salem *et al.*, 2016), l'assenza di tecniche diagnostiche molecolari sensibili ma soprattutto affidabili e la mancanza attuale di genotipi tolleranti/resistenti, hanno in parte contribuito alla mancanza

di un informazioni dettagliate su ToBRFV e alla conseguente sottostima delle perdite produttive ed economiche che tale virus può causare.

Data la recente introduzione in Sicilia di ToBRFV (Panno *et al.*, 2019b) in diverse province dove sono concentrate la maggior parte delle coltivazioni di pomodoro, è diventato di fondamentale importanza acquisire quanti più dati possibili in merito alle caratteristiche di tale patogeno.

È stata quindi effettuata la caratterizzazione biologica e molecolare dell'isolato di ToBRFV ritrovato in Sicilia, denominato ToB-SIC01/19, ed è stato sviluppato un metodo di diagnosi sensibile ed altamente specifico basato su tecnica real time RT-PCR con sonda TaqMan MGB, al fine di identificare ToBRFV su piante e seme. Inoltre, sono state valutate quattro differenti procedure di preparazione dei campioni (immunocattura in tubi Real Time PCR, estrazione RNA totale, estrazione diretta da picciolo, impronta su membrane di nylon).

L'isolato siciliano ToB-SIC01/19 (6.391 nt) ha mostrato un'alta identità di sequenza con gli isolati TBRFV-P12-3H e TBRFV-P12-3G provenienti dalla Germania, Tom1-Jo dalla Giordania e TBRFV-IL proveniente da Israele; inoltre è stato trasmesso con successo mediante inoculazione meccanica su *Solanum lycopersicum* L. e *Capsicum annuum* L., mentre non è avvenuta nessuna trasmissione su *Solanum melongena*.

Il metodo sviluppato nel presente lavoro, basato su tecnica real time RT-PCR con sonda Taqman MGB, mediante l'utilizzo di un set di primer e sonda disegnato su una regione conservata all'interno del frammento aperto di lettura ORF3, ha permesso il rilevamento affidabile del virus ed una forte discriminazione di ToBRFV con altri virus appartenenti al genere *Tobamovirus*, minimizzando la possibilità di falsi positivi. È stata determinata la soglia di sensibilità della tecnica, ottenendo un limite di rilevamento, utilizzando diluizioni decimali seriali di un trascritto di RNA *in vitro* (da 10^{10} a 10^1 copie), pari a 10^1 copie.

Confrontando la tecnica real-time RT-PCR con la RT-PCR end point, entrambe hanno restituito gli stessi risultati con le procedure di immunocattura in tubi Real Time PCR ed estrazione RNA totale, mentre, mediante le procedure di estrazione diretta da picciolo ed impronta su membrane di nylon, la RT-PCR end point non è stata in grado di fornire un risultato affidabile.

È stata inoltre studiata la dispersione di ToBRFV nell'areale siciliano, mediante analisi di un totale di 3.000 campioni (100 lotti di seme di pomodoro ognuno suddiviso in 10

subcampioni, 1.000 lotti di plantule, 1.000 piante adulte), nel periodo ottobre 2018/ottobre 2019. Dai dati raccolti è stato possibile stabilire come ToBRFV si sia diffuso nelle principali province siciliane coinvolte nella produzione commerciale di pomodoro. È stata riscontrata una percentuale del 8%, 0,3% e 94,4% di lotti di seme, plantule e piante adulte, rispettivamente, positivi a ToBRFV mediante analisi real time RT-PCR. Il 100% delle piante prelevate dalle aziende situate nelle province di Ragusa, Siracusa ed Agrigento sono risultate positive a ToBRFV, mentre nella provincia di Caltanissetta è stata registrata una percentuale di piante positive del 77,6%.

In conclusione, gli studi effettuati e le procedure di diagnosi sviluppate consentono la rapida identificazione di *Tomato leaf curl New Delhi virus* e *Tomato brown rugose fruit virus*, con un'alta sensibilità e permettendo un considerevole risparmio in termini di tempo, reagenti e costi, potendosi affidare anche a metodi di estrazione dei campioni estremamente rapidi, che non richiedono procedure laboriose e l'impiego di reagenti che incidono sul costo finale dell'analisi. Queste metodologie possono essere potenzialmente incluse nei protocolli fitosanitari per la diagnosi precoce di questi virus in pieno campo, in vivaio o nei programmi di certificazione.

L'analisi dei casi studio oggetto della presente tesi di dottorato vuole inoltre rivolgere l'attenzione sulle principali problematiche che colpiscono da diversi anni il territorio siciliano e il panorama produttivo orticolo che contraddistingue questa regione.

La Sicilia è una delle più importanti regioni orticole del Bacino del Mediterraneo e rappresenta uno dei principali punti di accesso del materiale vegetale, aumentando notevolmente il rischio di introduzione e diffusione di nuovi agenti patogeni. A causa di tali nuove introduzioni gli scambi di merci possono quindi risentirne negativamente e l'orticoltura italiana potrebbe essere esposta a nuovi rischi di difficile gestione.

Al fine di evitare l'introduzione e la diffusione di nuovi agenti patogeni virali in Sicilia e in altre regioni italiane, risulta essenziale conoscere il *modus operandi* di un determinato patogeno (modalità di trasmissione, gamma degli ospiti ecc.), eseguire una corretta gestione delle colture, mettere a punto ed utilizzare nuovi metodi di diagnosi molecolare rapidi per identificare precocemente la presenza di determinati patogeni, sviluppare strategie di resistenza genetica per ottenere nuove cultivar resistenti o quantomeno tolleranti ad una determinata malattia e, di notevole importanza, adottare misure fitosanitarie più restrittive ai

confini nazionali basate anche sull'impiego di metodologie rapide, sensibili ed economiche per la diagnosi.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

ACEVEDO-RODRÍGUEZ P & STRONG MT, (2012). *Catalogue of the Seed Plants of the West Indies*. Smithsonian Contributions to Botany, 98:1192 pp. Washington DC, USA: Smithsonian Institution

AGUILAR-MELÉNDEZ A, AZURDIA C, CERÉN-LÓPEZ J, MENJÍVAR J, CONTRERAS A, (2017). *Capsicum annuum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T100895534A100895540.

ALKOWNI R, ALABDALLAH O, FADDA Z, (2019). *Molecular identification of tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine*. Journal of Plant Pathology, 1-5.

BADILLO-VARGAS IE, BAKER CA, TURECHEK WW, FRANTZ G, MELLINGER HC, FUNDERBURK JE, ADKINS S, (2016). *Genomic and biological characterization of Tomato necrotic streak virus, a novel subgroup 2 ilarvirus infecting tomato in Florida*. Plant disease, 100(6), 1046-1053.

BASU SK, DE AK, (2003). *Capsicum: historical and botanical perspectives*. In: *Capsicum: The genus Capsicum* [ed. by De, A.K.]. London and New York, UK and USA: Taylor and Francis, 1-15

BERTIN S, LUIGI M, PARRELLA G, GIORGINI M, DAVINO S, TOMASSOLI L, (2018). *Survey of the distribution of Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) in Lazio region (Central Italy): a threat for the northward expansion of Tomato leaf curl New Delhi virus (Begomovirus: Geminiviridae) infection*. Phytoparasitica, 46, 171-82.

BRATSCH SA, CRESWELL TC, RUHL GE, (2018). *First report of tomato necrotic spot virus infecting tomato in Indiana*. Plant health progress, 19(3), 224-225.

BROWN JK, ZERBINI FM, NAVAS-CASTILLO J, MORIONES E, RAMOS-SOBRINHO R, SILVA JCF, FIALLO-OLIVÉ E, BRIDDON RW, HERNÁNDEZ-ZEPEDA C, IDRIS A, MALATHI VG, MARTIN DP, RIVERA-BUSTAMANTE R, UEDA S, VARSANI A, (2015). *Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons*. Archives of Virology, 160, 1593-619.

CABI (CENTRE OF AGRICULTURE AND BIOSCIENCES INTERNATIONAL) INVASIVE SPECIES COMPENDIUM DATASHEET, (2019). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/15784>

CAMBRÓN-CRISANTOS JM, RODRÍGUEZ-MENDOZA J, VALENCIA-LUNA JB, RANGEL SA, DE JESÚS GARCÍA-ÁVILA C, LÓPEZ-BUENFIL JA, (2018). *First report of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in Michoacan, Mexico*. Mexican Journal of Phytopathology, 37(1):185-192.

CAMELO-GARCÍA VM, LIMA EFB, MANSILLA-CÓRDOVA PJ, REZENDE JAM, KITAJIMA EW, BARRETO M, (2014). *Occurrence of Groundnut ringspot virus on Brazilian peanut crops*. Journal of general plant pathology, 80(3), 282-286.

CHRISTIE RG & EDWARDSON JR, (1977). *Light and electron microscopy of plant virus inclusions*. Light and electron microscopy of plant virus inclusions, (9).

CLEAVELAND S, HAYDON DT, TAYLOR L, (2007). *Overviews of pathogen emergence: Which pathogens emerge, when and why?* Curr. Top. Microbiol. Immunol., 315, 85–111.

COLLMER CW & HOWELL SH, (1992). *Role of satellite RNA in the expression of symptoms caused by plant viruses*. Annual review of phytopathology, 30(1), 419-442.

CULVER JN, (2002). *Tobacco mosaic virus assembly and disassembly: determinants in pathogenicity and resistance*. Annual review of phytopathology, 40(1), 287-308.

DAVINO S, DAVINO M, BELLARDI MG, AGOSTEO GE, (2008). *Pepino mosaic virus and Tomato chlorosis virus causing mixed infection in protected tomato crops in Sicily*. *Phytopathologia Mediterranea*, 47:35–41.

DAVINO S, NAPOLI C, DELLACROCE C, MIOZZI L, NORIS E, DAVINO M, ACCOTTO GP, (2009). *Two new natural begomovirus recombinants associated with the tomato yellow leaf curl disease co-exist with parental viruses in tomato epidemics in Italy*. *Virus Research*, 143:15–23

DAVINO S, MIOZZI L, PANNO S, RUBIO L, DAVINO M, ACCOTTO GP, (2012). *Recombination profiles between Tomato yellow leaf curl virus and Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in laboratory and field conditions: evolutionary and taxonomic implications*. *Journal of General Virology*, 93:2712–2717 DOI: 10.1099/vir.0.045773-0.

DAVINO S, PANNO S, IACONO, G, SABATINO L, D'ANNA F, IAPICHINO G, OLMOS A, SCUDERI G, RUBIO L, TOMASSOLI L, CAPODICI G, MARTINELLI F, DAVINO M, (2017a). *Genetic variation and evolutionary analysis of pepino mosaic virus in Sicily: Insights into the dispersion and epidemiology*. *Plant Pathology*, 66(3):368-375.

DAVINO S, PANNO S, ARRIGO M, LA ROCCA M, CARUSO AG, BOSCO GL, (2017b). *Planthology: an Application System for Plant Diseases Management*. *Chemical Engineering Transactions*, 58:619-624.

DIMMOCK NJ, EASTON AJ, LEPPARD KN, (2016). *Introduction to modern virology*. John Wiley & Sons.

EFRON B, HALLORAN E, HOLMES S, (1996). *Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7085-90.

EPPO – EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION, (2019). <https://gd.eppo.int/>.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, (2017). <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (accessed 07 May 2019).

FERRIOL I, RANGEL EA, PANNO S, DAVINO S, HAN CG, OLMOS A, RUBIO L, (2015). *Rapid detection and discrimination of fabaviruses by flow-through hybridisation with genus- and species-specific riboprobes*. *Annals of applied biology*, 167:26-35.

FIDAN H, SARIKAYA P, CALIS O, (2019). *First report of Tomato brown rugose fruit virus on tomato in Turkey*. *New Disease Reports*, 39:18.

FLORIDA DIVISION OF PLANT INDUSTRY, FLORIDA DEPARTMENT OF AGRICULTURE AND CONSUMER SERVICES, (2019). <https://www.fdacs.gov/Divisions-Offices/Plant-Industry>

FRANCOIS P, TANGOMO M, HIBBS J, BONETTI E, BOEHME CC, NOTOMI T, PERKINS MD, SCHRENZEL J, (2011). *Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 62, 41-8.

FULTON RW, (1986). *Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control*. *Annual review of Phytopathology*, 24(1), 67-81.

GALIPIENSO L, MARTÍNEZ C, WILLEMSSEN A, ALFARO-FÉRNANDEZ A, FONT-SAN AMBROSIO I, DAVINO S, RUBIO L, (2015). *Genetic variability and evolutionary analysis of parietaria mottle virus: role of selection and genetic exchange*. *Archives of virology*, 160(10), 2611-2616.

HANSEN IM, LAPIDOT M, THOMMA BP, (2010). *Emerging viral diseases of tomato crops*. *Molecular plant-microbe interactions*, 23(5):539-548.

HEINLEIN M & EPEL BL, (2004). *Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata*. International review of cytology, 235, 93-164.

HUDSON RR, BOOS DD, KAPLAN NL, (1992). *A statistical test for detecting geographic subdivision*. Molecular biology and evolution, 9(1), 138-151.

HUDSON RR, (2000). *A new statistic for detecting genetic differentiation*. Genetics 155, 2011-14.

ICTV – INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (2019). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

ICTV MASTER SPECIES LIST, (2018). <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl>

ISTAT – ISTITUTO NAZIONALE DI STATISTICA (2018): <http://www.agri.istat.it>

JACOBI V, BACHAND GD, HAMELIN RC, CASTELLO JD, (1998). *Development of a multi-plex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses*. Journal of Virological Methods, 74:167–178.

JEGER MJ, SEAL SE, VAN DEN BOSCH F, (2006). *Evolutionary epidemiology of plant virus disease*. Advances in Virus Research, 67, 163-203.

JONES RA, NAIDU RA, (2019). *Global Dimensions of Plant Virus Diseases: Current Status and Future Perspectives*. Annual review of virology, 6.

JUÁREZ M, TOVAR R, FIALLO-OLIVÉ E, ARANDA MA, GOSÁLVEZ B, CASTILLO P, MORIONES E, NAVAS-CASTILLO J, (2014). *First detection of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting zucchini in Spain*. Plant Disease, 98(6), 857.

- JUKES TH & CANTOR CR, (1969). *Evolution of protein molecules*. Mammalian protein metabolism, 3(21), 132.
- KING AM, LEFKOWITZ E, ADAMS MJ, CARSTENS EB, (2011). *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Vol. 9). Elsevier.
- KNIPPERS R & ALPERT CA, (1999). *Recombinant DNA technology*. In: Lengeler JW, Drews G, Schlegel HG, ed. *Biology of the Prokaryotes*, Blackwell Science, Oxford UK, 416-436.
- KOSAKOVSKY POND SL & FROST SDW, (2005). *Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments*. *Bioinformatics*, 21, 2531-33.
- KUMAR S, STECHER G, TAMURA K, (2016). *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets*. *Molecular Biology and Evolution* 33(7), 1870-74.
- LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE IM, WILM A, LOPEZ R, THOMPSON JD, GIBSON TJ, HIGGINS DG, (2007). *Clustal W and Clustal X version 2.0*. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.
- LEVITZKY N, SMITH E, LACHMAN O, LURIA N, MIZRAHI Y, BAKELMAN H, SELA N, LASKAR O, MILROT E, DOMBROVSKY A, (2019). *The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of Tomato brown rugose fruit virus contributing to disease spread in tomatoes*. *PLoS ONE* 14(1): e0210871.
- LIBRADO P & ROZAS J, (2009). *DNASP v.5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data*. *Bioinformatics*, 25, 1451-52.
- LING KS, TIAN T, GURUNG S, SALATI R, GILLIARD A, (2019). *First report of tomato brown rugose fruit virus infecting greenhouse tomato in the US*. *Plant Disease*, 103(6):1439.

- LÓPEZ C, FERRIOL M, PICÓ M, (2015). *Mechanical transmission of Tomato leaf curl New Delhi virus to cucurbit germplasm: Selection of tolerance sources in Cucumis melo*. Euphytica 204, 679-91.
- LUIGI M, MANGLI A, VALDES M, SITZIA M, DAVINO S, TOMASSOLI L, (2016). *Occurrence of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting zucchini in Sardinia (Italy)*. Journal of Plant Pathology, 98(3).
- LURIA N, SMITH E, REINGOLD V, BEKELMAN I, LAPIDOT M, LEVIN I, ELAD N, TAM Y, SELA N, ABU-RAS A, EZRA N, HABERMAN A, YITZHAK L, LACHMAN O, DOMBROVSKY A, (2017). *A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-2² resistance genes*. PloS ONE, 12(1):1-19.
- MARTIN DP, MURRELL B, KHOOSAL A, MUHIRE B, (2017). *Detecting and analyzing genetic recombination using RDP4*. In Bioinformatics (pp. 433-460). Humana Press, New York, NY.
- MENZEL W, KNIERIM D, WINTER S, HAMACHER J, HEUPEL M, (2019). *First report of tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in Germany*. New Disease Reports, 39:1.
- MESSIAEN C & FAGBAYIDE J, (2004). *Cucurbita pepo L*. Prota, 2, 272-277.
- MINK GI, (1993). *Pollen and seed-transmitted viruses and viroids*. Annual review of phytopathology, 31(1), 375-402.
- MNARI-HATTAB M, ZAMMOURI S, BELKADHI MS, BELLON DOÑA D, BEN NAHIA E, HAJLAOUI MR, (2015). *First report of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting cucurbits in Tunisia*. New Disease Report 31.
- MORIONES E, PRAVEEN S, CHAKRABORTY S, (2017). *Tomato leaf curl New Delhi virus: an emerging virus complex threatening vegetable and fiber crops*. Viruses 9(10), 264.

NEI M & KUMAR S, (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford, UK: Oxford University Press.

NORIS E, HIDALGO E, ACCOTTO GP, MORIONES E, (1994). *High similarity among the Tomato yellow leaf curl virus isolates from the west Mediterranean basin: the nucleotide sequence of an infectious clone from Spain*. Archives of Virology, 135, 165-70.

NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N, HASE T, (2000). *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*. Nucleic acids research, 28(12), e63-e63.

PADIDAM M, BEACHY RN, FAUQUET CM, (1995). *Tomato leaf curl geminivirus from India has a bipartite genome and coat protein is not essential for infectivity*. Journal of General Virology 76(1), 25-35.

PAMILO P & BIANCHI NO, (1993). *Evolution of the Zfx and Zfy genes: rates and interdependence between the genes*. Molecular Biology and Evolution 10, 271-81.

PANNO S, DAVINO S, RUBIO L, RANGEL E, DAVINO M, GARCÍA-HERNÁNDEZ J, OLMOS A, (2012). *Simultaneous detection of the seven main tomato-infecting RNA viruses by two multiplex reverse transcription polymerase chain reactions*. Journal of Virological Methods, 186:152–156.

PANNO S, FERRIOL I, RANGEL EA, OLMOS A, CHENG-GUI H, MARTINELLI F, RUBIO L, DAVINO S, (2014). *Detection and Identification of Fabavirus species by one step RT-PCR and Multiplex RT-PCR*. Journal of Virological Methods, 197:77-82.

PANNO S, IACONO G, DAVINO M, MARCHIONE S, ZAPPARDO V, BELLA P, TOMASSOLI L, ACCOTTO GP, DAVINO S, (2016). *First report of Tomato leaf curl New Delhi virus affecting zucchini squash in an important horticultural area of southern Italy*. New Disease Report 33.

PANNO S, CARUSO AG, DAVINO S, (2018). *The nucleotide sequence of a recombinant tomato yellow leaf curl virus strain frequently detected in Sicily isolated from tomato plants carrying the Ty-1 resistance gene*. Archives of virology, 163(3):795-797.

PANNO S, CARUSO AG, TROIANO E, LUIGI M, MANGLLI A, VATRANO T, IACONO G, MARCHIONE S, BERTIN S, TOMASSOLI L, PARRELLA G, DAVINO S, (2019a). *Emergence of tomato leaf curl New Delhi virus in Italy: estimation of incidence and genetic diversity*. Plant Pathology, 68(3):601-608.

PANNO S, CARUSO AG, DAVINO S, (2019b). *First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus on Tomato Crops in Italy*. Plant Disease, 103(6): 1443-1443.

PROTEIN DATA BANK – PDB-101, 2019. <http://pdb101.rcsb.org/>

PELHAM J, (1966). *Resistance in tomato to tobacco mosaic virus*. Euphytica, 15(2):258-67.

PICKERSGILL P, (2003) *Peppers and chillies*. In: Caballero, B., Trugo, L. and Finglas, P. (eds.) Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. 2nd edition. Elsevier Science Ltd, pp. 4460-4467.

PUCHADES AV, CARPINO C, ALFARO-FERNANDEZ A, FONT-SAN-AMBROSIO MI, DAVINO S, GUERRI J, RUBIO L, GALIPIENSO L, (2017). *Detection of Southern tomato virus by molecular hybridisation*. Annals of Applied Biology, 171(2):172–178

RIYAZ SM & KATHIRAVAN K, (2019). *Integrated Pest Management Approaches*. In Geminiviruses (pp. 219-235). Springer, Cham.

ROGERS SG, BISARO DM, HORSCH RB, FRALEY RT, HOFFMANN NL, BRAND L, ELMER JS, LLOYD AM, (1986). *Tomato golden mosaic virus A component DNA replicates autonomously in transgenic plants*. Cell 45, 593-600.

ROSEN R, KANAKALA S, KLIOT A, PAKKIANATHAN BC, FARICH BA, SANTANA-MAGAL N, ELIMELECH M, KONTSEDALOV S, LEBEDEV G, CILIA M, GHANIM M, (2015). *Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors*. Current opinion in virology, 15, 1-8.

RYBICKI EP & PIETERSEN G, (1999). *Plant virus disease problems in the developing world*. Virus Res., 53, 127–175.

SALEM N, MANSOUR A, CIUFFO M, FALK BW, TURINA M, (2016). *A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan*. Archives of virology, 161(2), 503-506.

SANDERFOOT AA, LAZAROWITZ SG, (1996). *Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins*. Trends in Cell Biology 6, 353-58.

SANKARAN S, MISHRA A, EHSANI R, DAVIS C, (2010). *A review of advanced techniques for detecting plant diseases*. Computers and Electronics in Agriculture, 72(1), 1-13.

SHARMA N, PRASAD M, (2017). *An insight into plant–Tomato leaf curl New Delhi virus interaction*. The Nucleus 60(3), 335-48.

SHTIENBERG D, (2000). *Modelling: the basis for rational disease management*. Crop Protection, 19(8-10), 747-752.

SUI X, ZHENG Y, LI R, PADMANABHAN C, TIAN T, GROTH-HELMS D, KEINATH AP, FEI Z, ZUJIAN W, LING KS, (2017). *Molecular and Biological Characterization of Tomato mottle mosaic virus and Development of RT-PCR Detection*. Plant disease, 101(5), 704-711.

TALIANSKY M, TORRANCE L, KALININA NO, (2008). *Role of plant virus movement proteins*. In Plant Virology Protocols (pp. 33-54). Humana Press.

TAMURA K, (1992). *Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases*. *Molecular Biology and Evolution* 9, 678-87.

TIWARI AK & NIGAM VK, (2019). *Recent Bio-Processing Technologies for Value Added Horticultural Products*. In *Applied Microbiology and Bioengineering* (pp. 57-67). Academic Press.

US CDC – UNITED STATES CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, (2019). <https://www.cdc.gov/niosh/topics/emerginfectediseases/default.html>

VINCENTE AR, MANGANARIS GA, ORTIZ CM, SOZZI GO, CRISOSTO CH, (2014). *Nutritional quality of fruits and vegetables*. In *Postharvest handling* (pp. 69-122). Academic Press.

WANG YH, BEHERA TK, KOLE C, (Eds.). (2011). *Genetics, genomics and breeding of cucurbits*. CRC Press.

WEBSTER CG, DE JENSEN, CE, RIVERA-VARGAS LI, RODRIGUES JCV, MERCADO W, FRANTZ G, MELLINGER HC, ADKINS S, (2013). *First report of Tomato chlorotic spot virus (TCSV) in tomato, pepper, and jimsonweed in Puerto Rico*. *Plant health progress*, 14(1), 47.

WEIR BS, COCKERHAM CC, (1984). *Estimating F statistics for the analysis of population structure*. *Evolution* 38, 1358-70.

WOOLHOUSE MEJ & DYE C, (2001). *Population biology of emerging and reemerging pathogens – Preface*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 356, 981–982.

ZHANG J, WANG R, SONG J, LUO Z, YANG J, LIN F, (2013). *One-step Multiplex RT-PCR for Simultaneous Detection of Four Viruses in Tobacco*. *Journal of Phytopathology*, 161(2), 92-97.

ZHANG W, OLSON NH, BAKER TS, FAULKNER L, MCKENNA MA, BOULTON MI, DAVIES JW, MCKENNA R, (2001). *Structure of the Maize Streak Virus Geminate Particle*. *Virology*, Volume 279, Pages 471–477. DOI 10.1006/viro.2000.0739.

ZHIGILA DA, ABDULRAHAMAN AA, KOLAWOLE OS, OLADELE FA, (2014). *Fruit morphology as taxonomic features in five varieties of Capsicum annum L. Solanaceae*. *Journal of Botany*, 2014.

ALLEGATO 1. LISTA PUBBLICAZIONI

PUBBLICAZIONI SU RIVISTE ISI O SCOPUS

1. PANNO S, RUIZ-RUIZ S, **CARUSO AG**, ALFARO-FERNANDEZ A, FONT SAN AMBROSIO MI, DAVINO S., (2019). *Real-time reverse transcription polymerase chain reaction development for rapid detection of Tomato brown rugose fruit virus and comparison with other techniques*. PeerJ, 7:e7928. DOI: 10.7717/peerj.7928
2. PANNO S, **CARUSO AG**, DAVINO S, (2019). *First report of Tomato brown rugose fruit virus on tomato crops in Italy*. Plant Disease, DOI: 10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN
3. SANZANI SM, GALLONE T, GARGANESE F, **CARUSO AG**, AMENDUNI M, IPPOLITO A, (2019). *Contamination of fresh and dried tomato by Alternaria toxins in southern Italy*. Food Additives & Contaminants: Part A, 36(5), 789-799. DOI: 10.1080/19440049.2019.1588998
4. PANNO S, **CARUSO AG**, TROIANO E, LUIGI M, MANGLLI A, VATRANO T, IACONO G, MARCHIONE S, BERTIN S, TOMASSOLI L, PARRELLA G, DAVINO S, (2019). *Emergence of tomato leaf curl New Delhi virus in Italy: estimation of incidence and genetic diversity*. Plant Pathology, 68(3), 601-608. DOI: 10.1111/ppa.12978.
5. DAVINO S, PANNO S, **CARUSO AG**, DAVINO M, VÁSQUEZ JAH, (2018). *High genetic stability of potato yellow mosaic Panama virus infecting tomato in Panama*. Journal of Plant Pathology, 1-7. DOI: 10.1007/s42161-018-0028-8.
6. PANNO S, **CARUSO AG**, DAVINO S, (2018). *The nucleotide sequence of a recombinant tomato yellow leaf curl virus strain frequently detected in Sicily isolated from tomato plants carrying the Ty-1 resistance gene*. Archives of Virology, 163(3), 795-797. DOI: 10.1007/s00705-017-3674-9.
7. DAVINO S, PANNO S, ARRIGO M, LA ROCCA M, **CARUSO AG**, LO BOSCO G, (2017). *Planthology: an application system for plant diseases management*. Chemical Engineering Transactions 58 – 2017 – ISBN 978-88-95608-52-5 – ISSN 2283 – 9216 – DOI: 10.3303/CET1758104.

ABSTRACT O PROCEEDING IN CONGRESSI

1. PANNO S, **CARUSO AG**, DAVINO S, (2019). *Reverse transcribed quantitative polymerase chain reaction for rapid screening of Tomato brown rugose fruit virus*. XXV Convegno Nazionale SIPaV, 16-18 settembre 2019, Milano, Atti del Convegno.
2. **CARUSO AG**, PANNO S, DAVINO S, (2019). *Tomato Brown rugose fruit virus: a new pathogen that undermined the tomato trade worldwide*. Incontro di virologia vegetale “One virology One health” (SIV-ISV), 27-28 maggio 2019, Bari.
3. PANNO S, **CARUSO AG**, BERTIN S, TROIANO E, PARRELLA G, TOMASSOLI L, DAVINO S, (2018). *First analysis of epidemiology assessment of Tomato leaf curl New Delhi virus in Italy: a serious risk for the cultivation of zucchini squash*. In: 2nd National Congress of the Italian Society for Virology (SIV-ISV), 28-30 novembre 2018, Roma.
4. **CARUSO AG**, PANNO S, DAVINO S, (2018). *Spread and stability of Tomato yellow leaf curl virus – IL23 in Sicily and partial displacement of its parental*. XXIV Convegno Nazionale SIPaV, 5-7 settembre 2018, Ancona, Atti del Convegno.
5. PANNO S., LUIGI M., TROIANO E., **CARUSO A.G.**, TOMASSOLI L., PARRELLA G., DAVINO S., (2017). *Evolutionary analysis of Tomato leaf curl New Delhi virus in Italy: gene flow and epidemiology*. Journal of Plant Pathology, 99 (Supplement), S56.
6. DAVINO S, LUIGI M, BERTIN S, PANNO S, **CARUSO AG**, TROIANO E, OTGIANU L, NANNINI M, PARRELLA G, TOMASSOLI L, (2017). *Spread of Tomato leaf curl New Delhi virus in Italy: a new challenge for the cultivation of zucchini squash*. In 15th MPU Congress. Cordoba (Spain), 20 – 23 giugno 2017.
7. PANNO S, **CARUSO AG**, GARGANO ML, BELLA P, DAVINO M, DAVINO S, VENTURELLA G, (2017). *Morphological and molecular characterization of distinct species of fungi with potential medicinal interest collected in Sicily*. 9th International Medicinal Mushrooms Conference – IMMC, 24-28 settembre 2017, Palermo, Atti del convegno.

LIBRI E MATERIALE INFORMATIVO

1. DAVINO S, PANNO S, PARRELLA G, DAVINO M, COCUZZA GEM, RAPISARDA C, **CARUSO AG**, CARPINO C, POLIZZI G, VITALE A, (2018). *Avversità del pomodoro – Virus e funghi terricoli*. Edizioni L’Informatore Agrario s.r.l. – ISBN: 978-88-7220-387-3.
2. DAVINO S, PANNO S, **CARUSO AG**, (2018). *Collana PhytoCard – I virus del pomodoro*. Progetto supportato da Road to Quality (Assosementi – Associazione Italiana Sementi).

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare innanzitutto il mio Tutor, Prof. Salvatore Davino, per la disponibilità, la pazienza, e il tempo dedicatomi durante l'intero percorso; la sua guida esperta è stata indispensabile per entrare in contatto con il mondo della ricerca. Esprimo la mia riconoscenza e gratitudine per avermi trasmesso parte della sua esperienza e per avermi guidato costantemente con preziosi consigli.

Ringrazio sinceramente il Dott. Stefano Panno, senza il cui supporto e guida costante questa tesi non esisterebbe. Un ringraziamento per aver potuto fare affidamento su di lui in ogni momento, sapendo di poter contare sempre sulla sua amicizia.

Ringrazio inoltre la Dott.ssa Patrizia Bella, per l'aiuto, il supporto e la gentilezza con cui si è sempre distinta.

Non per ultimo il mio pensiero è rivolto ai miei genitori, per il loro costante supporto, soprattutto nei momenti difficili, senza il quale non avrei potuto portare a compimento questo importante risultato.