

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
*POTATO SPINDLE TUBER VIROID (PSTVd)***

**F. Faggioli¹, E. Costantini¹, F. Di Serio², D. Luison¹, M. Luigi¹,
B. Navarro², MR. Silletti³, L. Tomassoli¹, E. Torchetti², N. Trisciuzzi³**

¹Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura - Centro di Ricerca per la
Patologia Vegetale, Via C.G. Bertero, 22, 00156 Roma

²Istituto di Virologia Vegetale-UOS Bari, Consiglio Nazionale delle Ricerche,
Via Amendola 165/A, 70126 Bari

³Centro di Ricerca, Sperimentazione e Formaizione in Agricoltura “Basile Caramia”
(CRSFA)

INDICE

| | |
|---|---------|
| 1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA | 397 |
| 1.1 Ospiti | 397 |
| 1.2 Sintomatologia | 398 |
| 1.3 Morfologia | 399 |
| 1.4 Epidemiologia e Trasmissione | 399 |
| 1.5 Diagnosi | 399 |
| 1.6 Normativa Fitosanitaria | 400 |
| 2. METODO DI CAMPIONAMENTO | 400 |
| 3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI | 401 |
| 3.1 Metodi Diagnostici Valutati e Validati | 401 |
| 3.2 One-Step RT-PCR | 403 |
| 3.3 Real Time RT-PCR (rt-RT-PCR) | 411 |
| 4. DATI DI VALIDAZIONE | 415 |
| 4.1 Materiale Vegetale Utilizzato | 415 |
| 4.2 Metodo Diagnostico One Step RT-PCR seguito da RFLP | 415 |
| 4.3 Metodo Diagnostico Real Time RT-PCR | 416 |
| 4.4 Parametri di validazione ottenuti | 416 |
| 4.5 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche | 417 |
| 5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO | 418 |
| Allegato I - Strumentazione, reagenti e materiali necessari | 421 |

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

| | |
|-------------------------|---|
| Agente causale | <i>Potato spindle tuber viroid</i> |
| Tassonomia | Famiglia: <i>Pospiviroidae</i> Genere: <i>Pospiviroid</i> |
| Cepi individuati | Severo, lieve |
| Avversità | Tubero fusiforme della patata |
| Sinonimi | potato spindle tuber virus, potato gothic virus, rubber viroid India, tomato bunchy top |
| Acronimo | PSTVd |

1.1 Ospiti

La malattia è stata descritta per la prima volta su patata (*Solanum tuberosum*) nel 1922 (Martin, 1922) negli Stati Uniti d'America. Successivamente è stata descritta anche in Europa (Cammack e Richardson, 1963) e Asia (Balashev, 1941). L'etiologia della malattia è rimasta sconosciuta fino a quando T.O. Diener dimostrò che il suo agente causale è un RNA di piccole dimensioni ed infettivo, con caratteristiche molecolari differenti da quelle dei virus fino ad allora conosciuti, a cui egli diede il nome di viroide del tubero fusiforme della patata (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) (Diener, 1971). Il genoma completo di PSTVd è stato sequenziato per la prima volta nel 1978 (Gross *et al.*, 1978). Negli anni '90 sono state riportate infezioni naturali di PSTVd anche in pomodoro (*S. lycopersicum*) (Puchta *et al.*, 1990), pepino (*Solanum muricatum*) (Puchta *et al.*, 1990; Shamloul *et al.*, 1997) e avocado (*Persea americanum*) (Querchi *et al.*, 1995). Infezioni di pomodoro da parte di PSTVd state segnalate sporadicamente in Europa (Verhoeven *et al.*, 2004; EPPO, 2004; EPPO 2003) ed un solo caso è stato registrato in Italia (Navarro *et al.*, 2009)

A partire dal 2000, PSTVd è stato individuato in altri ospiti tra cui piante di peperone (*Capsicum annuum*) che mostravano sintomi di ondulatura dei margini fogliari in Nuova Zelanda (Lebas *et al.*, 2005) e in piante asintomatiche di ribes del Capo (*Phisalys peruviana*) (Verhoeven *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 2010) e di numerose specie di Solanaceae ornamentali, quali *Brugmansia* sp. (Verhoeven *et al.*, 2008a), *Calibrachoa* sp. (Verhoeven, 2010), *Cestrum* sp. (Luigi *et al.*, 2011), *Chrysanthemum* sp. (Lemmetty *et al.*, 2011), *Datura* sp. (Verhoeven *et al.*, 2010), *Lycianthes rantonnetii* (Di Serio, 2007), *Petunia* sp. (Mertelik *et al.*, 2010), *Streptosolen jamesonii* (Verhoeven *et al.*, 2008b), *Solanum jasminoides* (Verhoeven *et al.*, 2008a).

1.2 Sintomatologia

I sintomi su solanacee di interesse agrario possono variare in funzione della virulenza del ceppo, della cultivar colpita, dell'età della pianta al momento dell'inoculo e delle condizioni ambientali.

La parte epigea, se colpita gravemente, può presentare nanismo, fillotassi in senso orario delle foglie (individuabile guardando la pianta dall'alto), portamento asurgente, ingiallimenti oppure foglie di colore più scuro del normale e leggermente rugose, accumulo di pigmento alla sommità degli steli normalmente accompagnato da arrotolamento verso l'alto delle foglioline apicali. Le gemme ascellari possono proliferare e produrre formazioni simili a scopazzi.

PATATA



I tuberi, a carico dei quali si evidenziano i sintomi più vistosi, possono risultare di dimensioni ridotte, deformati, affusolati, con la caratteristica forma “a manubrio” e presentare occhi in rilievo regolarmente distribuiti sull'intera superficie. Il germogliamento è più lento rispetto ai tuberi sani.

A sinistra tubero sano, a destra due tuberi infetti da PSTVd;
Foto da PPS, Wageningen, (NL)



POMODORO

La rugosità delle foglie apicali è seguita dalla necrosi e ingiallimenti nella regione mediana della pianta. A seguito di infezioni da parte di ceppi severi ed in condizioni ambientali favorevoli alla malattia, negli stadi più avanzati della stessa si può riscontrare nanismo, rimpicciolimento delle foglie apicali, accorciamento degli internodi e morte delle foglie centrali.

A sinistra pianta di pomodoro sana, a destra affetta da PSTVd.
Foto da FERA - York (England)

1.3 Morfologia

Da un punto di vista biochimico, il PSTVd è costituito da una molecola di RNA a singolo filamento circolare di 356-361 nucleotidi (nt), che non codifica nessuna proteina. PSTVd come gli altri viroidi, utilizza quindi le proteine dell'ospite per portare a compimento le proprie funzioni biologiche quali la replicazione, la diffusione sistemica nell'ospite e l'attività patogenetica. Nella molecola di RNA sono presenti cinque domini strutturali (centrale, patogenetico, variabile, terminale destro e terminale sinistro) in alcuni dei quali sono presenti regioni nucleotidiche altamente conservate a cui sono state attribuite specifiche funzioni (Flores *et al.*, 2012).

1.4 Epidemiologia e trasmissione

I dati ottenuti sulla trasmissione del PSTVd tramite insetti hanno dato risultati discordanti. Infatti la trasmissione tramite gli afidi *Myzus persicae* Sulzer e *Macrosiphum euphorbiae* Thomas (Kennedy *et al.*, 1962; Smith, 1972) non è stata confermata negli esperimenti seguenti (Schuman *et al.*, 1980). Anche l'efficienza di trasmissione di PSTVd su pomodoro attraverso la puntura di afidi si è mostrata piuttosto bassa (De Bokx e Piron, 1981).

L'efficienza di questa via di trasmissione del viroide aumenta notevolmente quando il PSTVd viene acquisito su piante che mostrano co-infezione con Potato leafroll virus (PLRV, genere Polerovirus) a causa del fenomeno dell'eteroincapsidazione di PSTVd (Querci *et al.*, 1997; Singh and Kurz, 1997).

Il PSTVd può essere trasmesso anche attraverso semi e polline sia in patata (Hunter *et al.*, 1969; Singh, 1970; Singh *et al.*, 1992) che in pomodoro (Benson e Singh, 1964; Singh, 1970; Kryczynski *et al.*, 1988).

Comunque, la più efficiente diffusione del viroide è determinata dalla commercializzazione di materiale di propagazione infetto e da altre attività antropiche, incluse alcune operazioni colturali.

1.5 Diagnosi

La diagnosi del viroide può essere effettuata attraverso diverse metodiche, che differiscono tra loro per sistema di riconoscimento, sensibilità ed applicabilità.

Metodi biologici: prevedono l'utilizzo di piante indicatrici che, se sperimentalmente inoculate con preparazioni estratte da campioni infetti, manifestano in un arco definito di tempo alterazioni specifiche e facilmente individuabili sulla vegetazione.

Metodi molecolari: sono basati sul riconoscimento del genoma del viroide, dopo una estrazione dello stesso dalla matrice vegetale, per mezzo del riconoscimento diretto dell'RNA viroidale (tecniche del dPAGE o dell'ibridazione molecolare) o tramite la trascrizione inversa e l'amplificazione dell'acido nucleico target e successiva visualizzazione su gel di agarosio (RT-PCR) o per mezzo di chemiluminescenza

(real time RT-PCR).

1.6 Normativa fitosanitaria

Il PSTVd è inserito nelle liste dei patogeni da quarantena di tutto il mondo. Recentemente, essendo stato ritrovato in maniera latente su diverse solanacee ornamentali in diversi paesi membri della UE tra cui l'Italia, sono state adottate misure fitosanitarie d'emergenza al fine di impedirne l'introduzione e l'ulteriore diffusione tra gli Stati membri (Decisione della Commissione del 12 giugno 2007 e Decreto Ministeriale 28 gennaio 2008). Questo Decreto Ministeriale di lotta obbligatoria prevede che i vegetali della specie di *Solanum jasminoides* Paxton e del genere *Brugmansia* Pers. spp., possano essere commercializzati (acquistati e venduti) all'interno del territorio comunitario solo se accompagnati da passaporto fitosanitario CE previsto dal D.lgs 214/05 che viene rilasciato a quei lotti che: vengono prodotti in Stati in cui la malattia è assente o in zone ritenute indenni dall'organismo nocivo (ai sensi delle pertinenti norme internazionali per le misure fitosanitarie) oppure siano stati controllati e trovati esenti dal viroide dell'affusolamento dei tuberi di patata, prima del trasporto oppure in cui tutte le piante madri associate alle piante specificate siano state controllate e trovate esenti dal viroide dell'affusolamento dei tuberi di patata, prima del trasporto delle piante specificate. L'European Food Safety Authority (EFSA) ha recentemente condotto una valutazione del rischio fitosanitario legato alla diffusione dei pospiviroidi in Europa e delle misure di emergenza adottate per contrastare la diffusione di PSTVd negli Stati membri (EFSA Panel on Plant Health, 2011).

2. METODO DI CAMPIONAMENTO

Un corretto campionamento è un presupposto fondamentale per l'attendibilità del risultato di qualsiasi saggio diagnostico ed anche lo stato di degradazione del materiale vegetale costituente il campione può influire sul risultato dell'analisi di laboratorio.

Il corretto campionamento prevede quindi:

- Il prelievo del campione vegetale con la metodologia indicata;
- Il corretto mantenimento del campione vegetale sino alla consegna al laboratorio;
- La rapida spedizione al laboratorio di diagnosi.

Non è stato identificato un periodo più idoneo per il rilevamento del PSTVd che quindi può essere effettuato durante tutto l'anno.

Matrice: Foglie. Da prove sperimentali condotte dal Gruppo di Lavoro e confermate anche da lavori di colleghi stranieri, si è dimostrato che la sensibilità dei protocolli è tale da poter individuare, all'interno di campioni pool, la presenza di una sola foglia infetta in un totale di 25. In considerazione del fatto che, come previsto dal Decreto di Lotta obbligatoria, anche la sola presenza di una pianta infetta all'interno di un Lotto prevede la distruzione dello stock intero, e che spesso ci si trova di fronte a partite numerosissime, la possibilità di effettuare campioni pool diminuisce il numero

di analisi da eseguire ed aumenta il numero di piante controllate.

Tipologia del campione: per avere un livello di confidenza del 99% supponendo un'infezione all'interno del lotto variabile dall'1 al 5%, il numero di campioni da prelevare, a seconda della consistenza del lotto, è calcolato con la seguente tabella:

| Numero di piante del lotto | Numero di campioni da prelevare 1 campione = 25 piante = 1 foglia per pianta = 25 foglie totali (*) |
|----------------------------|--|
| <500 | 4 |
| 501-5.000 | 8 |
| 5.001-10.000 | 10 |
| 10.001-100.000 | 12 |
| >100.000 | 14 |

(*) le foglie devono essere prelevate dai rami semilegnosi, evitando le foglie apicali appena emesse (Fonte: International Standards for Phytosanitary Measures, ISPM n. 31, "Methodologies for sampling of consignments", 2008).

I campioni devono essere scelti ai bordi, al centro e lungo le diagonali della parcella del lotto.

Mantenimento del campione: Il materiale vegetale deve essere asciutto e deve essere posto in bustine di plastica opportunamente chiuse.

Rintracciabilità del campione: Ogni campione deve essere opportunamente contrassegnato con una sigla riconducibile all'azienda e al lotto in cui è stato effettuato il prelievo.

Spedizione del campione: I campioni raccolti devono essere processati il prima possibile, per cui devono arrivare al laboratorio di diagnosi entro 48 ore.

I campioni vegetali possono essere mantenuti a 4°C non oltre i 7 giorni. In alternativa il campione vegetale può essere conservato a -20°C per 2-3 mesi. Conservazioni più lunghe possono inficiare il risultato del saggio diagnostico.

Tutti i campioni vegetali qualora risultassero alterati, manifestando ad esempio imbrunimenti o inizio di muffa, non devono essere processati, perché i risultati sono assolutamente inattendibili.

3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

3.1 Metodi diagnostici valutati e validati

La scelta dei metodi diagnostici da validare e la definizione dei parametri ISO 16140:2003 e degli standard EPPO Diagnostics PM7/76 e PM7/98 è scaturita dal lavoro congiunto di un **Gruppo di lavoro** di esperti costituito da:

CRA-PAV Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma (Coordinatore del Gruppo), Dr. Francesco Faggioli, Dr.ssa Laura Tomassoli, Dr.ssa Marta Luigi; Dr.ssa Elisa Costantini; Dr. Davide Luison

CNR-IVV Istituto di Virologia Vegetale del CNR Sezione di Bari, Dr. Francesco Di Serio, Dr.ssa Beatriz Navarro; Dr.ssa Enza Maria Torchetti
CRSA – Basile Caramia di Locorotondo: Dr. Nicola Trisciuzzi, Dr.ssa Maria Rosaria Silletti

La definizione del parametro di riproducibilità è scaturita dall'effettuazione di un ringtest inter laboratorio nazionale a cui hanno partecipato i laboratori dei seguenti Servizi Fitosanitari Regionali (SFR):

SFR Emilia Romagna, Referenti Dr.ssa. Patrizia Grillini; Dr.ssa Assunta D'Anniballe
SFR Friuli Venezia Giulia – ERSA, Referente: Dr. Gian Luca Bianchi
SFR Lombardia, Referente: Dr.ssa. Marica Calvi
SFR Marche, Referente Dr. Lucio Flamini
SFR Piemonte, Referente: Dr.ssa Giovanna Mason
SFR Toscana, Referente Dr. Domenico Rizzo;
SFR Valle D'Aosta, Referente Dr. Fabio Guglielmo

La problematica della diagnosi di PSTVd risulta alquanto complicata in considerazione del fatto che questo viroide è molto simile, da un punto di vista dell'omologia di sequenza, alle altre specie del genere Pospiviroid. Questo inficia molto la specificità delle tecniche diagnostiche in quanto risulta molto complesso mettere a punto sistemi di identificazione specifici per PSTVd che non si basino sul sequenziamento del genoma viroidale. Dopo una attenta valutazione dei protocolli presenti in bibliografia, si è arrivati alla decisione di individuare due tecniche diagnostiche altamente specie-specifiche. In particolare, per la tecnica di amplificazione qualitativa, sono stati scelti dei primer disegnati da Di Serio, (2007), in grado di amplificare, tra le dieci specie di Pospiviroid, solamente PSTVd e Tomato apical stunt viroid (TASVd). Si è anche verificato che con una successiva analisi RFLP, utilizzando l'enzima di restrizione *A_hI* è possibile distinguere, in caso di risultato positivo dell'amplificazione, PSTVd da TASVd. In considerazione del fatto che TASVd è presente anche nell'Alert List della EPPO, si è ritenuto che un sistema in grado di diagnosticare con un'unica reazione sia PSTVd che TASVd e che, in caso di positività, consentisse anche l'individuazione specie-specifica, fosse la soluzione migliore. Come protocollo di amplificazione è stato adottato un protocollo di one step RT-PCR messo a punto da Faggioli e colleghi (Faggioli *et al.*, 2005). Per la scelta della tecnica di amplificazione quantitativa, in letteratura esiste un solo riferimento (Boonham *et al.*, 2004). Non è stato possibile disegnare primer e sonde più specifiche di quelle già disegnate, quindi per aumentare la specificità della metodica, è stato appurato che, eventuali reazioni aspecifiche, dovute alla presenza di altre specie di Pospiviroid, si innescano solamente negli ultimi cicli del programma di amplificazione. In considerazione di quanto sopra, è stato stabilito che l'adozione della tecnica di Real time RT-PCR, basata sul protocollo di Boonham, preveda di considerare positivi, per l'infezione da PSTVd solamente i campioni che superino il Threshold entro i primi 30 cicli di amplificazione.

Sulla base delle considerazioni sopra riportate, le tecniche diagnostiche scelte e validate sono state le seguenti:

| Metodo diagnostico | Componente virale riconosciuta |
|---|----------------------------------|
| Molecolare: one step RT-PCR + RFLP con primer disegnati da Di Serio (2007) e protocollo di one step RT-PCR messo a punto da Faggioli <i>et al.</i> , (2005). | acido nucleico viroidale (ssRNA) |
| Molecolare: real time RT-PCR (rt RT-PCR) con protocollo messo a punto da Boonham <i>et al.</i> , (2004) | acido nucleico viroidale (ssRNA) |

3.2 One-step RT-PCR

Questo metodo diagnostico consente la contemporanea individuazione di PSTVd e Tomato apical stunt viroid (TASVd, *Pospiviroid*, *Pospiviroidae*).

Preparazione del saggio *RT-PCR*

Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli in modo da riportare la sigla sulle provette da PCR.

Preparare un opportuno schema cartaceo, in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni evento di amplificazione vanno inseriti una serie di controlli: controllo positivo, controllo negativo per ogni specie saggiata e un controllo acqua. Si consiglia di non superare il numero di 30 campioni per evento di amplificazione (compresi i controlli).

Come controllo positivo e negativo devono essere utilizzati campioni di materiale vegetale, appartenenti alla stessa matrice e alla stessa specie dei campioni saggiati, provenienti da una pianta sicuramente infetta da PSTVd e da una pianta sicuramente esente da PSTVd, rispettivamente.

Il controllo acqua è costituito da acqua deionizzata e sterile caricata al posto del RNA totale (TotRNA)

Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta bibula da laboratorio. Usare solo provette e puntali con filtro sterili da maneggiare SEMPRE indossando guanti monouso.

Estrazione con *kit commerciale (Spectrum Plant Total RNA Kit Sigma-Aldrich)*

Preparare le provette e le colonnine presenti nel kit in ugual numero dei campioni da saggiare ed seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della Ditta produttrice.

Dividere ogni foglia di cui è composto il campione a metà, usare una metà per l'analisi e conservare l'altra metà in congelatore (-20°C). Macerare accuratamente il tessuto vegetale con azoto liquido e, dopo la macerazione, prelevare la quantità richiesta dal kit commerciale.

Inserire sempre l'estrazione di un controllo sicuramente infetto dal viroide e un controllo sicuramente esente dall'infezione viroidale, appartenente alla stessa specie vegetale e alla stessa matrice saggiate. Nel caso in cui non si dispone di azoto liquido (previsto nelle istruzioni dei kit commerciali) si può procedere come segue:

- Prelevare un piccolo pezzettino da ogni foglia di cui è composto il campione e collocare il tutto per un massimo di 0,1-0,2 g nella bustina tipo 'Bioreba'
- Aggiungere 1 ml del primo tampone del kit di estrazione nella bustina.
- Macerare il campione fino all'ottenimento di una poltiglia semi-liquida. E' consigliato mantenere in ghiaccio i campioni omogenati.
- Trasferire sotto cappa fino a 500 µl di omogenato in una provetta da 2,0 ml facendo attenzione di prelevare dalla bustina nella parte opposta a quella dove è stato inserito il campione, quindi aggiungere 2-mercaptoetanolio, secondo le istruzioni del kit di estrazione.
- Proseguire seguendo il protocollo del kit.

Saggio RT-PCR

Primer

Per la diagnosi del PSTVd/TASVd i primers suggeriti sono i seguenti (Di Serio, 2007):

| | |
|---------------------|------------------------------------|
| PSTVd 33H (forward) | 5'- TCACCCCTTCCTTTCTTCGGGTGTC - 3' |
| PSTVd 32C (reverse) | 5'- AAACCCTGTTTCGGCGGAATTAC - 3' |

I primers possono essere ordinati presso apposite ditte commerciali che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati. E' conveniente diluire i primers ad una concentrazione di 100 µM in dH₂O sterile (seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice) e conservare queste soluzioni madri a -20°C. Preparare, inoltre, delle sub-aliquote di circa 50 µl totali alla concentrazione di 10 µM in acqua sterile e conservarle a -20 °C.

Preparazione del saggio

- Indossare guanti puliti.
- Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenere queste attrezzature sotto la luce U.V. almeno per 10 minuti prima di utilizzarle
- Siglare le provette e metterle in ordine in un portaprovette mantenuto in ghiaccio.
- Scongellare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata mantenendoli in ghiaccio.
- Preparare la miscela di reazione tenendola in ghiaccio

| | |
|---|------------|
| •5 µl 5X GoTaq DNA polimerasi buffer bianco (includente anche 15 mM MgCl ₂) | 1- acqua |
| | 2- buffer |
| •100 µM dNTPs (totale) | 3-dNTPs |
| •0,16 µM ciascun primer (32C/33H) | 4- primers |
| •25 U enzima AMV-RT | 5- enzimi |
| •1,25 U enzima Taq DNA polimerasi | |
| •20 U enzima inibitore delle RNasi | |
| •2 µl RNA totale estratto (TotRNA) | |

Volume totale: 25 µl con acqua sterile RNasi-free

- Mescolare bene la soluzione.
- Distribuire 23 µl di miscela di reazione per ciascuna provetta.
- Aggiungere l'estratto di TotRNA a ciascuna provetta, cambiando puntale ad ogni campione.
- Dare una breve centrifugata alle provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.
- Inserire le provette nel termociclatore.
- Avviare la RT-PCR dopo aver selezionato il programma prescelto.

Ciclo di amplificazione

| | Temperatura | Tempo | N° di cicli |
|----------------------|-------------|-------|-------------|
| Trascrizione inversa | 46 °C | 30' | 1 |
| Denaturazione | 94 °C | 3' | 1 |
| Amplificazione | 94 °C | 30" | 35 |
| | 62 °C | 30" | |
| Amplificazione | 72 °C | 60" | 35 |
| | 72 °C | 60" | |
| Estensione finale | 72 °C | 7' | 1 |
| Step di blocco | 4 °C | 10' | 1 |

Conservare le provette in frigorifero.

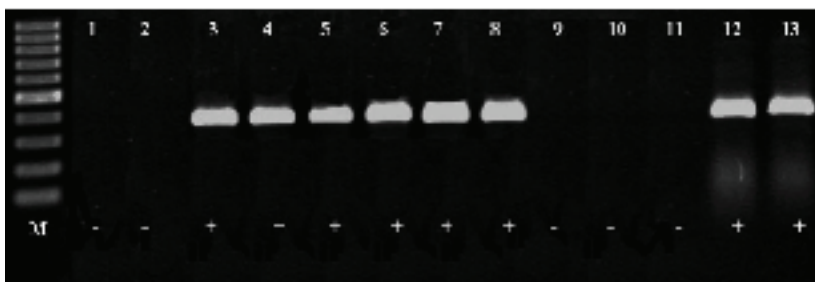
Visualizzazione risultati tramite elettroforesi su gel di agarosio

Per l'esecuzione del saggio seguire le seguenti tappe operative:

1. Preparare il gel di agarosio 1,2% in TBE1X.
2. Dare una breve centrifugata alle provette contenenti i cDNA amplificati per eliminare l'eventuale condensa formatasi sul tappo, che può provocare al momento della apertura pericolose contaminazioni per aerosol.
3. Caricare 10 µl del campione in ciascun pozzetto, dopo aver aggiunto 2 µl di loading buffer 6X. Cambiare il puntale ad ogni campione.
4. Caricare in un pozzetto un marker idoneo (range circa 50-1000 bp).
5. Correre per circa 60 minuti a 100 volt, facendo riferimento al fronte del colorante.
6. Estrarre il gel dalla cella e trasferirlo per 15-30 minuti circa in una soluzione di Bromuro di Etidio o con altri intercalanti di acidi nucleici vocati allo scopo e di adeguata sensibilità.
7. Lavare il gel per circa 5 minuti in H₂O.
8. Osservare il gel mediante un transilluminatore ad U.V.

Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo per PSTVd/TASVd si osserverà una banda di 360 bp che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo. Nel caso della figura sotto riportata, i campioni 3,4,5,6,7,8,12 e 13 dovranno essere sottoposti ad RFLP per stabilire se si tratti di PSTVd o TASVd.



Analisi di restrizione RFLP

In caso di campioni positivi, con banda all'altezza di 360 bp corrispondente al controllo positivo, per stabilire se si tratti di PSTVd o TASVd, è necessaria l'esecuzione di una analisi di restrizione per verificare la lunghezza dei frammenti ottenuti.

1. Indossare guanti puliti.
2. Siglare le provette e metterle in ordine.
3. Scongellare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata mantenendoli in ghiaccio.

4. Preparare la miscela di reazione tenendola in ghiaccio.

| Miscela di reazione | Ordine di inserimento |
|---|-----------------------|
| • 3 µl 10X Fast Digest Green Buffer | 1- acqua |
| • 1 µl (1U/µl) di enzima di restrizione Alu I | 2- buffer |
| • 10 µl amplificato (dsDNA) | 3- enzimi |

Volume totale: 30 µl con acqua sterile RNasi-free

Incubare a 37°C per 45 minuti.

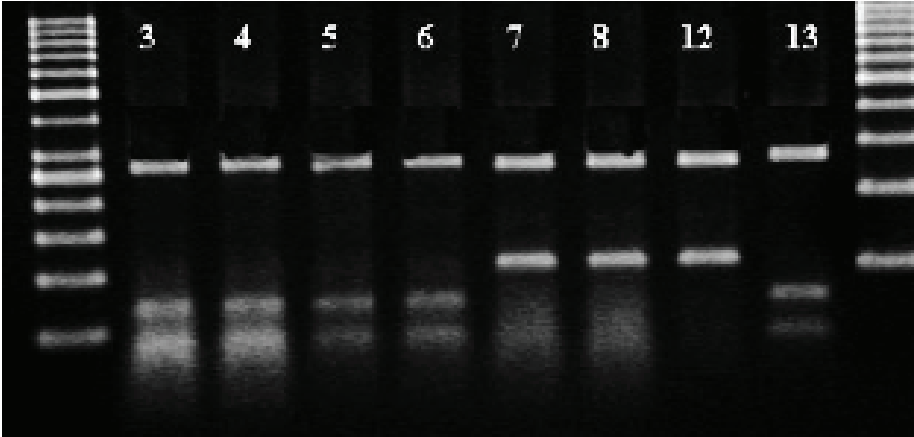
Elettroforesi su gel di agarosio

Per l'esecuzione del saggio seguire le seguenti tappe operative:

1. Preparare il gel di agarosio 2,4% in TBE1X.
2. Dare una breve centrifugata alle provette contenenti i cDNA amplificati e digeriti per eliminare l'eventuale condensa formatasi sul tappo, che può provocare al momento della apertura pericolose contaminazioni per aerosol.
3. Caricare 15 µl del campione in ciascun pozzetto, non è necessario aggiungere loading buffer perché già presente nel tampone di reazione. Cambiare il puntale ad ogni campione.
4. Caricare in un pozzetto un marker idoneo (range circa 50-1000 bp).
5. Correrne per circa 45 minuti a 100 volt, facendo riferimento al fronte del colorante.
6. Estrarre il gel dalla cella e trasferirlo per 15-30 minuti circa in una soluzione di Bromuro di Etidio o con altri intercalanti di acidi nucleici vocati allo scopo e di adeguata sensibilità
7. Lavare il gel per circa 5 minuti in H₂O.
8. Osservare il gel mediante un transilluminatore ad U.V..

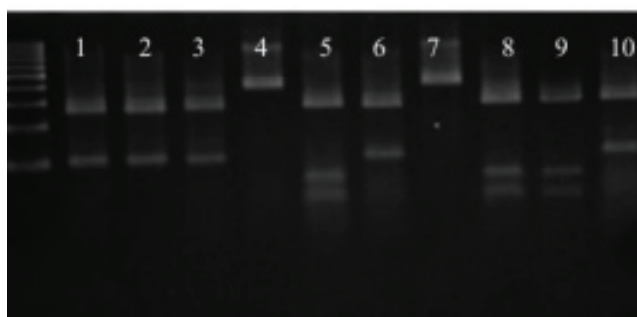
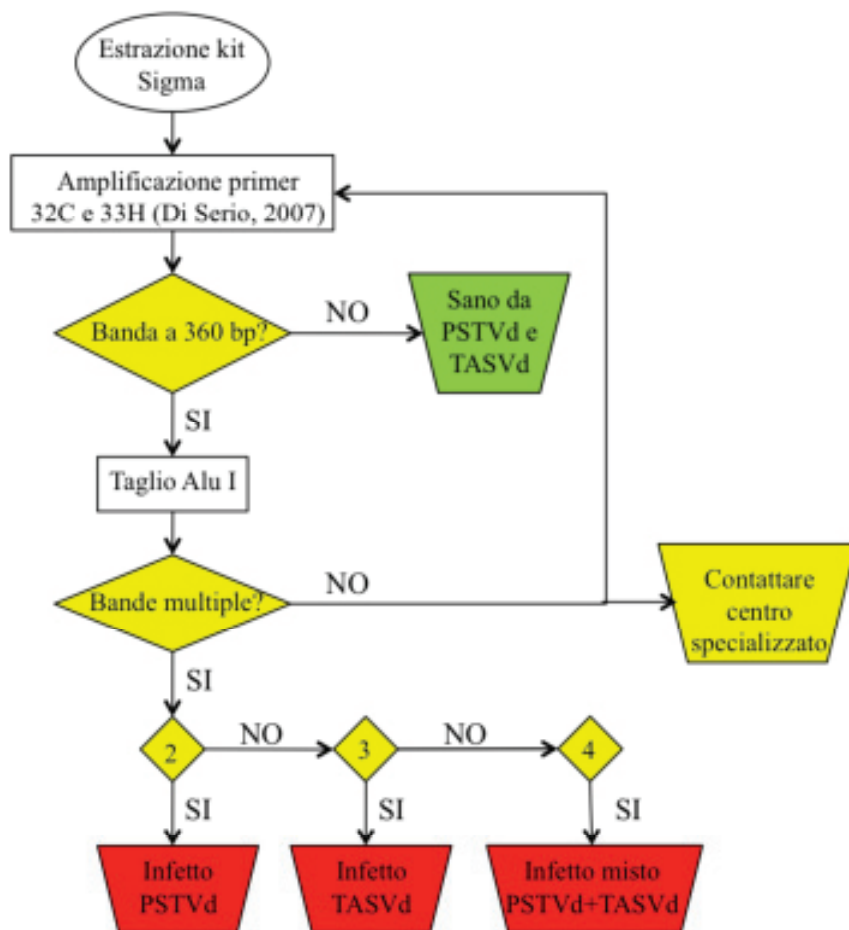
Valutazione dei risultati

Il saggio indica infezione di PSTVd in quei campioni che generano 2 bande nel gel, corrispondenti a cDNA di 258 bp e di 101 bp; se invece nel gel si identificano 3 bande, corrispondenti a cDNA di 247, 61 e 37 bp, il saggio indica che i campioni sono infetti da TASVd. La differenza nel numero di bande, e nella lunghezza di quelle più piccole, consente una facile identificazione del tipo di patogeno anche se la risoluzione di un gel di agarosio 2,4 % non consente di discriminare le due bande maggiori (258 bp per PSTVd e 247 bp per TASVd) che risultano così uguali.



Nello specifico, si riporta un gel elettroforetico in cui sono stati analizzati campioni risultati positivi in RT-PCR (pagina precedente) digeriti con AluI. I campioni 3, 4, 5, 6 e 13 sono infetti da TASVd, i campioni 7, 8 e 12 sono infetti da PSTVd. La differenza tra i due tipi di taglio si nota in modo particolare

DIAGRAMMA DI FLUSSO DEL SAGGIO DI ONE STEP RT-PCR + RFLP



- 1: PSTVd
- 2: PSTVd
- 3: PSTVd
- 4: Sano per PSTVd/TASVd
- 5: TASVd
- 6: PSTVd
- 7: Sano per PSTVd/TASVd
- 8: TASVd
- 9: TASVd
- 10: PSTVd

Punti critici del protocollo

- Il punto debole della RT-PCR è che si tratta di una reazione altamente sensibile, che consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi ma che, se non utilizzata correttamente, può dare campioni falsi positivi o provocare delle contaminazioni nel laboratorio (reagenti contaminati, estratti contaminati, blocco del termociclatore contaminato, Micropipette contaminate, etc.). Si raccomanda, pertanto, di lavorare con ESTREMA attenzione e di avvalersi SEMPRE di controlli negativi sicuri per verificare la validità di ogni evento di amplificazione.
- Al fine di evitare contaminazioni si raccomanda di:
 - organizzare il laboratorio di diagnosi molecolare, se possibile, con ambienti separati (laboratorio per estrazione, laboratorio per amplificazione e laboratorio per elettroforesi). Se ciò non è possibile utilizzare assolutamente bancali separati per le tre fasi e set di Micropipette dedicate a ciascuna fase. Fare molta attenzione al bancale di elettroforesi, dove si maneggiano amplificati;
 - è consigliabile aliquotare tutti i reagenti ed al primo sospetto di contaminazione, eliminarli tutti e ripartire da aliquote nuove (in caso di contaminazione è molto difficile risalire al reagente o campione contaminato);
 - usare solo acqua sterile RNasi - free (se preparata in laboratorio è meglio utilizzare acqua DEPC);
 - cambiare i guanti frequentemente durante le operazioni di preparazione della miscela di reazione e di caricamento dei target (estratti TotRNA);
 - usare solo puntali sterili con filtro;
 - al momento di caricamento del blocco del termociclatore accertarsi che le provette siano ben chiuse; se al termine di una PCR si ritrovano provette aperte all'interno del termociclatore (dovute ad una chiusura non ermetica del coperchio od a provette fallate) trattare il blocco con soluzioni di DNasi reperibili in commercio.
- controllare sempre l'etichetta dei reagenti, in particolare quella degli enzimi, prima di effettuare le opportune diluizioni (le Unità di enzima possono variare in funzione del lotto utilizzato).
- mantenere in ghiaccio le provette contenenti la miscela di reazione, durante la preparazione della RT-PCR.
- fare attenzione a caricare in modo uniforme le provette nel blocco del termociclatore, la chiusura non ermetica del coperchio può produrre temperature disomogenee con conseguenti reazioni di amplificazione parziali o non confrontabili tra i campioni.
- rispettare scrupolosamente le condizioni di conservazione di tutti i reagenti. In particolare mantenere sempre in ghiaccio gli enzimi quando vengono utilizzati nella preparazione della miscela di reazione.

3.3 Real time RT-PCR (rt-RT-PCR)

Preparazione del saggio rt RT-PCR

Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli. Ciascun campione deve essere replicato 2 volte nell'esperimento. Preparare un opportuno schema cartaceo, in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni evento di amplificazione vanno inseriti una serie di controlli:

Un controllo negativo ogni 30 campioni costituito dalla miscela di reazione in cui vengono aggiunti 1µl di acqua sterile al posto dell'estratto;

Un controllo negativo ogni 30 campioni costituito da un campione sicuramente esente da PSTVd, appartenente alla stessa matrice ed alla stessa specie dei campioni da saggiare, preparato congiuntamente agli altri;

Un controllo positivo costituito da un campione, appartenente alla stessa matrice ed alla stessa specie dei campioni da saggiare, sicuramente infetto da PSTVd, preparato congiuntamente agli altri.

Estrazione TotRNA con kit commerciale (Spectrum Plant Total RNA Kit Sigma-Aldrich)

Preparare le provette e le colonnine presenti nel kit in ugual numero dei campioni da saggiare ed seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della Ditta produttrice(**).

Dividere ogni foglia di cui è composto il campione a metà, usare una metà per l'analisi e conservare l'altra metà in congelatore (-20°C). Macerare accuratamente il tessuto vegetale con azoto liquido e, dopo la macerazione, prelevare la quantità richiesta dal kit commerciale.

Inserire sempre l'estrazione di un controllo sicuramente infetto dal virus e un controllo sicuramente esente dall'infezione virale, appartenente alla stessa specie vegetale e alla stessa matrice saggiata.

(**)Nel caso in cui non si dispone di azoto liquido (previsto nelle istruzioni dei kit commerciali) si può procedere come segue:

- Prelevare un piccolo pezzettino da ogni foglia di cui è composto il campione e collocare il tutto per un massimo di 0,1-0,2 g nella bustina tipo 'Bioreba'
- Aggiungere 1 ml del primo tampone del kit di estrazione nella bustina
- Macerare il campione.
- Trasferire sotto cappa 500 µl di omogenato in una provetta da 2,0 ml e aggiungere 2-mercaptoetanololo, secondo le istruzioni del kit di estrazione.
- Proseguire seguendo il protocollo del kit.

Saggio rt RT-PCR

Primers e sonda

Per la diagnosi del PSTVd si utilizzano i primers e la sonda TaqMan (Boomhan *et al.*, 2004) di seguito riportati:

| | |
|-------------------|--|
| PSTVd 296R | 5'- AAGCGGTTCTCGGGAGCTT-3' |
| PSTVd 231F | 5'- GCCCCCTTTGCGCTGT-3' |
| PSTVd 251T | 5'-FAM- CAGTTGTTTCCACCGGGTAGTAGCCGA-TAMRA-3 |

I primers e la sonda possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati.

Diluire i primers alla concentrazione d'uso di 100 μ M in dH₂O sterile e suddividerli in aliquote da 10 μ M da mantenere a -20 °C.

E' conveniente diluire la sonda ad una concentrazione di 50 μ M in dH₂O sterile e conservare la soluzione madre a -20 °C. Preparare, quindi, delle sub-aliquote di circa 20 μ l totali ad una concentrazione d'uso di 5 μ M in dH₂O sterile e conservarle a -20°C da utilizzare nella preparazione della miscela di reazione.

La soluzione madre e le aliquote DEVONO essere mantenute rigorosamente al buio.

Preparazione del saggio

Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta.

Indossare un camice dedicato alla preparazione della mix per real time PCR (un camice che non deve essere stato utilizzato nella manipolazione di amplificati o durante la fase di estrazione dei campioni).

Usare solo provette e puntali con filtro sterili da maneggiare SEMPRE indossando guanti monouso.

1. Indossare guanti puliti.
2. Sterilizzare sotto U.V. pipette, puntali con filtro, porta provette.
3. Preparare la mix in un area dedicata solo a questo scopo (si consiglia di preparare la mix sotto una cappa per PCR).
4. Se si utilizzano provette NON siglarle per nessun motivo (il pennarello altera la lettura della fluorescenza emessa all'interno del termociclatore), metterle in ordine in un porta provette mantenuto in ghiaccio, distribuire i controlli negativi all'interno della piastra alternando circa un controllo negativo ogni 30 campioni.
5. Se si utilizzano piastre disporle sull'apposito supporto in dotazione con il termociclatore.
6. Scongela i reagenti mantenendoli in ghiaccio per preparare la miscela di reazione sotto specificata.
7. Preparare la miscela di reazione tenendola in ghiaccio.

Miscela di reazione:

- 12,5 µl 2X one step RT Master mix TaqMan (Applied Biosystems)
 - 0,625 µl 40X MultiScribe RT mix (comprensivo di RNase inhibitor) (Applied Biosystem)
 - 8,875 µl dH₂O
 - 0,75 µl 10µM primer F
 - 0,75 µl 10µM primer R
 - 0,5 µl 5µM TaqMan probe
1. distribuire 24 µl di miscela di reazione per ciascuna provetta o pozzetto,
 2. cambiare area di lavoro e caricare 1 µl di estratto con una micro pipetta dedicata SOLO a questo scopo.
 3. inserire le provette o la piastra nel termociclatore
 4. avviare la PCR dopo aver selezionato il programma prescelto:

Ciclo di amplificazione

| Temperatura | Tempo | N° di cicli |
|-------------|-------|-------------|
| 48 °C | 30' | 1 |
| 95 °C | 10' | 1 |
| 95 °C | 15'' | 40 |
| 60 °C | 1' | |

Controllare i risultati mediante visualizzazione del grafico e del valore di Ct di ciascun campione.

Valutazione dei risultati

Mantenendo il limite soglia (Threshold) stabilito automaticamente dal software del termociclatore, considerare positivi, per l'infezione a PSTVd, i campioni con Ct ≤ 30.

I campioni con un valore di Ct > 30 devono essere considerati negativi od analizzati di nuovo se i controlli negativi e bianchi hanno un valore di Ct analogo.

Punti critici del protocollo

- Il punto debole della rt RT-PCR è che si tratta di una reazione altamente sensibile, che consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi ma che, se non utilizzata correttamente, può dare campioni falsi positivi o provocare delle contaminazioni nel laboratorio (reagenti contaminati, estratti contaminati, blocco del termociclatore contaminato, Micropipette contaminate, etc.). Si raccomanda, pertanto, di lavorare con ESTREMA attenzione e di avvalersi SEMPRE di controlli negativi sicuri per verificare la validità di ogni evento di amplificazione.
- Al fine di evitare contaminazioni si raccomanda di:
 - organizzare il laboratorio, se possibile, con ambienti separati (laboratorio per estrazione, laboratorio per la preparazione della mix e laboratorio per l'amplificazione). Se ciò non è possibile utilizzare assolutamente bancali o aree separate per le due fasi e set di Micropipette dedicate a ciascuna fase. tenere i componenti e i reagenti aperti il minor tempo possibile;
 - è consigliabile aliquotare tutti i reagenti ed al primo sospetto di contaminazione, eliminarli tutti e ripartire da aliquote nuove (in caso di contaminazione è molto difficile risalire al reagente o campione contaminato);
 - usare solo acqua sterile RNAsi-free (se preparata in laboratorio è meglio utilizzare acqua DEPC);
 - cambiare i guanti ogni qual volta si sospetta di averli contaminati durante le operazioni di preparazione della miscela di reazione e di caricamento dei target (estratti TotRNA);
 - usare SOLO puntali sterili con filtro;
 - al momento di caricamento del blocco del termociclatore accertarsi che le provette siano ben chiuse o che la pellicola per la copertura delle piastre sia ben sigillata; se al termine di una PCR si ritrovano provette aperte all'interno del termociclatore (dovute ad una chiusura non ermetica del coperchio o a provette fallate) trattare il blocco con soluzioni di DNasi reperibili in commercio;
 - pulire periodicamente i bancali e l'equipaggiamento con una soluzione di sodio ipoclorito al 10%;
- rispettare scrupolosamente le condizioni di conservazione di tutti i reagenti.

Si ribadisce che il protocollo rt-RT-PCR consente di identificare specificamente le infezioni solamente di PSTVd. Gli altri pospiviroidi, incluso TASVd, sfuggono a questa analisi.

4. DATI DI VALIDAZIONE

4.1 Materiale vegetale utilizzato per la validazione

Le prove di validazione sono state effettuate in estate a partire da campioni composti da 25 foglie di cui solo una infetta e 24 sane.

Il test è stato eseguito ‘blind’: i campioni sono stati saggiati da operatori che non ne conoscevano la storia.

Per la validazione dei metodi diagnostici sono stati utilizzati 18 campioni di riferimento così distribuiti:

6 campioni ‘target’ di *S. jasminoides*, *Cestrum* spp e pomodoro infetti da PSTVd e provenienti da diversi areali geografici italiani:

6 campioni ‘non target’ di *S. jasminoides*, *L. rantonnetti* e pomodoro infetti da *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) e provenienti da diversi areali geografici italiani:

3 campioni ‘non target’ rappresentati da materiale di *S. jasminoides*, e pomodoro infetto da altri viroidi appartenenti al genere *Pospiviroid* (*Citrus exocortis viroid* – CEVd, *Chrysanthemum stunt viroid* – CSVd; *Tomato planta macho viroid* – TMPVd)

3 campioni ‘non target’ rappresentati da specie ospiti del PSTVd (*S. jasminoides*, e pomodoro), esenti da infezione viroidale:

1 campione di *S. jasminoides* esente da infezioni viroidali;

1 campione di *Cestrum* spp esente da infezioni viroidali;

1 campione di **pomodoro** esente da infezioni viroidali

4.2 Metodo diagnostico one step RT-PCR seguito da RFLP

Valori di validazione

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:

Kit commerciali per estrazione RNA totale da tessuto vegetale: Spectrum Plant Total RNA Kit cat. 000010 Sigma-Aldrich.

Enzimi:

Enzima Reverse Trascrittasi: AMV Reverse Transcriptase M5101 Promega Corporation

Enzima Taq polimerasi: GoTaq DNA polimerasi M3001 Promega Corporation

Enzima inibitore delle RNasi: RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor cod. 10777-019 Invitrogen Ltd

Enzima di restrizione: FastDigest AluI FD0014 (M-Medical s.r.l.)

dNTPs: dNTP set, Promega, C1141

Acqua sterile RNasi free: SIGMA W4502

Primers specifici per PSTVd: sintetizzati da Invitrogen Ltd

Termociclatore: MJ PTC200, Applied bioystem 9700

Transilluminatore: Biorad Geldoc 2000

Marker per DNA: Bench Top 100bp DNA ladder 100 lanes G 7541 Promega Corporation

4.3 Metodo diagnostico Real time RT-PCR

Valori di validazione

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:

Master mix: TaqMan One step RT-PCR Master Mix cod. 4309169 Applied Biosystem

Piastre: Reaction Plate 96-W no barcode cod N8010560 Applied Biosystem

Pellicola per piastre Real Time RT-PCR: Optical Adesive Covers cod. 4311971 Applied Biosystem

Bustine plastica per campioni vegetali: Bioreba codice 430100

Termociclatore: ABIPRISM 7500 Fast Real Time PCR System, Applied Biosystem;

TaqMan Probe e primers: sintetizzati da Applied Biosystem o Sigma Aldrich

Acqua sterile RNasi free: SIGMA W4502

4.4 Parametri di validazione ottenuti

| Valori | RT-PCR + RFLP | Real Time RT-PCR |
|--------------------------------------|------------------|------------------|
| Sensibilità | 100% | 100% |
| Specificità | 100% | 100% |
| Accuratezza | 100% | 100% |
| Sensibilità analitica ⁽¹⁾ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁸ |
| Ripetibilità | 100% | 100% |
| Riproducibilità | 92 % | 97% |

⁽¹⁾: La sensibilità analitica è stata valutata fino ad una diluizione dell'estratto di 10⁻¹²

I parametri di validazione ottenuti sono da riferirsi alla sola identificazione del PSTVd sia per la RT-PCR che ne caso della rtRT-PCR.

4.5 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche

Alla luce dei risultati ottenuti dalla validazione delle diverse metodologie di diagnosi ed al fine di definire gli standard tecnici di prelievo dei campioni e realizzazione delle analisi di cui al comma 3 dell'art. 3 del D.M. 28 Gennaio 2008 (Lotta obbligatoria per il controllo del *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) agente della malattia del "Tubero fusiforme della patata") si propone di procedere come segue:

| Saggio diagnostico | Caratteristiche |
|---|--|
| Saggio molecolare one step RT-PCR + RFLP | <p>Tempi di esecuzione: 8 ore per l'analisi di circa 20 campioni (inclusa estrazione).</p> <p>Aspetti vantaggiosi: possibilità di rilevare anche la presenza del <i>Tomato apical stunt viroid</i> (presente su alert list EPPO/EOPP).</p> <p>Aspetti svantaggiosi: necessità di effettuare una seconda analisi (RFLP) specie-specifica in caso di positività dei campioni.</p> |
| Saggio molecolare real time RT-PCR | <p>Tempi di esecuzione: 4 ore per l'analisi di circa 20 campioni (inclusa estrazione).</p> <p>Aspetti vantaggiosi: maggiore sensibilità analitica; maggiore velocità di esecuzione; visualizzazione del risultato in tempo reale.</p> <p>Aspetti svantaggiosi: tecnica mediamente laboriosa, legata all'utilizzo di specifici reagenti etermociclatori sofisticati e che richiede personale altamente specializzato; maggiore difficoltà nell'interpretare in modo specifico i risultati.</p> |

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- BALASHEV NN, 1941. Virus diseases and potato degeneration in Uzbekistan. Doklady Vsesoyuznoi Akademii sel'sko khozyaistvennykh Nauk im, 22-27
- BENSON AP., RP. SINGH 1964. Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato. (Abstr.) *American Potato Journal*, **41**, 294.
- BOONHAM, N, LG. PEREZ, MS. MENDEZ, PERALTA EL, BLOCKLEY A, WALSH K, BARKER I, MUMFORD RA, 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods*, **116**, 139-146.
- CAMMACK RH, DE.RICHARDSON, 1963. Suspected potato spindle tuber virus in England. *Plant Pathology*, **12**, 23-26.
- DE BOKX JA, PGM. PIRON, 1981. Trasmissione di potato spindle tuber viroid by aphids. Netherlands. *Journal of Plant Pathology*, **87**, 31-34.
- DI SERIO F, 2007. Identification and characterization of potato spindle tuber viroid infecting *Solanum jasminoides* and *S. rantonnetii* in Italy. *Journal of Plant Pathology*, **89**, 297-300.
- DIENER TO. Potato spindle tuber viroid VIII. Correlation of infectivity with a UV-absorbing component and thermal denaturation properties of the RNA. *Virology* 1972; **50**, 606-9.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH); Scientific Opinion on on the assessment of the risk of solanaceous pospiviroids for the EU territory and the identification and evaluation of risk management options. *EFSA Journal* 2011;**9**(8):2330. [133 pp.]. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm.
- EPPO, 2003. Potato spindle tuber pospiviroid found in tomatoes in United Kingdom. OEPP/EPPO Reporting Service 7 (2003/100): 4.
- EPPO, 2004. Occurrence of potato spindle tuber pospiviroid (PSTVd) in tomato plants in Germany. OEPP/EPPO Reporting service 1 (2004/006): 5.
- FAGGIOLI F., L. FERRETTI, G. ALBANESE, R. SCIARRONI, G. PASQUINI, V. LUMIA, M. BARBA, 2005. Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. *Journal of Plant Pathology* **87**(1), 49-55.
- HUNTER DE, DH. DARLING, WL. BEALE, 1969. Seed transmission of potato spindle tuber virus. *American Potato Journal*, **46**, 247-250.
- KENNEDY JS, MF. DAY, VF. EASTOP, 1962. A conspectus of aphides as vectors of plant viruses. Commonwealth Institute of Entomology, London, 114 pp.
- KRYCZYNSKI S, E. PADUCH-CICHAL, LJ. SKRZECZKOWSKI, 1988. Transmission of three viroids through seed and pollen of tomato plants. *Journal of Phytopathology*, **121**, 51-57.
- LEBAS BSM, GRC. CLOVER, FM. OCHOA-CORONA, DR. ELLIOTT, Z. TANG, BJR ALEXANDER, 2005. Distribution of *Potato spindle tuber viroid* in New Zealand glasshouse crops of capsicum and tomato. *Australasian Plant Pathology*, **34**, 129-133.

- LEMMETTY A, J. LAAMANEN, M. SOUKAINED, J. TEGEL, 2011. Emerging virus and viroid pathogen species identified for the first time in horticultural plants in Finland in 1997-2010. *Agricultural and Food Science*, **20**, 29-41.
- LUIGI M, D. LUISON, L. TOMASSOLI, F. FAGGIOLI, 2011. Natural spread and molecular analysis of pospiviroids infecting ornamentals in Italy. *Journal of Plant Pathology*, **93**(2), 1-5.
- MARTIN WH, 1922. "Spindle tuber", a new potato trouble. Hints to potato growers, New Jersey State Potato Association, 3, 8.
- MERTELIK J, K. KLOUDOVA, G. CERVENA, J. NECEKALOVA, H. MIKULKOVA, Z. LEVKANICOVA, P. DEDIC, J. PTACEK, 2010. First report of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) in *Brugmansia* spp., *Solanum jasminoides*, *Solanum muricatum* and *Petunia* spp. in the Czech Republic. *Plant Pathology*, **59**, 392.
- NAVARRO B., MR. SILLETTI, VN. TRISCIUZZI, F. DI SERIO, (2009). Identification and characterization of Potato spindle tuber viroid infecting tomato in Italy. *Journal of Plant Pathology*, **91**, 723-726.
- PUCHTA H, T. HEROLD, K. VERHOEVEN, A. ROENHORST, K. RAMM, W.SCHMIDT-PUCHTA HL. SÄNGER, 1990. A new strain of potato spindle tuber viroid (PSTVd-N) exhibits major sequence differences as compared to all other PSTVd strains sequenced so far. *Plant Molecular Biology*, **15**, 509-511
- QUERCI M, RA. OWENS, I. BARTOLINI, V. LAZARTE, LF. SALAZAR, 1997. Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology*, **78**, 1207-1211.
- QUERCI M, RA. OWENS, C. VARGAS, LF. SALAZAR, 1995. Detection of potato spindle tuber viroid in avocado growing in Peru. *Plant Disease*, **79**, 196-202.
- SCHUMAN GL, WM. TINGEY, HD. THURSTON, 1980. Evaluation of six insect pests for transmission of potato spindle tuber viroid. *American Potato Journal*, **57**, 205-211.
- SHAMLOUL AM, A. HADIDI, SF. ZHU, RP. SINGH, B.SAGREDO, 1997. Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology/Revue Canadienne de Phytopathologie*, **19**, 89-96.
- SINGH RP., J.KURZ, 1997. RT-PCR analysis of PSTVd aphid transmission in association with PLRV. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **19**, 418-424.
- SINGH RP, 1970a. Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *American Potato Journal*, **47**, 225-227.
- SINGH RP, A. BOUCHER, TH. SOMERVILLE, 1992a. Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease*, **76**, 951-953.
- SMITH KM, 1972. Potato spindle tuber virus. A Textbook of Plant Virus Diseases, pp. 404-407. London:Longman Group Ltd.
- VERHOEVEN JTHJ, 2010. Identification and epidemiology of pospiviroids. Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. ISBN 978-90-8585-623-8, 136 pp.

- VERHOEVEN JThJ, CCC. JANSEN, TM. WILLEMEN, LFF. KOX, RA. OWENS, IW. ROENHORST, 2004. Natural infections of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *European Journal of Plant Pathology*, **110**, 823-831.
- VERHOEVEN JThJ, M. BOTERMANS, JW. ROENHORST, J. WESTERHOF, ETM. MEEKES, 2009. First report of Potato spindle tuber viroid in Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) from Turkey and Germany. *Plant Disease*, **93**, 316.
- VERHOEVEN JThJ, L. HUNER, M. VIRSCEK MARN, I. MAVRIC PLESKO, JW. ROENHORST, 2010. Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveolens*, *Solanum jasminoides* and potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, **128**, 417-421.
- VERHOEVEN JThJ, CCC. JANSEN, JW. ROENHORST, 2008a. First report of pospiviroids infecting ornamentals in the Netherlands: Citrus exocortis viroid in *Verbena* sp., Potato spindle tuber viroid in *Brugmansia suaveolens* and *Solanum jasminoides*, and Tomato apical stunt viroid in *Cestrum* sp. *Plant Pathology*, **57**, 399.
- VERHOEVEN JThJ, CCC. JANSEN, JW. ROENHORST, 2008b. *Streptosolen jamesonii* 'Yellow', a new host plant of Potato spindle tuber viroid. *Plant Pathology*, **57**, 399.
- WARD LI, J. TANG, S. VEERAKONE, BD. QUINN, SJ. HARPER, C. DELMIGLIO, GRG. CLOVER, 2010. First Report of Potato spindle tuber viroid in Cape Gooseberry (*Physalis peruviana*) in New Zealand. *Plant Disease*, **94**, 479.

ALLEGATO I - Strumentazione, reagenti e materiali

One-step RT-PCR

Strumentazione

1. Alimentatore per apparati elettroforetici
2. Apparati elettroforetici orizzontali
3. Bagno termostato o Termoblocco
4. Bilancia analitica
5. Cappa aspirante
6. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (non indispensabile)
7. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
8. Congelatore
9. Distillatore di acqua
10. Frigorifero
11. Micropipette dedicate all'amplificazione e calibrate (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
12. Micropipette dedicate all'estrazione dell'acido nucleico e calibrate (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
13. pH metro
14. Termociclatore
15. Transilluminatore
16. Vortex
17. Omogeneizzatore o mortaio e pestello

Reagenti

1. Acqua RNase free
2. Agarosio, composti chimici per la preparazione del tampone TBE, intercalante acidi nucleici
3. Controllo negativo, sicuramente esente da infezione da PSTVd ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
4. Controllo positivo, sicuramente infetto da PSTVd ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
5. Enzima AMV RT
6. Enzima RNase inhibitor
7. Etanolo 96%
8. dNTPs
9. Kit commerciale per estrazione RNA
10. Loading buffer per elettroforesi
11. Marker di DNA (100 bp)
12. Taq DNA polimerasi e relativo tampone comprensivo di $MgCl_2$
13. Azoto liquido (se non si dispone di omogeneizzatore)
14. Fast Digest *Alu I* e relativo tampone "FastDigest Green Buffer" (Thermo scientific)

Tamponi

| TBE 10X | | |
|---|-----|----|
| Tris | 108 | g |
| acido borico | 55 | g |
| 0,5 M EDTA (pH 8) | 40 | ml |
| Portare ad 1litro con H ₂ O distillata | | |
| Autoclavare | | |

| Loading buffer 10X in TBE | |
|----------------------------------|------|
| Blu di bromofenolo | 0,3% |
| Xilencianolo | 0,3% |
| Glicerolo | 60% |

| Soluzione di etidio bromuro 0,5 µg/ml | | |
|--|-----|----|
| Etidio bromuro | 50 | µg |
| acqua | 100 | ml |
| Diluire questa soluzione 1:1000 in acqua | | |

| Acqua bidistillata DEPC | | |
|---|------|----|
| DEPC | 0,1% | µg |
| Lasciare 12 ore a temperatura ambiente in bottiglia chiusa, possibilmente sotto cappa a flusso laminare | | |
| Autoclavare 121°C per 20' | | |

Materiali

1. Bustine di plastica per omogeneizzatore tipo Homex (se non si dispone di azoto liquido)
2. Puntali sterili con filtro per Micropipette
3. Guanti monouso
4. Mortai e pestelli (se non si dispone di omogeneizzatore)
5. Carta da laboratorio
6. Porta provette
7. Provette da 0,2 o 0,5 ml per PCR
8. Provette da 1,5 e 2 ml

Real time RT-PCR

Strumentazione

1. Bagnetto termostato o Termoblocco
2. Bilancia analitica
3. Cappa aspirante
4. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
5. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (non necessaria)
6. Congelatore
7. Frigorifero
8. Micropipette dedicate all'amplificazione e calibrate (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
9. Micropipette dedicate all'estrazione dell'acido nucleico e calibrate (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
10. Termociclatore per real time
11. Omogeneizzatore o mortai e pestelli
12. Vortex

Reagenti

1. Acqua sterile RNasi free
2. Azoto liquido (se non si dispone di omogeneizzatore)
3. Controllo negativo, sicuramente esente da infezione da PSTVd ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata
4. Controllo positivo, sicuramente infetto da PSTVd ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
5. Etanolo
6. Kit commerciale per estrazione RNA
7. Mix per real time one step RT-PCR
8. Primers e sonda specifici per PSTVd

Materiali

1. Bustine di plastica per omogeneizzatore tipo Homex (se non si dispone di azoto liquido)
2. Carta da laboratorio
3. Guanti
4. Mortai e pestelli (se non si dispone di omogeneizzatore)
5. Porta provette e porta piastre
6. Pellicole adesive per chiusura piastre da 96 pozzetti
7. Piastre da 96 pozzetti per real time o provette ottiche specifiche
8. Provette da 1,5 e 2 ml
9. Puntali sterili per Micropipette con filtro