

**Protocollo per test
diagnostici**

***Tomato infectious
chlorosis virus
Tomato chlorosis
virus***

Descrizione della malattia

Agenti causali	<i>Tomato chlorosis virus</i> <i>Tomato infectious chlorosis virus</i>
Tassonomia	Virus Famiglia: <i>Closteroviridae</i> Genere: <i>Crinivirus</i>
Avversità	Giallume internervale su pomodoro
Sinonimi e acronimi	ToCV TICV

Ospite

La malattia, indicata genericamente “giallume del pomodoro”, è causata da ToCV e TICV in infezione singola o mista. Identificati per la prima volta in California (TICV, Duffus et al., 1996) e in Florida (ToCV, Wisler et al., 1998), essi si sono diffusi rapidamente in molti paesi del Bacino Mediterraneo e provocano un aggravio dello stato fitosanitario della coltura protetta di pomodoro già gravemente colpita dalla malattia dell'accartocciamento fogliare giallo (TYLCD). In Italia, TICV e ToCV sono stati segnalati per la prima volta all'inizio degli anni 2000 e ormai sono endemici in tutte le aree serricole destinate alla produzione di pomodoro da mensa. TICV è stato segnalato negli anni 2001-2002 in Liguria, Lazio, Campania, Sardegna, nel 2006 in Calabria e più recentemente in Sicilia. Nelle stesse regioni ToCV è presente in Italia dal 2001. Questi crinivirus sono stati riscontrati in infezioni naturali anche su altre specie botaniche di interesse agrario (TICV: carciofo, lattuga, scarola, tomatillo; ToCV: tomatillo), specie ornamentali (TICV: petunia, ranuncolo; ToCV: zinnia) e specie spontanee (TICV: *Chenopodium album* e *C. murale*; ToCV: *Datura stramonium*, *Solanum nigrum*, *Plantago major* e *Cucurbita moschata*).

Sintomatologia

I sintomi sono rilevabili solo su foglie



I due virus causano la stessa sintomatologia sulle piante che si manifesta con clorosi ed ingiallimento internervale delle foglie basali. Queste risultano anche ispessite, coriacee e fragili al tatto e progressivamente compaiono arrossamenti, imbrunimenti e necrosi internervali. I virus si replicano nelle cellule floematiche causando alterazioni al metabolismo nutrizionale, motivo questo di frequente associazione del sintomo a carenze nutrizionali, in particolare di magnesio e manganese.



Dalla letteratura e da quando osservato in campo nelle aree italiane, i due virus non provocano danni diretti sui frutti ma in caso di infezione precoce si può registrare un forte calo produttivo nel numero di frutti per palco e nelle dimensioni che risultano ridotte

Struttura e morfologia

TICV e ToCV hanno un genoma costituito da due molecole di RNA a singola elica di polarità positiva, denominate RNA1 e RNA2 ed incapsidate separatamente in particelle virali di tipo filamentoso di una lunghezza variabile calcolata tra 800-850 nm per ToCV e 850-900 nm per TICV. Le due molecole di RNA codificano sia proteine non strutturali, le cui funzioni non sono per tutte note, sia proteine strutturali (RNA2) (Liu et al., 2000; Wintermantel et al., 2005 e 2009).

Epidemiologia e trasmissione

TICV e ToCV sono trasmessi dagli aleurodidi di serra, famiglia Aleyrodidae, in modo semi-persistente. L'insetto, dopo aver acquisito le particelle virali alimentandosi per tempi superiori ad un minuto su piante infette, è in grado di ritenere il virus e trasmetterlo con efficienza a piante sane per alcuni giorni. Per TICV, il tempo di permanenza nel suo unico vettore *Trialeurodes vaporariorum* è di circa 4 giorni; nel caso di ToCV è stata evidenziata un tempo di ritenzione pari a 2 giorni in *Bemisia tabaci* (biotipi B e Q) e di un solo 1 giorno in *T. vaporariorum*.

Il giallume internervale ad eziologia virale può manifestarsi in serra per tutto l'arco dell'anno produttivo in funzione dell'andamento climatico che favorisce la proliferazione degli aleurodidi in ambiente protetto e la presenza di piante serbatoi dei due virus.

La tecnica colturale di defoliazione dei palchi bassi delle piante di pomodoro sembra ridurre gli effetti della malattia sulla singola pianta.

Diagnosi

La diagnosi dei due virus può essere effettuata mediante le tecniche molecolari che rilevano l'acido nucleico virale, dopo opportuna estrazione dalla matrice vegetale, e riconoscimento di RNA specifico con ibridazione molecolare, e più frequentemente, mediante reazioni di amplificazione in RT-PCR e real Time RT-PCR.

Normativa fitosanitaria

TICV e ToCV sono inseriti nella lista A2 dell'EPPO per gli organismi regolati da norme per la quarantena.



**Metodologie
diagnostiche**

Premessa

Il protocollo diagnostico descritto è il prodotto dell'attività effettuata nell'ambito del Progetto Finalizzato 'ARON-ARNADIA', finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (DM 19738/7303/08 DEL 29/12/2008).

Il protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi e l'identificazione dei due virus responsabili del "giallume internervale del pomodoro" (TICV e ToCV) su pomodoro ai laboratori preposti alla diagnosi degli organismi coperti da normative fitosanitarie. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati è alla base di una efficiente applicazione delle misure fitosanitarie e consente il confronto dei risultati ottenuti da diversi laboratori in diverse circostanze.

Le metodologie di laboratorio riportate nel protocollo sono state selezionate sulla base dei parametri di loro sensibilità, specificità, accuratezza, sensibilità analitica, specificità analitica, ripetibilità e riproducibilità (EPPO, Diagnostics PM7/98).

Per la definizione di tali parametri le diverse metodologie di diagnosi sono state effettuate con reagenti e strumentazione dettagliatamente riportati. Ciò non comporta l'esclusione dell'uso di reagenti e strumentazioni alternative e la modifica di alcune procedure per meglio avvicinarsi agli standard di ogni singolo laboratorio, purché ciò venga adeguatamente validato.

La scelta delle metodologie diagnostiche da validare e la definizione dei parametri di validazione è scaturita dal lavoro congiunto di un **Gruppo di lavoro di esperti** costituito da:

- 1- CRA-PAV Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma (Coordinatore del Gruppo), Dr. Laura Tomassoli e la collaborazione della Dr.ssa Ariana Manglli e Dr. Antonio Tiberini
- 2- CNR-IVV Istituto di Virologia Vegetale del CNR Sezione di Torino, Dr. Massimo Turina e la collaborazione della Dott.ssa Marina Ciuffo
- 3- DIBCA Facoltà di Scienze Biotechologiche Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Prof. Donato Gallitelli con la collaborazione della Dott.ssa Tiziana Mascia
- 4- DEMETRA Università degli Studi di Palermo, Dr. Salvatore Walter Davino

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

- 1- SFR Val d'Aosta, referente Dr. Fabio Guglielmo
- 2- SFR Piemonte, referenti Dr. Paola Gotta e Dr. Giovanna Mason
- 3- SFR Sardegna, Laboratorio Fitopatologico AGRIS, referente Dr. Annamaria Repetto
- 4- SFR Sicilia, Laboratorio Università di Catania, referenti Dr. Giuseppe Campo e Prof. Mario Davino

Inoltre, ha partecipato il laboratorio International Plant Analysis and Diagnostics (I.P.A.D.), referente Dr. Giuseppe Durante

I metodi diagnostici inseriti nel presente protocollo per la identificazione di TICV e ToCV sono:

Metodo diagnostico	Componente virale riconosciuta
Molecolare: one step RT-PCR	acido nucleico virale
Molecolare: real time RT-PCR (RT-qPCR)	acido nucleico virale

Prove di validazione

Per la validazione dei protocolli diagnostici sono stati calcolati i seguenti parametri (Diagnostics PM7/76 e PM7/98 e ISO 16140; EPPO):

- **Sensibilità diagnostica:** capacità del metodo utilizzato di rilevare la presenza del patogeno nei campioni sicuramente infetti dal patogeno in esame;
- **Specificità diagnostica:** capacità del metodo utilizzato di NON rilevare la presenza del patogeno nei campioni non infetti dal patogeno in esame;
- **Accuratezza relativa:** il valore risultante dal calcolo della sensibilità diagnostica e della specificità diagnostica;
- **Sensibilità analitica:** la più piccola quantità di entità infettiva che può essere identificata dal metodo diagnostico (nel caso di patogeni virali vegetali, che non possono essere quantificati *in vitro*, corrisponde alla diluizione limite dell'estratto iniziale nella quale il metodo utilizzato riesce ad individuare il patogeno);
- **Specificità analitica:** capacità del metodo utilizzato di NON rilevare la presenza di altri patogeni affini presenti nel campione (*cross-reaction*);
- **Ripetibilità (Accordanza):** grado di conformità dei risultati ottenuti in replicazioni, effettuate a intervalli brevi di tempo, del metodo utilizzando lo stesso campione di riferimento e nelle stesse condizioni di lavoro (strumentazioni, operatore, laboratorio);
- **Riproducibilità (Concordanza):** grado di conformità dei risultati ottenuti utilizzando lo stesso metodo con gli stessi campioni di riferimento in diversi laboratori.

Tutte le prove di validazione sono state effettuate utilizzando una serie di campioni di riferimento:

Campioni di riferimento 'target': campioni infetti da isolati che coprono la diversità genetica, la distribuzione geografica e le eventuali diverse specie vegetali ospiti del patogeno.

Campioni di riferimento 'non target': campioni infetti da patogeni simili che colpiscono la stessa specie ospite, da patogeni geneticamente correlati (nel caso dei virus vegetali

appartenenti allo stesso genere) e campioni non infetti appartenenti alla stessa specie ospite.

Le prove di validazione sono state effettuate sulla sola specie pomodoro (*Solanum lycopersicum*) utilizzando matrice fogliare.

a) Campioni per la validazione

Complessivamente per i test di validazione sono stati utilizzati 30 diversi campioni di riferimento così distribuiti:

- **12 campioni ‘target’** ossia **infetti da TICV** comprendenti isolati provenienti da diversi areali geografici
- **12 campioni ‘target’** ossia **infetti da ToCV** comprendenti isolati provenienti da diversi areali geografici
- **2 campioni ‘non target’** costituiti da materiale **infetto da altri patogeni virali** appartenenti al genere *Crinivirus*:
 - 1 campione infetto da TICV o ToCV rispettivamente per il test ToCV o TICV
 - 1 campione infetto da *Lettuce infectious yellows virus* (**LIYV**)
 - 1 campione infetto da *Beet pseudo yellows virus* (**BPYV**)
- **1 campione ‘non target’** costituiti da materiale **infetto da altro patogeno virale** del pomodoro in coltura protetta
 - 1 campione infetto da *Tomato spotted wilt virus* (**TSWV**)
- **3 campioni ‘non target’** costituiti da matrici fogliare da piante di pomodoro **esenti da infezione virale**.

La riproducibilità è stata validata utilizzando un numero inferiore di campioni “target” (n. 8) e “non target” (n. 4) escludendo quelli infetti da altri agenti virali.

I test sono stati eseguiti con campioni ‘blind’: i campioni sono stati saggiati da un operatore che non ne conosceva la storia.

b) Criteri per il calcolo dei dati di validazione

positivi ottenuti / positivi attesi (veri positivi)	A	C	positivi ottenuti / negativi attesi (falsi positivi)
negativi ottenuti / positivi attesi (falsi negativi)	B	D	negativi ottenuti / negativi attesi (veri negativi)

$$\begin{aligned} \% \text{ Sensibilità diagnostica:} & \quad A/(A+B) \\ \% \text{ Specificità diagnostica:} & \quad D/(C+D) \\ \% \text{ Accuratezza relativa:} & \quad A + D/(A+B+C+D) \end{aligned}$$

Per la Ripetibilità sono stati scelti 2 target per ciascun virus ed un sano e per ciascuno di essi sono state individuate due diluizioni dal test sulla sensibilità analitica. I campioni sono stati analizzati dalla stessa persona, con gli stessi reagenti, per cinque volte, nella stessa giornata. I valori sono stati calcolati verificando quante volte lo stesso risultato veniva ripetuto a prescindere dal fatto che fosse infetto o meno (es. campione 1 +, +, +, campione 2 +, +, -, campione 3 +, +, - ecc)

$$\% \text{ Ripetibilità:} \quad C/N$$

C = risultati concordanti
N = campioni totali (25 nel caso specifico, 5x5)

Per la Riproducibilità si applica lo stesso metodo della ripetibilità, solo che le analisi vengono eseguite in differenti laboratori, usando gli stessi reagenti, lo stesso protocollo e gli stessi campioni.

$$\% \text{ Riproducibilità:} \quad \Sigma C / \Sigma N$$

ΣC = sommatoria dei risultati concordanti per ogni campione
 ΣN = sommatoria del numero di laboratori che ha analizzato ogni campione (mediamente 72 nel caso specifico, 6 lab x 12 campioni)

c) Valori di validazione ottenuti

1. Metodo diagnostico molecolare RT-PCR

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:

- **kit commerciale per estrazione RNA totale da tessuto vegetale:** RNeasy Plant Minikit Qiagen - cod. 74904 dopo prove comparative con altri due kit commerciali;

- **miscela di reazione:** Superscript III one-Step RT-PCR System con Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen cat. No 12574-018 per 25 reaction) che contiene:

- 50 μ l di SuperScript III RT/Platinum Taq
- 1 ml di Soluzione tampone 2X (0.4 mM per ciascun dNTP, 3.2 mM MgSO₄)
- 500 μ l di 5 mM MgSO₄

- **primers specifici per TICV e ToCV:** sintetizzati da Invitrogen Ltd

- **termociclatore:** Biorad: MJ PTC200, MJ Chromo4, CFX96, CFX 1000, iCycler, S1000 thermal Cycler, Mini Opiticon; Eppendorf- Mastercycler personal; Techne PROGENE; BIOMETRA - THERMOCYCLER T1

Parametri	Valori ToCV	Valori TICV
Sensibilità diagnostica	100%	100%
Specificità diagnostica	100%	100%
Accuratezza relativa	100%	100%
Specificità analitica	100%	100%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻²	10 ⁻⁵
Ripetibilità ⁽²⁾	100%	100%
Riproducibilità ⁽³⁾	99%	99%

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

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per cinque volte l'esperimento utilizzando come campione due diluizioni risultate a media e bassa intensità di rilevamento su gel di agarosio di sue estratti/virus

⁽³⁾ La riproducibilità è stata valutata mediante un ring test effettuato da quattro laboratori dei SFR, un laboratorio privato e CRA-PAV.

N.B: i valori di sensibilità, specificità e accuratezza sono stati calcolati per ogni laboratorio del Gruppo di lavoro degli esperti e dei partecipanti al ring test. I valori riportati in tabella sono quelli più alti in quanto si ritiene siano quelli che meglio rappresentano le potenzialità del metodo e comunque nel caso specifico sono stati ottenuti in tutti i laboratori del GDL e in quattro dei cinque partecipanti il ringtest.

2. Metodo diagnostico molecolare Real time RT-PCR

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 rt PCR: Optical Adesive Covers cod. 4311971 Applied Biosystem

Termociclatore: Applied Biosystem: ABIPRISM 7000 e 7500 Fast, StepOne Plus; Biorad: MJ Chromo4, MiniOpticon CFX96;

TaqMan Probe e primers: sintetizzati da Sigma, Applied Biosystem e Biofab Research

Parametri	Valori ToCV	Valori TICV
Sensibilità diagnostica	100%	100%
Specificità diagnostica	100%	100%
Accuratezza relativa	100%	100%
Specificità analitica	100%	100%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶
Ripetibilità ⁽²⁾	100%	100%
Riproducibilità ⁽³⁾	100%	100%

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

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione due diluizioni risultate a media e bassa intensità di rilevamento su gel di agarosio di sue estratti/virus

⁽³⁾ La riproducibilità è stata valutata mediante un ring test effettuato da due laboratori dei SFR e CRA-PAV.

N.B: i valori di sensibilità, specificità e accuratezza sono stati calcolati per ogni laboratorio del Gruppo di lavoro degli esperti e dei partecipanti al ring test. I valori riportati in tabella sono quelli più alti in quanto si ritiene siano quelli che meglio rappresentano le potenzialità del metodo e comunque nel caso specifico sono stati ottenuti nei cinque laboratori che hanno applicato il metodo (3 del GDL e 2 del ringtest).

Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche

Alla luce dei risultati ottenuti dalla validazione delle diverse metodologie di diagnosi ed al fine di definire standard tecnici per la realizzazione delle analisi si riportano alcuni suggerimenti utili:

Saggio diagnostico	Caratteristiche
<p>Saggio molecolare one step RT-PCR</p>	<p>Tempi di esecuzione: 8 ore per l'analisi di circa 20 campioni (esclusa estrazione)</p> <p>Vantaggi: buona sensibilità analitica e accuratezza; consente sequenziamento del virus</p> <p>Svantaggi: tecnica laboriosa e legata all'utilizzo di specifici reagenti;</p>
<p>Saggio molecolare real time RT-PCR</p>	<p>Tempi di esecuzione: 4 ore per l'analisi di circa 20 campioni (esclusa estrazione).</p> <p>Vantaggi: maggiore sensibilità analitica</p> <p>Svantaggi: tecnica laboriosa, legata all'utilizzo di specifici reagenti e che richiede personale altamente specializzato. In diverse prove, i valori di Ct 38-40 anche per non target.</p> <p>Consigliato per analisi su piccoli numeri e campioni dubbi in RT-PCR</p>

SAGGI MOLECOLARI

- One step RT-PCR

One step RT-PCR

Strumentazione, materiali e reagenti necessari

a) Strumentazione

1. Agitatore magnetico
2. Alimentatore per apparati elettroforetici
3. Apparati elettroforetici orizzontali
4. Bagnetto termostato o termoblocco
5. Bilancia analitica
6. Cappa aspirante
7. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (non necessaria)
8. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
9. Congelatore
10. Distillatore
11. Frigorifero
12. Macchina produttrice di ghiaccio
13. Micropipette dedicate all'amplificazione e calibrate (P2, P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
14. Micropipette dedicate all'estrazione dell'acido nucleico e calibrate (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
15. Misuratore di pH
16. Termociclatore
17. Transilluminatore
18. Vortex

b) Reagenti

1. 2- mercaptoetanolo o sodio metabisolfito
2. Acqua RNase free
3. Agarosio, composti chimici per la preparazione del tampone TBE, TAE, bromuro d'etidio
4. Azoto liquido (non necessario)
5. Controllo negativo, sicuramente esente da infezione da TICV/ToCV ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
6. Controllo positivo, sicuramente infetto da TICV/ToCV
7. Etanolo
8. Kit commerciale per estrazione RNA
9. Loading buffer per elettroforesi
10. Marker di DNA (100bp)
11. Primers specifici per TICV e ToCV
12. Tampone fosfato 0,1 M pH 7,2

c) Materiali

1. Bustine di plastica per omogeneizzatore (per macerazione con tampone fosfato)
2. Puntali sterili per micropipette, assolutamente con filtro per la PCR
3. Guanti
4. Carta da laboratorio

5. Mortai e pestelli sterili (macerazione con azoto liquido)
6. Portaprovette
7. Provette da 0,2 o 0,5 ml per PCR
8. Provette da 1,5 e 2 ml

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 e un controllo acqua. Si consiglia di non superare il numero di 20 campioni per evento di amplificazione (compresi i controlli).

Come controllo positivo e negativo devono essere utilizzati campioni di materiale vegetale, appartenenti alla stessa specie vegetale dei campioni saggiati, provenienti da una pianta sicuramente infetta da TICV o ToCV (a seconda del test che si vuole effettuare) e da una pianta sicuramente esente da entrambe i crinivirus.

Il controllo acqua è costituito da acqua caricata al posto dell'estratto di RNA totale.

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

Estrazione dei campioni con kit commerciale

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen cat no. 7490450 per 50 campioni)

Seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della ditta produttrice

Macerare accuratamente con mortaio e pestello sterili il tessuto fogliare (*). E' consigliabile macerare una quantità di tessuto vegetale in eccesso rispetto a quella necessaria e prelevare dopo la macerazione la quantità richiesta dal kit commerciale. Ciò consente di aumentare le possibilità di diagnosticare la presenza del virus, che può non essere distribuito uniformemente nei tessuti delle piante infette.

Includere sempre nella prova l'estrazione di un controllo sicuramente esente dall'infezione (primo da estrarre) e un controllo sicuramente infetto dal virus (ultimo da estrarre), 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, utilizzando il tampone fosfato 0,1M pH 7,2 (sterile):

- Pesare 0.5 g di tessuto vegetale e collocarli nella bustina 'Bioreba'
- Aggiungere 2,5 ml di tampone nella bustina.
- Macerare il campione.
- Trasferire 100 µl di omogenato in una provetta da 2 ml e proseguire seguendo il protocollo del kit.

Saggio RT-PCR

1. Primer

I primers (Louro et al., 2000; Vaira et al., 2002), disegnati nella regione codificante per la proteina HSP70, sono i seguenti

TICV-32 (forward)	5'- TCAGTGCGTACGTTAATGGG - 3'
TICV-532 (reverse)	5'- CACAGTATACAGCAGCGGCA - 3'
ToCV-172 (forward)	5'- GCT TCC GAA ACT CCG TCT TG - 3'
TICV-610 (reverse)	5'- TGTCGAAAGTACCGCCACC - 3'

I primers possono essere ordinati ad apposite ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati. E' conveniente diluire i primers ad una concentrazione di 100 μ M 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 μ l totali alla concentrazione di 10 μ M in acqua sterile e conservarle a -20 °C.

2. Preparazione del saggio

1. Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta. Indossare guanti monouso.
2. Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenerli sotto la luce U.V. per 10 minuti prima di utilizzarli
3. Siglare le provette e metterle in ordine in un porta provette mantenuto in ghiaccio.
4. Scongela i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata mantenendoli in ghiaccio.
5. Preparare la miscela di reazione tenendola in ghiaccio

ARNADIA – Protocollo di Diagnosi per Crinivirus del pomodoro

Miscela di reazione per TICV e ToCV in reazione singola

Componenti	Volume (μL)	Concentrazione finale
• dH ₂ O RNase free	9.5	-
• 2X Reaction Mix (PCR buffer)	12.5	1X
• Forward primer (10 μ M)	0.5	0.2 μ M
• Reverse primer (10 μ M)	0,5	0.2 μ M
• SuperScript III RT/ Platinum® Taq Mix	1.0	-
Totale	24.0	-
RNA totale estratto (TRNA)	1.0	-

Procedimento:

1. Mescolare bene la soluzione.
2. Distribuire 24 μ l di miscela di reazione per ciascuna provetta.
3. Aggiungere l'estratto di RNA a ciascuna provetta, cambiando puntale ad ogni campione.
4. Accertarsi che nelle provette tutta l'aliquota della miscela di reazione sia sul fondo della provetta. Eventualmente centrifugare per pochi secondi.
5. Inserire le provette nel termociclatore.
6. Avviare la RT-PCR dopo aver impostato o selezionato il programma specifico.

Ciclo

	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
Trascrizione inversa	50 °C	30'	1
Denaturazione	94 °C	5'	1
Amplificazione	94 °C	30"	33
	57 °C	30"	
Amplificazione	72 °C	60"	33
	57 °C	30"	
Estensione finale	72 °C	10'	1
Step di blocco	4 °C	10'	1

In caso di pausa prima della visualizzazione su gel, mettere gli amplificati in frigorifero a 4°C

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 gli amplificati per eliminare l'eventuale condensa formatasi sul tappo, che può provocare al momento della apertura pericolose contaminazioni per aerosol.
2. Caricare 10 µl del campione in ciascun pozzetto, dopo aver aggiunto 2 µl di loading buffer 10X. Cambiare il puntale ad ogni campione.
3. Caricare in un pozzetto un marker idoneo (range circa 50-1000 bp).
4. Correre per circa 30-40 minuti a 100 Volt, facendo riferimento al fronte del colorante.
5. Estrarre il gel dalla cella e trasferirlo per 15-30 minuti circa in una soluzione 0,5 µg/ml di etidio bromuro .
6. Lavare il gel per circa 5 minuti in H₂O.
7. Osservare il gel mediante un transilluminatore ad U.V., fare la fotografia e conservare la foto (Tiff o Jpg) da allegare al foglio di lavoro.

Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo si osserverà una sola banda di:

- ~ 500 bp per TICV
- ~ 439 bp per ToCV

che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo in corrispondenza della banda di riferimento del marker. La presenza di altre bande più deboli indica una reazione di amplificazione non specifica e il test deve essere ripetuto.

Nessuna banda deve essere presente nel controllo negativo e nel controllo H₂O

Punti critici del protocollo

- Il punto debole della RT-PCR è la elevata sensibilità di reazione, che da una parte consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi ma dall'altra, se non utilizzata correttamente, può dare campioni falsi positivi o provocare delle contaminazioni nel laboratorio (reagenti, blocco del termociclatore, micropipette, 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
 - cambiare i guanti frequentemente durante le operazioni di preparazione della miscela di reazione e di caricamento dei target (estratti RNA);
 - 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 o a provette fallate) trattare il blocco con soluzioni di DNasi reperibili in commercio.
- controllare sempre la etichetta dei reagenti, in particolare quella degli enzimi, prima di effettuare le opportune diluizioni (la concentrazione in Unità/ μ l 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.

Tamponi necessari alla corsa elettroforetica:

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	

SAGGIO MOLECOLARE

Real time RT-PCR

Saggio Real time RT-PCR (RT- qPCR)

Strumentazione, materiali e reagenti necessari

a) Strumentazione

1. Agitatore magnetico
2. Bilancia analitica
3. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (non necessaria)
4. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
5. Congelatore
6. Frigorifero 4-10°C
7. Macchina produttrice di ghiaccio
8. Micropipette dedicate all'estrazione e calibrate (P2, P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
9. Micropipette dedicate all'amplificazione e calibrate (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
10. Misuratore di pH
11. Omogeneizzatore
12. Termociclatore per real time
13. Vortex

b) Reagenti

1. Acqua sterile RNase free
2. Composti chimici per la preparazione del tampone di estrazione
3. Controllo negativo, sicuramente esente da infezione da TICV/ToCV ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
4. Controllo positivo, sicuramente infetto da TICV/ToCV
5. TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix (Applied Biosystem Cod. N. 4309169)
6. RNase inhibitor (incluso nel kit ABI Master Mix)
7. Primers e sonda specifici per TICV o ToCV
8. Primers e sonda specifici per controllo endogeno per pianta

c) Materiali

1. Bustine di plastica per omogeneizzatore
2. Carta da laboratorio
3. Guanti
4. Pellicole adesive per chiusura piastre da 96 pozzetti
5. Piastre da 96 pozzetti per real time o provette ottiche specifiche
6. Provette da 1,5 e 2 ml
7. Puntali sterili per micropipette con filtro

Preparazione del saggio RT-qPCR

Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli. Ciascun campione deve essere replicato 2 volte nell'esperimento. Preparare lo schema della piastra

direttamente con il programma fornito dalla Real Time o fare uno cartaceo, su cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

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

- 1 controllo negativo ogni 20 campioni costituito dalla miscela di reazione in cui vengono aggiunti 5 µl di acqua sterile al posto dell'estratto;
- 1 controllo negativo ogni 20 campioni costituito da un campione sicuramente esente da TICV/ToCV, appartenente alla stessa matrice e alla stessa specie dei campioni da saggiare, preparato congiuntamente agli altri.
- 1 controllo positivo costituito da un campione sicuramente infetto dal TICV/ToCV, preparato congiuntamente agli altri.

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

Estrazione con kit commerciale

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen cat no. 7490450 per 50 campioni)

Seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della ditta produttrice

Macerare accuratamente con mortaio e pestello sterili il tessuto fogliare (*). E' consigliabile macerare una quantità di tessuto vegetale in eccesso rispetto a quella necessaria e prelevare dopo la macerazione la quantità richiesta dal kit commerciale. Ciò consente di aumentare le possibilità di diagnosticare la presenza del virus, che può non essere distribuito uniformemente nei tessuti delle piante infette.

Includere sempre nella prova l'estrazione di un controllo sicuramente esente dall'infezione (primo da estrarre) e un controllo sicuramente infetto dal virus (ultimo da estrarre), 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, utilizzando il tampone fosfato 0,1M pH 7,2 (sterile):

- Pesare 0.5 g di tessuto vegetale e collocarli nella bustina 'Bioreba'
- Aggiungere 2,5 ml di tampone nella bustina.
- Macerare il campione.
- Trasferire 100 µl di omogenato in una provetta da 2 ml e proseguire seguendo il protocollo del kit.

Saggio RT-qPCR

1- Primer e sonde

Per la diagnosi di TICV* e ToCV° si utilizzano primers e sonda TaqMan di seguito riportati:

TICV- 463 for	5'- GCGGGACATTTTTTATCATATGC -3'
TICV- 577 rev	5'- TCAGCCCAACATCTTGTAGTTGTT -3'
TICV – 497 probe	5'FAM - CGTCAGGTCACCCAAACGCTCTAAGG – MGB 3'

*(disegnati nella regione codificante per la proteina capsidica CP - Tiberini et al., 2011)

ToCV- 258 for	5'- GTCTGTTCCGGCTGATTACAAGT -3'
ToCV- 331 rev	5'- AATTGAAACCCAAAGAGGAACAAA -3'
ToCV – P probe	5'FAM - TGGGCAGAGACTTTTCATGCAGGCA – MGB 3'

° (disegnati nella regione codificante per la proteina HSP70 – Morris et al., 2006)

Per la reazione di controllo sul gene endogeno (cytochrome oxidase) del campione vegetale si utilizzano i primers e la sonda TaqMan di seguito riportati:

COX F	5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'
COX R	5'-CAACTACGGATATATAAGRRCRRRAACTG-3'
COX SOL 1511T probe	5'-VIC-AGG GCA TTC CAT CCA GCG TAA GCA-MGB 3'

I primers e le sonde possono essere ordinati ad apposite ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati.

Diluire i primers alla concentrazione d'uso di 100µM in dH₂O sterile e mantenere a -20 °C. Preparare, quindi, delle sub-aliquote di circa 20 µl totali ad una concentrazione d'uso di 10µM in dH₂O sterile e conservarle a -20°C da utilizzare nella preparazione della miscela di reazione.

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

2. 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 UV pipette, puntali con filtro, portaprovette.
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)
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
8. distribuire 24 μ l di miscela di reazione per ciascuna provetta o pozzetto,
9. cambiare area di lavoro e caricare 1 μ l di estratto con una micro pipetta dedicata SOLO a questo scopo.
10. inserire le provette o la piastra nel termociclatore
11. avviare la RT-qPCR dopo aver impostato o selezionato il programma:

Miscele di reazione per TICV / ToCV / COX:

<i>Reagenti</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentrazione finale in 25 µl</i>
dH ₂ O Rnase free	8.875 µl	
2X Master Mix	12.5 µl	1X
40X RNase Inhibitor	0.625 µl	1X
10 µM Forward primer	0.75 µl	(0,3 µM)
10 µM Reverse primer	0.75 µl	(0,3 µM)
5 µM TaqMan probe	0.5 µl	(0.1 µM)
Totale	25 µl	
Total RNA	1.0 µl	

Ciclo

<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
48 °C	30'	1
95 °C	10'	1
95 °C	15''	40
60 °C	1'	

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

3. Valutazione dei risultati

Una volta stabilito il limite soglia (threshold):

- considerare **positivi** tutti i campioni che il software del termociclatore riporta con un valore di Ct < 38-40 per il virus e per il rispettivo controllo interno (COX) tenendo conto del valore del Ct del controllo sano.
- considerare **negativi** i campioni con un valore di Ct > 38-40 per il virus tenendo conto del Ct del controllo positivo e con il rispettivo controllo interno (COX) a un valore di Ct < 38-40

- i campioni con un valore di $Ct > 40$ devono essere analizzati di nuovo se il rispettivo controllo interno (COX) ha un analogo valore di $Ct > 40$

4. Punti critici del protocollo

- Il punto debole della RT-PCR è l'elevata sensibilità di reazione, che da una parte consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi ma dall'altra, se non utilizzata correttamente, può dare campioni falsi positivi a causa delle contaminazioni all'interno della piastra o tra i microtubi durante il caricamento dei singoli estratti di RNA o nella preparazione della miscela. 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 tre fasi e set di micropipette dedicate a ciascuna fase. Fare molta attenzione nell'area dove si maneggiano amplificati e non portare gli amplificati nell'area dedicata alla preparazione della miscela di reazione.
 - 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
 - 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 RNA);
 - 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
 - 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.

Bibliografia consultata

- Duffus J.E., H.-Y. Liu, G.C. Wisler, 1996. Tomato infectious chlorosis virus – A new clostero-like virus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *European Journal of Plant Pathology* 102, 219-226.
- Liu H.Y., G.C. Wisler, J.E. Duffus (2000) Particle lengths of whitefly transmitted criniviruses. *Plant Disease* 84:803–805
- Louro D., G.P. Accotto and A.M. Vaira (2000) Occurrence and diagnosis of *Tomato chlorosis virus* in Portugal. *European Journal of Plant Pathology* 106: 590-592
- Morris E., E. Steel, P. Smith, N. Boonham, N. Spence and I. Barker (2006) Host range studies for *Tomato chlorosis virus*, and *Cucumber vein yellowing virus* transmitted by *Bemisia tabaci* (Gennadius). *European Journal of Plant Pathology* 114: 265-273
- Tiberini A., A. Manglii, V. Cavalieri, C. Rapisarda, L. Tomassoli, (2011). Multiplex Real Time RT-PCR for Tomato chlorosis virus and Tomato infectious chlorosis virus in tomato plants and whiteflies. Atti del XVII Convegno SIPaV – Bologna 12-14 Settembre 2011, p.92.
- Vaira A.M., G.P. Accotto, M. Vecchiati and M. Bragaloni (2002) *Tomato infectious chlorosis virus* causes leaf yellowing and reddening of tomato in Italy. *Phytoparasitica* 30: 290-294
- Wintermantel W.M., G.C. Wisler, A.G. Anchieta, H.Y. Liu, A.V. Karasev and I.E. Tzanetakis, (2005). The complete nucleotide sequence and genome organization of *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology* 150: 2287-2298.
- Wintermantel W.M., A.A. Cortez, A.G. Anchieta, A. Gulati-Sakhuja and L.L. Hladky (2008) Co-infection by two criniviruses alters accumulation of each virus in a host-specific manner and influences efficiency of virus transmission. *Phytopathology* 98: 1340-1345
- Wisler G.C., R.H. Li, H.-Y. Liu, D.S. Lowry, J.E. Duff us, 1998. Tomato Chlorosis Virus: A new whitefly-transmitted phloem-limited, bipartite clostero-virus of tomato *Phytopathology*, 88, 402-409.

INDICE

Descrizione della malattia	pag. 3
Metodologie diagnostiche	pag. 6
Premessa	“ 7
Prove di validazione	“ 8
Applicazione delle diverse metodologie	“ 13
Saggi molecolari: one step RT-PCR	pag. 14
Strumentazione, materiale e reagenti	“ 15
Preparazione del saggio	“ 16
Estrazione dei campioni	“ 16
Saggio RT-PCR	“ 17
Valutazione dei risultati	“ 19
Punti critici del protocollo	“ 19
Tamponi necessari all’effettuazione della RT-PCR	“ 21
Saggi molecolari: Real Time RT- qPCR	pag. 22
Strumentazione, materiale e reagenti	“ 23
Preparazione del test	“ 23
Estrazione dei campioni	“ 24
Saggio RT-qPCR	“ 25
Valutazione dei risultati	“ 27
Punti critici del protocollo	“ 28
Bibliografia consultata	pag. 29