

REGIONE SICILIANA  
ASSESSORATO AGRICOLTURA, SVILUPPO RURALE E PESCA MEDITERRANEA  
DIPARTIMENTO AGRICOLTURA

**SERVIZIO FITOSANITARIO REGIONALE**

**ACCORDO DI RICERCA FINANZIATO CON FONDI REGIONALI**

***“SVILUPPO DI TECNICHE DIAGNOSTICHE E STRATEGIE DI CONTENIMENTO DEI NUOVI  
BEGOMOVIRUS CHE SUPERANO LE RESISTENZE DELLE PIANTE DI POMODORO”***

***RESPONSABILE SCIENTIFICO PROF. SALVATORE DAVINO***



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

## INDICE

<b>CAPITOLO 1 – PREMESSA</b>	<b>PAG.</b>	<b>3</b>
<b>CAPITOLO 2 – MONITORAGGIO DEL TERRITORIO</b>	<b>PAG.</b>	<b>6</b>
<b>CAPITOLO 3 – STUDIO DELLA DISPERSIONE DEL NUOVO RICOMBINANTE</b>	<b>PAG.</b>	<b>9</b>
<b>CAPITOLO 4 - MESSA A PUNTO DI UN NUOVO PROTOCOLLO PER L'INDIVIDUAZIONE DI MOLECOLE RICOMBINATI</b>	<b>PAG.</b>	<b>12</b>
<b>CAPITOLO 5 – COSTITUZIONE DI UN CLONE INFETTIVO E HOST RANGE</b>	<b>PAG.</b>	<b>17</b>
<b>CAPITOLO 6 – RISULTATI</b>	<b>PAG.</b>	<b>20</b>
<b>CAPITOLO 7 – PUBBLICAZIONI</b>	<b>PAG.</b>	<b>32</b>
<b>CAPITOLO 8 – DIVULGAZIONE SCIENTIFICA</b>	<b>PAG.</b>	<b>33</b>
<b>CAPITOLO 9 – RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b>	<b>PAG.</b>	<b>34</b>



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

## CAPITOLO 1 – PREMESSA

Il comparto orticolo riveste un ruolo determinante per l'economia dell'intero settore agricolo, nonostante nell'ultimo decennio sia stato gravato da una profonda crisi economica. Tra le colture ortive più importanti a livello mondiale e nazionale, di certo, assume un ruolo fondamentale il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.), il quale è coltivato in tre principali aree del mondo: Estremo Oriente, Bacino del Mediterraneo e Nord America, con una superficie investita di oltre 4,8 milioni di ettari ed una produzione complessiva di circa 182 milioni di tonnellate (FAO, 2017)

Per quanto riguarda l'Unione europea, la coltivazione di pomodoro è diffusa su oltre 380.000 ettari. Nell'ambito del Bacino del Mediterraneo, il Paese in cui la produzione di pomodoro è la più elevata, è l'Italia, con circa 100.000 ha di superficie investita a pomodoro ed una produzione di circa 6 milioni di t (considerando sia il pieno campo che le colture protette), seguita dalla Spagna con circa 61.000 ettari ed una produzione di poco superiore ai 5 milioni di tonnellate.

In dettaglio, la superficie italiana interessata dalla coltivazione in pieno campo, comprendente la coltivazione sia di pomodoro da mensa che da industria, si aggira attorno ai 90.000 ha, con una produzione di circa 54 milioni di q, mentre la coltivazione in ambiente protetto occupa una superficie di circa 7.200 ha, con una produzione poco superiore a 5.300.000 q (ISTAT, 2018). Dai dati riportati in Tabella 1, si evince che la maggior parte delle superfici investite a pomodoro e delle relative produzioni totali sia concentrata nel Mezzogiorno.

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

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



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

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

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

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

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



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

I produttori italiani e soprattutto quelli siciliani, negli ultimi 20 anni, sono stati messi a dura prova, con importanti perdite di produzione dovute a numerose malattie causate da diversi patogeni. Tra questi i maggiori responsabili sono stati i virus. Ciò perché, come è noto, i virus sono dotati di una elevata capacità di mutazione, promuovendo lo sviluppo di nuovi individui ricombinanti che succedono ai loro parentali e che sono in grado di superare i geni di resistenza presenti nelle piante di pomodoro attualmente in commercio, favorendo lo sviluppo di nuovi focolai, o nei casi più gravi, l'esplosione di nuove epidemie. Esempio di tale caratteristica è rappresentato da alcune specie virali appartenenti al genere *Begomovirus*, con particolare riferimento alla sindrome dell'accartocciamento fogliare giallo del pomodoro (TYLCD – Tomato yellow leaf curl disease). Questa malattia è causata da due *Begomovirus*: il *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* – TYLCSV (presente in Sicilia sin dalla fine degli anni 80) ed il *Tomato yellow leaf curl virus* – TYLCV (presente in Sicilia dal 2002). TYLCD, ad oggi rappresenta una delle malattie più distruttive per il pomodoro, almeno nel Bacino del Mediterraneo. Negli ultimi 10 anni, visti gli ingenti danni provocati da questo complesso virale, molte ditte sementiere hanno prodotto piante con differenti livelli di tolleranza/resistenza a questa malattia, ciò di conseguenza ha comportato una enorme diffusione di tali piante, tanto che, attualmente, circa il 95% degli agricoltori siciliani coltiva ibridi tolleranti al TYLCD. Tuttavia, nel 2016, durante alcuni sopralluoghi in campo, in provincia di Ragusa, molte piante di pomodoro con tolleranza al TYLCD hanno mostrato gravi sintomi ascrivibili ad infezioni da *Begomovirus*.

I primi studi effettuati con approfondite analisi molecolari hanno messo in evidenza che si trattava di una nuova entità virale generata per ricombinazione tra TYLCV e TYLCSV che non poteva essere diagnosticata con i normali protocolli EPPO e che era capace di superare le tolleranze delle piante.

Da tale contesto prende spunto il presente progetto di ricerca allo scopo di sviluppare una tecnica diagnostica efficace e sensibile e al contempo mettere a punto delle strategie di contenimento di tali nuovi *Begomovirus* che riescono a superare le resistenze delle piante di pomodoro più diffuse e coltivate nei confronti dei virus responsabili della sindrome dell'accartocciamento fogliare giallo del pomodoro (TYLCD).



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

## CAPITOLO 2 – MONITORAGGIO DEL TERRITORIO

Durante lo svolgimento del progetto è stata avviata una intensa attività di monitoraggio su tutto il territorio regionale, con il continuo supporto tecnico degli Ispettori Fitosanitari della Regione Sicilia. Nello specifico durante le diverse visite eseguite per il campionamento su piante di pomodoro, ogni prelievo è stato effettuato attraverso l'ausilio dell'applicazione mobile "Planthology" (Davino *et al.*, 2017). Inoltre, tale "app mobile" è stata affidata ai tecnici di tre aziende produttrici di pomodoro che operano nelle province maggiormente interessate dalla coltivazione del pomodoro in serra, ovvero: Ragusa, Caltanissetta e Siracusa. Grazie all'utilizzo di questa applicazione è stato possibile acquisire numerose fotografie dei sintomi in campo in tutte le zone di campionamento, ed inoltre, contestualmente al campionamento, per ciascun campione prelevato è stata effettuata la georeferenziazione, acquisendo le coordinate GPS. Tali informazioni sono state utilizzate per la creazione delle mappe di dispersione dei patogeni, che sono state utilizzate per la successiva messa a punto di una adeguata strategia di contenimento. Per ogni campione raccolto sono stati memorizzati i seguenti dati: varietà, sistema di allevamento ed azienda da cui è stato prelevato. Si precisa che, durante le fasi di campionamento, sono stati prelevati 300 campioni per anno, per un totale di 600 campioni, così come previsto dalle attività progettuali. Di questi, 250/anno sono stati prelevati da cultivar di pomodoro che presentavano il gene della resistenza *Ty-1*, che conferisce resistenza nei confronti di TYLCD, mentre i restanti 50 campioni/anno provenivano da varietà non tolleranti alla malattia. È importante sottolineare che, indipendentemente dai sintomi canonici descritti per TYLCSV e TYLCV, in tutti i casi le piante di pomodoro mostravano gravi ingiallimenti ed arricciamenti a carico delle foglie (Figure 1 e 2).

I campioni di pomodoro prelevati sono stati posti in borse termiche e trasferiti nell'arco di pochissime ore, presso il laboratorio di Virologia vegetale "Bruno Rosciglione" dell'Università degli Studi di Palermo, dove sono stati sottoposti alle successive analisi molecolari.

Da ciascuna pianta è stata selezionata una fogliolina sintomatica, dalla quale è stata asportata la porzione del picciolo e successivamente sottoposta alle procedure di estrazione degli acidi nucleici.



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)



**Figura 1** – Ingiallimenti fogliari e vistoso accartocciamento fogliare su piante di pomodoro.



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)



**Figura 2** – **A sinistra:** ingiallimenti fogliari, **A destra:** vistosi arricciamenti fogliari verso il basso.



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

## CAPITOLO 3 – STUDIO DELLA DISPERSIONE DEL NUOVO RICOMBINANTE

Allo scopo di studiare a fondo la nuova entità virale generata per ricombinazione tra TYLCV e TYLCSV che è capace di superare le tolleranze delle piante e che ha creato i numerosi problemi di cui si è riferito in premessa, è stato eseguito il seguente protocollo,

- Estrazione degli acidi nucleici da porzioni di tessuto fogliare;
- Selezione dei primer per il rilevamento dei TYLC mediante PCR;
- Prove di PCR;
- Analisi SSCP dei profili ottenuti.

Da tutti i campioni prelevati si è proceduto ad effettuare l'estrazione del DNA totale utilizzando un kit commerciale della Macherey-Nagel, seguendo il protocollo suggerito dalla casa produttrice. La concentrazione e la qualità del DNA è stata stimata mediante spettrofotometro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, DE, USA). Il DNA totale estratto è stato conservato a -20 °C in attesa delle successive analisi molecolari.

Per comprendere quali tipi di molecole virali erano presenti nei campioni prelevati, per ciascuno di essi sono state eseguite due distinte Multiplex polymerase chain reaction (mPCR); la prima, sviluppata da Davino e collaboratori nel 2008, che permette l'identificazione dei parentali (TYLCV, TYLCSV) e dei ricombinanti di tipo A e B (Rec Type A, Rec Type B). Questa tecnica sfrutta il principio di Stanley (1995), secondo cui il primo punto di ricombinazione tra due *Geminivirus* (Nicking) si trova sempre all'interno del nonanucleotide conservato, situato all'origine della replicazione durante il fenomeno replicativo virale, chiamato "rolling circle amplification".

Mediante l'utilizzo di 4 primer (Tabella 3) situati sulle zone conservate di TYLCSV e TYLCV si è in grado di individuare sia le molecole appartenenti al gruppo TYLCSV che le molecole appartenenti al gruppo TYLCV, nonché le molecole ricombinanti eventualmente formatesi.

**Tabella 3** – Multiplex Davino et al., 2008

Primer	Sequence	Specificità	Amplicone (bp)
TY247-	5'-GGTTCGTAGGTTTCTTCAACTAG-3'	-	-
TY2222+	5'-GTCGTTGGCTGTCTGTTGTC-3'	TYLCSV	800



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

TY2463+	5'-TGGTTCCCCATTCTCGTGG-3'	Rec Type A	570
TY255-	5'-GCTCGTAAGTTTCCTCAACGGAC-3'	-	-
TY2463+	5'-TGGTTCCCCATTCTCGTGG-3'	TYLCV	570
TY2222+	5'-GTCGTTGGCTGTCTGTTGTC-3'	Rec Type B	800

Tale PCR è stata eseguita in un volume finale di 25 µl contenente 0,4 U di Taq Polimerasi (Invitrogen), 0,2 mM di ciascun dNTPs, 0,4 mM di ciascun primer, 2,5 µl di reaction buffer 10X e 2mM di MgCl<sub>2</sub> e 1 µl di DNA bersaglio. Le condizioni di reazione sono state: 5min a 95 °C, 35 cicli di 30 secondi a 95 °C, 30 secondi a 60 °C e 30 secondi a 72 °C, seguiti da una estensione finale di 72 °C per 10 minuti. La seconda PCR multiplex (Tabella 4), sviluppata da Belabess e collaboratori nel 2015, permette l'identificazione dei ricombinanti non canonici (TYLCV-IL IS76 e TYLCV-IL-[IT:Sic23:16]).

**Tabella 4** – Multiplex Belabess *et al.*, 2015.

Test PCR / Primer	Sequenza	Specificità	Amplicone (bp)
<b>MxPCR1</b>			
Sar-43R	5'-TGCGTAGGDCCYACTWCTTTATCGG-3'	-	-
IL-2629F	5'-GGTGTCCCTCAAAGCTCTAWG-3'	Ricombinante TYLCV-IL/TYLCSV	187
Mld-2277F	5'-CTSWCCCCARTCGABGGTG-3'	Ricombinante TYLCV-Mild/ TYLCSV	548
TYS-2416(1)F	5'-CCCTCGAACTGAATGAGCATG-3'	Parentale TYLCSV	405
TYS-2416(2)F	5'-CCYTCAAAYTGSATGAGAAAYA-3'	Parentale TYLCSV	405
<b>MxPCR2</b>			
Ty-78R	5'-GCAATTTGATTGGTTGAYAGTSACR-3'	-	-
IL-2629F	5'-GGTGTCCCTCAAAGCTCTAWG-3'	Parentale TYLCV-IL	230
Mld-2277F	5'-CTSWCCCCARTCGABGGTG-3'	Parentale TYLCV-Mild	592
TYS-2416(1)F	5'-CCCTCGAACTGAATGAGCATG-3'	Ricombinante TYLCSV/TYLCV	440
TYS-2416(2)F	5'-CCYTCAAAYTGSATGAGAAAYA-3'	Ricombinante TYLCSV/TYLCV	440



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

In questo caso la miscela di PCR è stata preparata in un volume finale di 25  $\mu$ l, utilizzando 2  $\mu$ l di DNA al quale sono stati aggiunti 1  $\mu$ l di ciascun primer [10 mM], 2,5  $\mu$ l di buffer 10X, 1  $\mu$ l di dNTPs [10 mM], 1 U (0,2  $\mu$ l) di Taq DNA polimerasi (Invitrogen) e 17,3  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O sterile. Il prodotto è stato posto in termociclatore avviando il seguente protocollo: un ciclo di denaturazione iniziale a 95 °C per 5 minuti, 40 cicli, così costituiti: una fase di denaturazione a 95 °C per 45 sec, una fase di annealing a 60 °C per 45 sec ed una fase di sintesi a 72 °C per 45 sec, seguiti da un ciclo di sintesi finale a 72 °C per 10 minuti. Tutti i prodotti di PCR ottenuti da entrambe le PCR multiplex sono stati visualizzati su gel d'agarosio all'1,5%, colorato con SybrSafe, e visualizzato mediante transilluminatore UV.

I campioni risultati positivi solo per le molecole ricombinanti sono stati successivamente analizzati mediante Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), in modo da poter individuare variazioni di sequenze del DNA anche di una singola coppia di basi, per comprendere quindi se il *locus* di ricombinazione fosse rimasto fisso o meno.



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

### CAPITOLO 4 - MESSA A PUNTO DI UN NUOVO PROTOCOLLO PER L'INDIVIDUAZIONE DI MOLECOLE RICOMBINATI

L'utilizzo delle multiplex PCR di cui al Capitolo 3 sono risultate utili per lo studio della variabilità virale delle popolazioni di Begomovirus presenti all'interno della singola pianta, però non sono in grado di rilasciare un risultato esatto sull'effettiva presenza o meno del nuovo ricombinante che salta le resistenze del gene *Ty1* in piante di pomodoro. Per tale motivo si è cercato di mettere a punto una ulteriore tecnica di analisi che rilasci con esattezza l'isolato virale presente all'interno della pianta oggetto di studio. Per far ciò si è proceduto nel seguente modo:

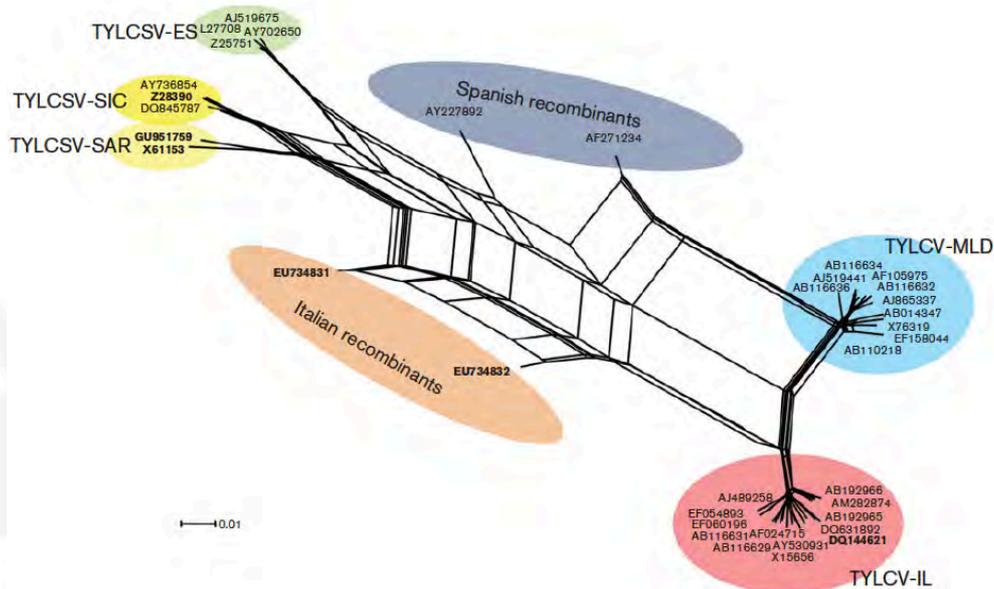
- Selezione delle sequenze di riferimento di TYLC
- Studio *in silico* delle sequenze mediante il programma Vector NTI;
- Selezione degli enzimi di restrizione;
- Applicazione *in vivo* della tecnica messa a punto.

**Selezione delle sequenze di riferimento:** Al fine di recuperare le sequenze idonee per i successivi studi *in silico* e *in vivo*, è stato preso come punto di partenza l'albero filogenetico, mostrante i diversi virus che provocano accartocciamento fogliare giallo del pomodoro. Tale albero filogenetico è stato realizzato tenendo in considerazione non le variazioni puntiformi, bensì le ricombinazioni tra i diversi virus, utilizzando come finestra di analisi 50 nucleotidi.



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)



**Figura 3** – Network filogenetica dei genomi completi di isolati virali che causano la malattia dell'accartocciamento fogliare giallo del pomodoro (gli isolati trovati in Italia sono riportati in grassetto) (Davino *et al.*, 2012).

Dallo studio di questo albero filogenetico e dai successivi allineamenti di sequenza, effettuati per gruppi di sequenze, si è giunti alla conclusione di utilizzare gli isolati virali riportati in Tabella 4.

**Tabella 5** – Isolati virali che causano la malattia dell'accartocciamento fogliare giallo del pomodoro selezionati per lo studio *in silico*.

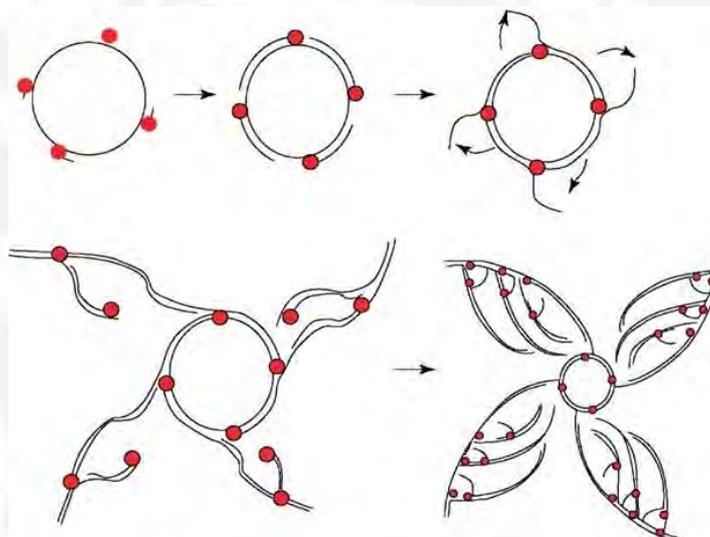
Isolato	Accession number
TYLCV-IL23	MF405078
TYLCV-IS76	LN812978
TYCAxV-Sic1	EU734831
TYLCAxV-Sic2	EU734832
TYLCAxV	AY227892
TYLCMaIV	AF271234
TYLCV 8/4	DQ144621
TYLCV MLD	X76319
TYLCSV-SAR	X61153
TYLCSV-SIC	Z28390
TYLCSV-ES	Z25751



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

**Studio *in silico* delle sequenze mediante il programma Vector NTI:** Al fine di studiare la variabilità interspecifica tra i diversi isolati utilizzati come riferimento e riportati in Tabella 4, le sequenze complete sono state scaricate dalla GenBank e linearizzate nel punto dell'origine della replicazione (Origin of replication – *Ori*). Mediante il programma Vector NTI (Invitrogen) si è proceduto a verificare se nel genoma di questi isolati esistessero delle zone altamente conservate per disegnare dei primer e che allo stesso tempo mostrassero una variabilità interna tale da poter discriminare, con una seconda analisi, i diversi isolati. Poiché nessuna zona è stata reputata idonea allo scopo, si è deciso di utilizzare la tecnica della “*Rolling Circle Amplification – RCA*” (Dean *et al.*, 2001) e successivamente tagliare il prodotto ottenuto con s degli adeguati enzimi di restrizione capaci di fornire pattern diversi mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio, in modo da poter identificare ogni singolo pattern con uno specifico isolato di TYLC. In figura 4 è riportato lo schema di funzionamento della amplificazione tipo RCA.



**Figura 4** – Schema di funzionamento della Rolling Circle Amplification.



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

**Selezione degli enzimi di restrizione:** Al fine di identificare un singolo pattern per isolato virale mediante il programma Vector NTI, le molecole selezionate sono state sottoposte ad analisi al fine di identificare gli adeguati enzimi da utilizzare per l'ottenimento di frammenti specifici. Poiché in un'unica restrizione non è stato possibile distinguere tutti gli isolati virali, si è deciso di procedere con due restrizioni successive. Per quanto concerne la prima digestione enzimatica, sono stati individuati gli enzimi *HindIII*, *NcoI*, *SacI* e *SphI*, i quali hanno un'attività enzimatica di restrizione superiore al 90% con il buffer Tango 1X. Tali enzimi di restrizione permettono di discriminare sei su dieci isolati presi in esame. Per le successive due digestioni enzimatiche, allo scopo di discriminare i restanti isolati, sono stati impiegati gli enzimi *SalI* e *MfeI*.

**Applicazione *in vivo* della tecnica messa a punto:** Sono stati analizzati gli isolati tenuti in congelatore presso il laboratorio di virologia vegetale e già caratterizzati dal punto di vista molecolare. Da ciascuna pianta analizzata è stata selezionata una fogliolina sintomatica, dalla quale è stata asportata la porzione del picciolo. Il materiale vegetale selezionato è stato successivamente sottoposto alle procedure di estrazione degli acidi nucleici.

Il DNA totale estratto è stato, infine, quantificato allo spettrofotometro NanoDrop 1000 (ThermoScientific) per le successive analisi.

Ogni campione estratto è stato sottoposto ad amplificazione isoterma RCA. Ad 1  $\mu$ l di DNA totale sono stati aggiunti 4  $\mu$ l di buffer premix contenente i random primer. Successivamente, la miscela è stata riscaldata per 3 minuti a 95 °C e posta immediatamente in ghiaccio dove sono stati aggiunti 5  $\mu$ l di enzime mix. La miscela così ottenuta è stata posta in termociclatore a 30 °C per 18 ore. Quindi, un microlitro di prodotto è stato visualizzato su gel di agarosio allo 0.8% dopo colorazione con SybrSafe.

Il prodotto così ottenuto è stato sottoposto a digestione enzimatica. La miscela per la prima digestione enzimatica è stata preparata in un volume finale di 50  $\mu$ l, utilizzando 4  $\mu$ l di prodotto ottenuto dalla RCA, al quale sono stati aggiunti 10 U di enzima *HindIII* (1  $\mu$ l), 10 U di *NcoI* (1  $\mu$ l), 10 U di *SacI* (1  $\mu$ l), 10 U di *SphI* (1  $\mu$ l), 5  $\mu$ l di Buffer Tango 10X (con BSA) e portato a volume con H<sub>2</sub>O sterile. La miscela di reazione per le successive digestioni enzimatiche è stata preparata in un volume finale di 50  $\mu$ l, utilizzando 4  $\mu$ l di prodotto ottenuto dalla RCA, al quale sono stati aggiunti 10 U di enzima



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

*Sall/MfeI*, 5 µl di Buffer Tango 10X (con BSA) e portato a volume con H<sub>2</sub>O sterile. Il protocollo di reazione ha previsto una temperatura di 37 °C per 16-18 h. I prodotti della digestione enzimatica sono stati successivamente visualizzati su gel d'agarosio al 2%, colorato con SybrSafe, e visualizzato mediante transilluminatore UV.



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

## CAPITOLO 5 – COSTITUZIONE DI UN CLONE INFETTIVO E HOST RANGE

Per ottenere la sequenza completa del genoma ricombinante, per il successivo sequenziamento e successivamente per l'ottenimento del clone infettivo, sui campioni risultati positivi ai ricombinanti è stata effettuata la "Rolling Circle Amplification – RCA" (Dean *et al.*, 2001), impiegando il Kit TempliPhi Kit (Amersham, UK), seguendo le istruzioni della casa produttrice. Questo processo di amplificazione isoterma unidirezionale permette di sintetizzare esponenzialmente e rapidamente più copie di molecole circolari di DNA di partenza, basandosi sull'attività della *Phi29* DNA polimerasi, che permette di amplificare molecole di DNA circolare mediante l'utilizzo di random primer (Figura 4) attraverso una reazione isoterma.

Ad 1 µl di DNA totale di ciascun campione sono stati aggiunti 4 µl di buffer premix contenente i random primer. Successivamente la miscela è stata riscaldata per 3 minuti a 95 °C e posta immediatamente in ghiaccio, a questo punto alla miscela sono stati aggiunti 5 µl di enzima mix. La miscela così ottenuta è stata posta in termociclatore a 30 °C per 18 ore. Un microlitro di prodotto è stato visualizzato su gel di agarosio all'1% dopo colorazione con SybrSafe. Il DNA amplificato è stato successivamente linearizzato con l'enzima di restrizione *SacI* (Thermo Fisher Scientific, USA). Il frammento ottenuto di ~2.8 kb, corrispondente all'intero genoma virale, è stato clonato all'interno del plasmide pUC119 linearizzato con lo stesso enzima. Dai cloni ottenuti per trasformazione contenenti l'inserto di 2.8 kb sono stati estratti i plasmidi, successivamente quantificati al NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA). La sequenza dell'inserto è stata verificata attraverso una Colony-PCR ed un solo clone virale (denominato #23) è stato successivamente sequenziato in entrambe le direzioni mediante la tecnica del walking chromosome. La sequenza ottenuta è stata confrontata mediante l'algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Mount, 2007) e le sequenze più simili sono state recuperate dalla GenBank per i successivi studi filogenetici. Mediante l'utilizzo del programma Plot Similarity è stato possibile individuare i punti di ricombinazione della sequenza #23. Una volta verificato il plasmide e l'inserto si è passati alla preparazione del vettore binario. Al fine di ottenere dei cloni infettivi è stato preparato l'inserto da inserire nel plasmide binario nel seguente modo: è stato linearizzato il plasmide pBluescript KS (-) con l'enzima *SacII*, è stata inserita una copia del genoma da 2.8 Kb recuperata per taglio enzimatico clone precedentemente ottenuto in pUC119 e successivamente, mediante, l'enzima *SpeI* è stata effettuata una delezione di circa 250 basi,



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

dopodiché è stata ligata alla copia difettiva ottenuta una copia intera del genoma virale generando , di fatto, un 1.9 mer virale. Il plasmide così ottenuto è stato reinserto in *E. coli* e successivamente estratto per il passaggio ad un secondo plasmide. Il DNA plasmidico estratto dalle colture di *E. coli* trasformate con i cloni è stato digerito con l'enzima *BssHI* per 2 ore a 37 °C, in modo tale da rilasciare l'intero inserto di 1.9 mer dal plasmide pBluescript KS (+); l'enzima è stato successivamente inattivato a 80 °C per 20 minuti. Per far sì che l'inserto abbia le estremità non coesive è stato eseguito una ulteriore modificazione con il frammento di Klenowv. Successivamente è stata eseguita un'estrazione fenolo-cloroformio e una successiva precipitazione con etanolo, il pellet è stato poi risospeso in 20 µl di H<sub>2</sub>O.

Una volta preparato l'inserto si è passati alla preparazione del plasmide binario. In questa circostanza come plasmide binario è stato utilizzato il pBin19. Il vettore linearizzato è stato processato con uno speciale enzima di modificazione, la fosfatasi alcalina antartica al fine di evitare che il plasmide con estremità coesive sottoposto a processo di ligazione potesse ricircularizzarsi senza aver acquisito l'inserto. Le reazioni di ligazione si avvalgono dell'utilizzo dell'enzima T4 DNA ligasi e permettono al vettore plasmidico di ricircularizzarsi includendo l'inserto compatibile. Esse sono state allestite in un volume finale di 30 µl e incubate per tutta la notte a temperatura ambiente.

Una volta eseguita la ligazione il prodotto ottenuto è stato clonato in *E. coli*, le piastre sono state fatte crescere per tutta la notte e il giorno seguente si è proceduto con la scelta delle colonie e la successiva posa in mezzo liquido. Il giorno seguente si è proceduto con l'estrazione del plasmide mediante un kit commerciale della MoBio senza l'utilizzo delle colonne ma con l'aggiunta di resina. Una volta ottenuto il plasmide questo è stato digerito per confermare l'effettiva presenza dell'inserto virale 1.9 mer. A questo punto si è proceduto con il passaggio del plasmide binario in ceppi di *Agrobacterium tumefaciens* C58 (queste cellule sono già resistenti alla rifampicina e sono disarmate, quindi non causano infezione). Le cellule trasformate così ottenute sono state poste ad incubare per 48 ore a 28 °C, da queste piastre sono state prelevate le colonie per preparare le successive fasi di agro-infezione. L'agro-infezione è stata eseguita per conoscere l'host range di tale ricombinante. A tale scopo sono state agro-inoculate 5 piante di pomodoro, 5 di melanzana e 5 di peperone, che rappresentano le colture ortive più importanti per la orticoltura siciliana.



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

Per agro-infettare le piantine sono state usate siringhe Hamilton da 50  $\mu$ l, lavate precedentemente in acqua sterile. In ciascuna pianta sono stati inoculati circa 30  $\mu$ l di sospensione batterica all'ascella di alcune foglie e in diversi punti del fusto, cercando di non procurare molti danni meccanici alla pianta. Dopo due settimane dall'infezione artificiale sono stati prelevati dei germogli, da questi è stato estratto il DNA totale con il metodo descritto in precedenza e si è proceduto all'esecuzione delle multiplex PCR per individuare la presenza delle molecole ricombinanti, la procedura è stata ripetuta settimanalmente per un periodo di 60 giorni, osservando ogni qualvolta la comparsa dei sintomi.



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

## CAPITOLO 6 – RISULTATI

### 6.1 MONITORAGGIO DEL TERRITORIO E STUDIO DELLA DISPERSIONE DEL NUOVO RICOMBINANTE

Di seguito si riportano i risultati relativi alle attività di monitoraggio, ottenuti dalle analisi molecolari svolte seguendo i protocolli descritti precedentemente. Si precisa che per semplicità e brevità di esposizione i risultati riportati in Tabella 6 riguardano soltanto alcuni dei campioni analizzati nel corso del monitoraggio, che sono risultati positivi solo alle molecole ricombinanti. Più precisamente sono riportati i risultati relativi a 60 campioni, pari al 10% del totale dei campioni analizzati.

**Tabella 6** – Campioni positivi alla Multiplex PCR soltanto per i ricombinanti di TYLC.

ID Campione	Varietà	Resistenza TY-1	TYLCV	TYLCSV	Rec Belabess <i>et al.</i>
210117/1	KronosTy	SI	-	-	+
210117/2	KronosTy	SI	-	-	+
210117/3	KronosTy	SI	-	-	+
210117/4	KronosTy	SI	-	-	+
210117/5	KronosTy	SI	-	-	+
210117/6	KronosTy	SI	-	-	+
210117/7	KronosTy	SI	-	-	+
210117/8	KronosTy	SI	-	-	+
210117/1PC	TyTy	SI	-	-	+
210117/2PC	TyTy	SI	-	-	+
210117/3PC	TyTy	SI	-	-	+
210117/1PR	TyTy	SI	-	-	+
210117/2PR	TyTy	SI	-	-	+
210117/3PR	TyTy	SI	-	-	+
210117/1V	Dorotea	SI	-	-	+
210117/2V	Dorotea	SI	-	-	+
210117/3V	Dorotea	SI	-	-	+
260417/1	Datterino	SI	-	-	+
260417/2	Datterino	SI	-	-	+
260417/3	Datterino	SI	-	-	+
260417/4	Datterino	SI	-	-	+
260417/5	Cilieginò	SI	-	-	+
260417/6	Cilieginò	SI	-	-	+
260417/7	Cilieginò	SI	-	-	+



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

260417/8	Cilieginò	SI	-	-	+
260417/9	Datterino 1201	SI	-	-	+
260417/10	Datterino 1201	SI	-	-	+
150617/1	Dorotea	SI	-	-	+
150617/2	Dorotea	SI	-	-	+
150617/3	Dorotea	SI	-	-	+
150617/4	Dorotea	SI	-	-	+
180717/1	Datterino 1201	SI	-	-	+
180717/2	Datterino 1201	SI	-	-	+
250118/1	KronosTy	SI	-	-	+
250118/2	KronosTy	SI	-	-	+
250118/3	KronosTy	SI	-	-	+
250118/4	KronosTy	SI	-	-	+
250118/5	Cilieginò	SI	-	-	+
250118/6	Cilieginò	SI	-	-	+
250118/7	Cilieginò	SI	-	-	+
250118/8	Cilieginò	SI	-	-	+
140318/1	TyTy	SI	-	-	+
140318/2	TyTy	SI	-	-	+
140318/3	TyTy	SI	-	-	+
140318/4	TyTy	SI	-	-	+
270518/1	Dorotea	SI	-	-	+
270518/2	Dorotea	SI	-	-	+
270518/3	Dorotea	SI	-	-	+
270518/4	Dorotea	SI	-	-	+
110618/1	Datterino	SI	-	-	+
110618/2	Datterino	SI	-	-	+
110618/3	Datterino	SI	-	-	+
110618/4	Datterino	SI	-	-	+
110618/5	Datterino	SI	-	-	+
110618/6	Datterino	SI	-	-	+
030718/1	KronosTy	SI	-	-	+
030718/2	KronosTy	SI	-	-	+
030718/3	KronosTy	SI	-	-	+
030718/4	KronosTy	SI	-	-	+

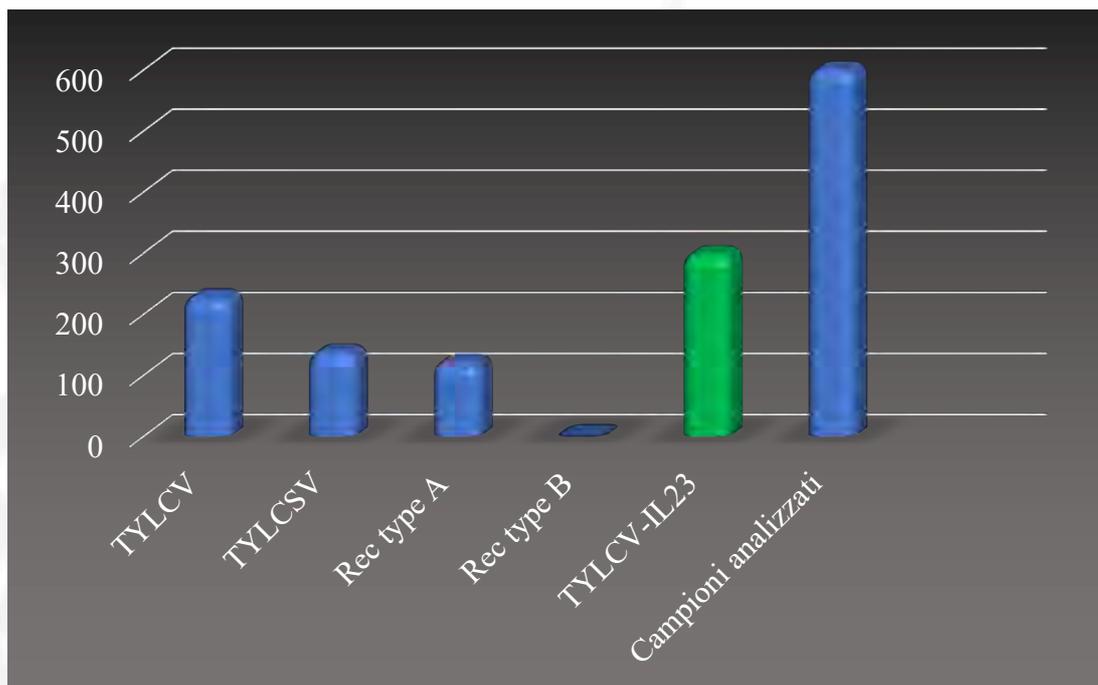
Nello specifico, dei 600 campioni analizzati mediante le due multiplex PCR precedentemente descritte, 228 sono risultati positivi a TYLCV (38%), 137 a TYLCSV (22,9%), 121 a TYLCV Rec



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

Type A (20,2%) e 298 positivi al ricombinante non canonico TYLCV-IL23 (49,6%) (Figura 5), mentre nessun campione analizzato è stato trovato positivo per il al TYLCV Rec Type B.



**Figura 5** – Dinamica della popolazione di TYLCV, TYLCSV e loro ricombinanti nel territorio siciliano.

Inoltre, è stato dimostrato che nel territorio oggetto di studio si è riscontrata una percentuale di diffusione delle molecole ricombinanti che raggiunge circa il 50%. Dall'analisi di tali risultati appare evidente che le popolazioni di TYLCV e TYLCSV sono costantemente presenti nel territorio siciliano, ma la loro percentuale è leggermente diminuita rispetto agli anni precedenti, probabilmente a causa dell'aumento della percentuale di presenza delle molecole ricombinanti non canoniche TYLCV-IL23, che sembra stiano prendendo il sopravvento su tutte le altre. In conclusione, si può affermare che le molecole ricombinanti si stanno diffondendo sempre di più sia nello spazio che nel tempo, rischiando di compromettere maggiormente la già non facile situazione in cui versa l'orticoltura siciliana.

In totale, tutti i 600 campioni analizzati sono risultati infetti ad almeno un begomovirus e, in alcuni casi, presentavano infezioni miste. Le analisi hanno confermato che 298 campioni di TYLCV-IL23 presentavano un profilo uguale al ricombinate oggetto di studio.

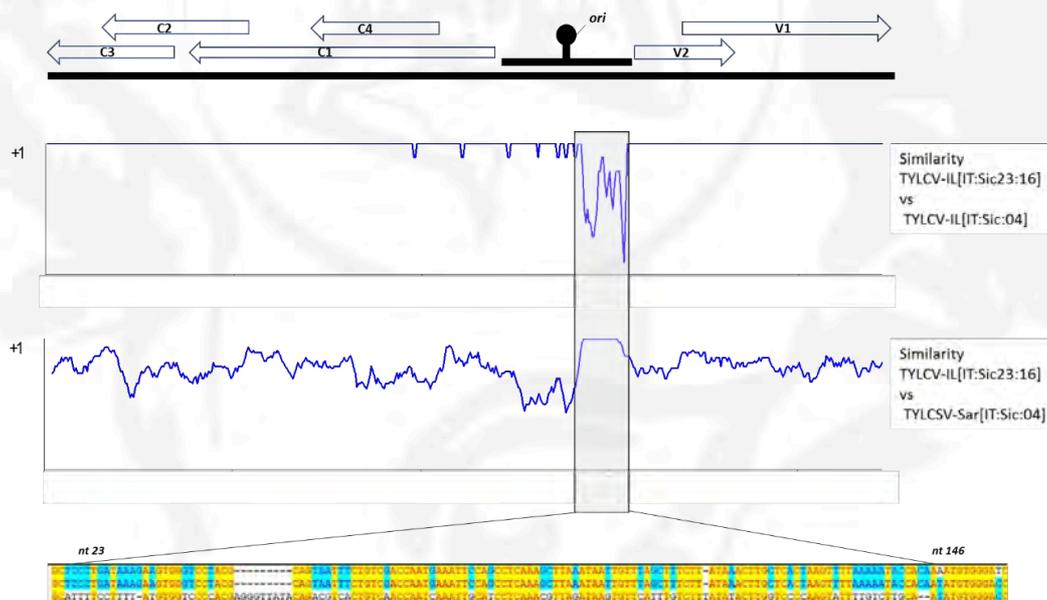


## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

È rilevante evidenziare come tutti i campioni risultati positivi soltanto per le molecole ricombinanti provenivano da piante che presentavano il gene della resistenza *Ty-1*, che, come già anticipato, conferisce alle piante di pomodoro resistenza nei confronti di TYLCD.

I risultati ottenuti con la analisi SSCP hanno indicato che tutti i campioni che presentavano le molecole ricombinanti mostravano lo stesso pattern. Per questo motivo, soltanto un campione, identificato con la sigla “#23” è stato utilizzato per ottenere la sequenza nucleotidica completa del genoma, tale sequenza, denominata TY#23, ha una lunghezza di 2.774 nt e mostra le caratteristiche ORF di un begomovirus monopartito. Le analisi filogenetiche preliminari eseguite mediante algoritmo BLAST (Mount, 2007) hanno mostrato un’alta similarità con TYLCV. Tuttavia, analisi più approfondite hanno indicato come TY#23, pur essendo composto principalmente da TYLCV (98% di identità con TYLCV-IL-[IT: Sic:04], Acc. No. DQ144621), contiene una piccola porzione con identità pari al 100% di TYLCSV-Sar-[IT: Sic:04] (Acc.No. GU951759). Mediante l’utilizzo del programma Plot Similarity, il *locus* di ricombinazione è stato identificato dal nucleotide 15 al nucleotide 146 (Figura 6).



**Figura 6** – Siti di ricombinazione di TY#23, localizzati mediante il programma Plot Similarity (sequenza di riferimento DQ144621)



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

La sequenza del nuovo ricombinante “TY#23” è stata quindi depositata in GenBank con il numero di accessione MF405078, denominato TYLCV-IL-[IT:Sic23:16].

### 6.2 MESSA A PUNTO DI UN NUOVO PROTOCOLLO PER L'INDIVIDUAZIONE DI MOLECOLE

#### RICOMBINATI

L'analisi effettuata mediante Vector NTI ha messo in evidenza come la prima digestione enzimatica, effettuata con *HindIII*, *NcoI*, *SacI* e *SphI*, permetta di discriminare sei isolati su 10 presi in esame (Tabella 7). In Figura 7 sono riportati i siti di taglio di ciascun enzima per ogni isolato oggetto di studio ottenuti mediante Vector NTI.

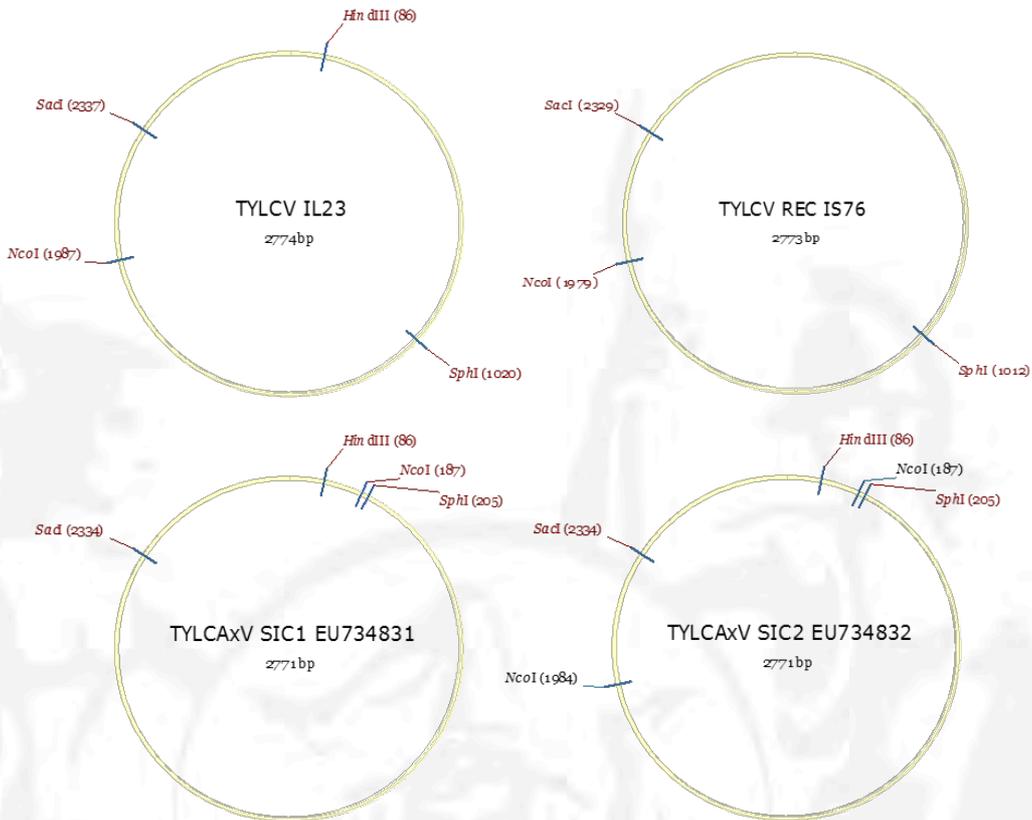
**Tabella 7** – Profili di restrizione ottenuti mediante digestione enzimatica con *HindIII*, *NcoI*, *SacI* e *SphI* (gli isolati in verde e rosso restituiscono lo stesso profilo di restrizione).

1° digestione enzimatica con <i>HindIII</i> , <i>NcoI</i> , <i>SacI</i> , <i>SphI</i>	
Isolato (Accession number)	Profilo di restrizione (bp)
TYLCV-IL23 (MF405078)	350+523+934+967
TYLCV-IS76 (LN812978)	350+1456+967
TYLCAxV-Sic1 (EU734831)	523+101+18+2129
TYLCAxV-Sic2 (EU734832)	350+523+101+18+1779
TYLCAxV (AY227892)	350+523+1395+504
TYLCMaIV (AF271234)	883+1899
TYLCV 8/4 (DQ144621)	350+1464+967
TYLCV MLD (X76319)	814+1009+967
TYLCSV-SAR (X61153)	529+100+18+2126
TYLCSV-SIC (Z28390)	647+2126
TYLCSV-ES (Z25751)	1395+1382



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

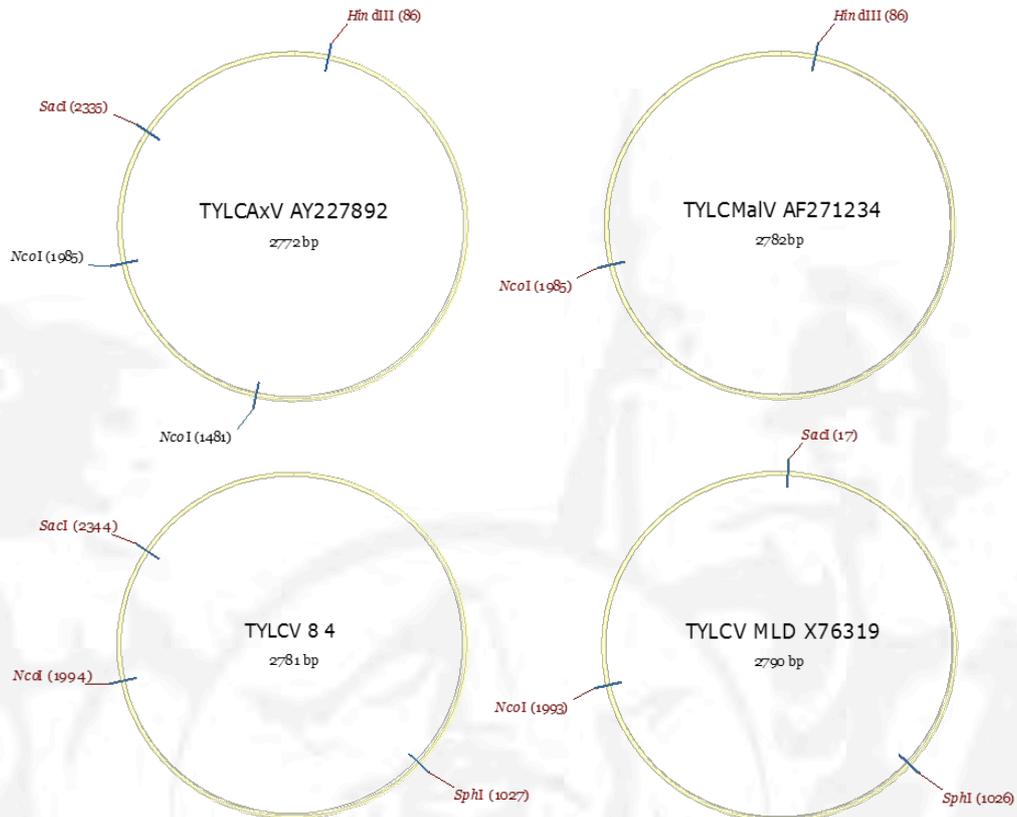
CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)





# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)





## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)



**Figura 7** – Siti di taglio della prima digestione enzimatica, per ogni isolato oggetto di studio, ottenuti mediante il programma Vector NTI.

Come mostrato precedentemente, mediante la prima digestione enzimatica si ottiene una netta distinzione tra i profili enzimatici dei diversi isolati di TYLC, ad eccezione delle coppie di isolati TYLCV-IS76/TYLCV 8/4 e TYLCxV-Sic1/ TYLCSV-SAR, le quali presentano gli stessi profili di restrizione. Per tale motivo si è proceduto con una seconda digestione enzimatica, specifica per ogni coppia, da effettuare in funzione dei risultati ottenuti. Nello specifico, per la coppia di isolati TYLCV-IS76/TYLCV 8/4 è stato selezionato l'enzima di restrizione *SaI*, il quale linearizza il TYLCV-IS76 in un unico frammento di 2773 bp, mentre non effettua nessun taglio su TYLCV 8/4 (Figura 8A); per la coppia di isolati TYLCxV-Sic1/ TYLCSV-SAR si è deciso di impiegare l'enzima *MfeI* (Figura 8B).

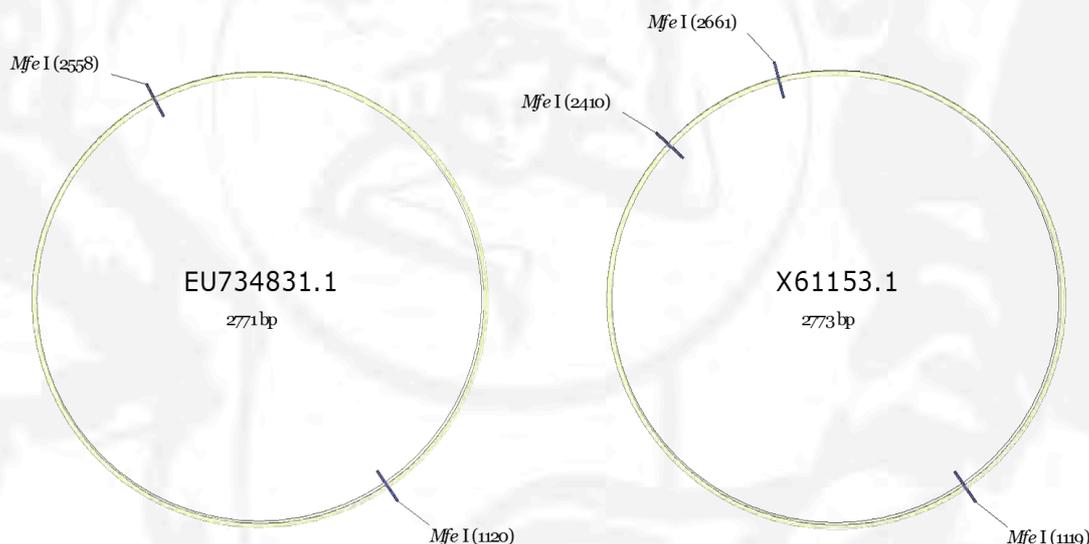


## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)



**Figura 8A** – Siti di taglio della seconda digestione enzimatica per la discriminazione della coppia di isolati TYLCV-IS76 (LN812978)/TYLCV 8/4 (DQ144621).



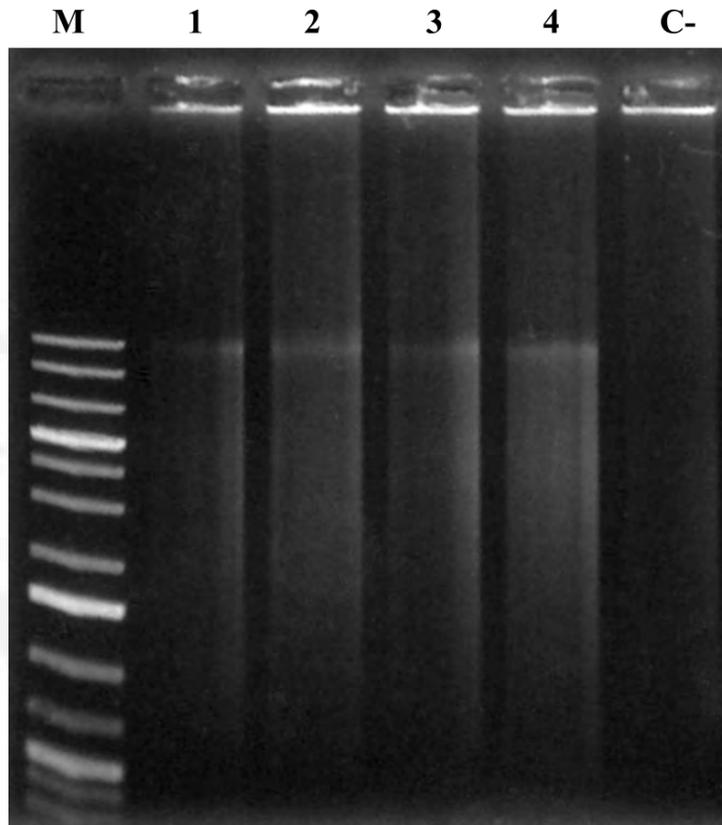
**Figura 8B** – Siti di taglio della seconda digestione enzimatica per la discriminazione della coppia di isolati TYLCAxV-Sic1 (EU734831)/TYLCSV-SAR (X61153).

Mediante la Rolling Circle Amplification è stata ottenuta l'intera molecola di DNA circolare dei diversi isolati di TYLCV presi in esame. Quindi, i prodotti ottenuti sono stati caricati su gel di agarosio e visualizzati mediante transilluminatore UV (Figura 9).



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)



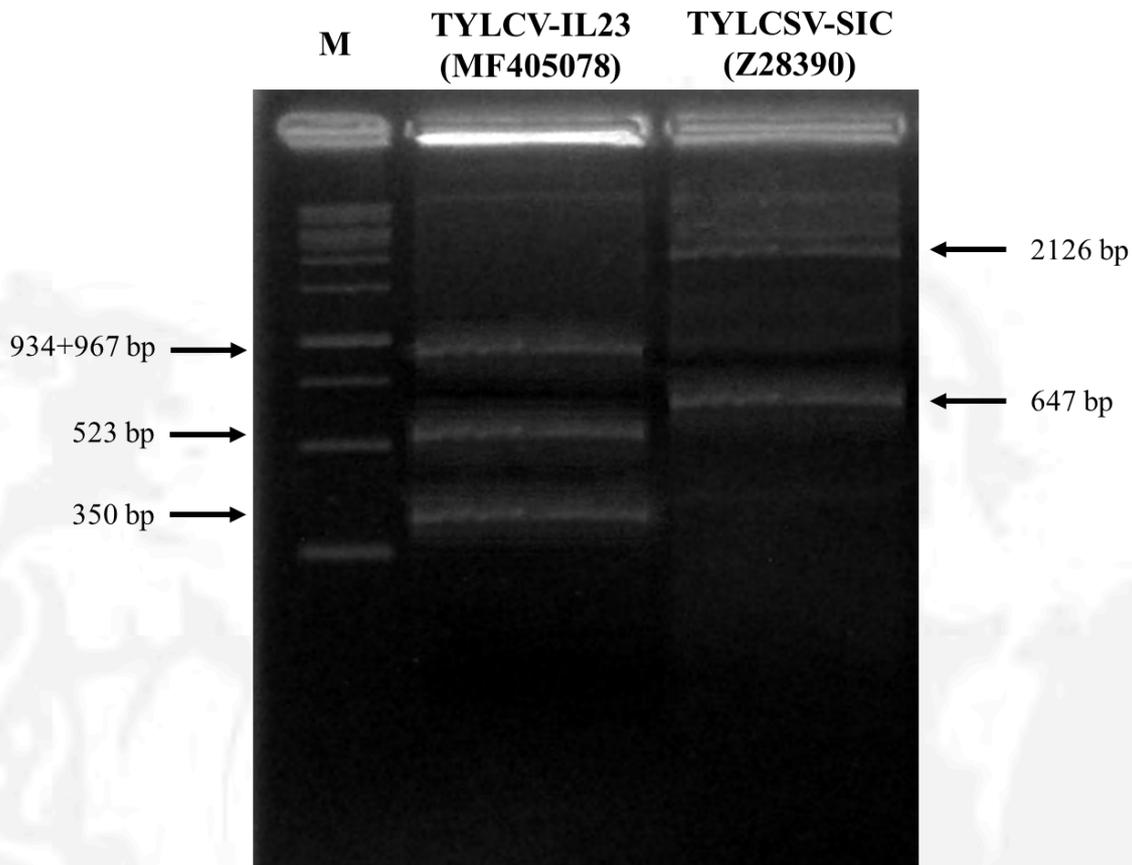
**Figura 9** – Gel di agarosio all'0,8% colorato con SybrSafe mostrandone alcuni prodotti della RCA ottenuti mediante TempliPhi Kit. M = Marker 1kb Plus Invitrogen; 1-4 = Prodotti della RCA; C- = Controllo negativo.

La prova *in vivo* ha confermato come il precedente studio *in silico*, effettuato mediante Vector NTI, permetta di distinguere i diversi isolati di TYLC, compresi i nuovi ricombinanti TYLCV-IS23 e TYLCV-IS76. In particolare, come mostrato in Figura 10, il profilo di restrizione dei diversi isolati corrisponde a ciò che è stato precedentemente ottenuto dallo studio *in silico* (Tabella 7). Anche la successiva digestione enzimatica con *SaII* o *MfeI*, nel caso in cui il profilo di restrizione ottenuto dalla prima non permette di distinguere in dettaglio l'isolato presente nel campione, permette l'identificazione del corretto isolato presente, confermando ulteriormente lo studio *in silico*.



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)



**Figura 10** – Gel di agaroso al 2% colorato con SybrSafe mostrante il prodotto della digestione enzimatica di TYLCV-IL23 (MF405078) e TYLCSV-SIC (Z28390); M = Marker 1Kb DNA Ladder Nippon Genetics.

### 6.3 COSTITUZIONE DI UN CLONE INFETTIVO E HOST RANGE

Il clone infettivo ottenuto attraverso il metodo esposto nel Capitolo 5 è stato utilizzato per studiare l'host range delle molecole ricombinanti di TYLC. Dai risultati ottenuti, mostrati in Tabella 8 si evince che l'unica specie sensibile alle infezioni da parte del nuovo ricombinante "TY#23" è il pomodoro, infatti, nessuna pianta di peperone e melanzana ha mostrato la comparsa dei sintomi tipici caratteristici delle infezioni da parte delle molecole ricombinanti, ne tantomeno le piante analizzate di peperone e melanzana hanno dato segnale positivo per PCR.

**Tabella 8** – risultati dell'agro-inoculazione con il clone infettivo.  
+ = presenza di sintomi; - = assenza di sintomi.



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

Specie	Tempo dopo l'inoculazione (settimane)								% piante infette
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>Solanum lycopersicum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	100%
<i>Capsicum annum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Solanum melongena</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

### CAPITOLO 7 – PUBBLICAZIONI

1. Panno S., Caruso A.G., Davino S., (2018). *The nucleotide sequence of a recombinant tomato yellow leaf curl virus strain frequently detected in Sicily isolated from tomato plants carrying the Ty-1 resistance gene*. Archives of Virology, 163(3), 795-797. DOI: 10.1007/s00705-017-3674-9.
2. Davino S., Panno S., Arrigo M., La Rocca M., Caruso A.G., Lo Bosco G., (2017). *Planthology: An Application System for Plant Diseases Management*. Chemical Engineering Transactions 58 – 2017 – ISBN 978-88-95608-52-5 – ISSN 2283 – 9216 – DOI: 10.3303/CET1758104.
3. Caruso A.G., Panno S. and Davino S., (2018). *Spread and stability of Tomato yellow leaf curl virus – IL23 in Sicily and partial displacement of its parental*. XXIV Convegno Nazionale SIPaV, 5-7 settembre 2018, Ancona, Atti del Convegno.
4. Davino S., Panno S., Parrella G., Davino M., Cocuzza G.E.M., Rapisarda C., Caruso A.G., Carpino C., Polizzi G., Vitale A. (2018). *Avversità del pomodoro – Virus e funghi terricoli*. Edizioni L'Informatore Agrario s.r.l. – ISBN: 978-88-7220-387-3.
5. Davino S., Panno S., Caruso A.G., (2018). Collana PhytoCard – I virus del pomodoro. Progetto supportato da Road to Quality (Assosementi – Associazione Italiana Sementi).



## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

### CAPITOLO 8 – DIVULGAZIONE SCIENTIFICA

Durante i due anni di svolgimento del progetto sono stati svolti i cicli di seminari previsti. Nello specifico sono stati organizzati 6 seminari, due a larga diffusione e 4 solo per le imprese agricole del territorio coinvolte nel monitoraggio. I seminari sono stati tenuti da docenti universitari, da esperti del settore e dal personale dei Servizi Fitosanitari Regionali. I temi discussi sono stati: i patogeni, la loro diffusione e le eventuali misure profilattiche da adottare e/o eventuali misure di lotta. Due seminari sono stati svolti alla conclusione del primo e secondo anno del progetto:

Il seminario sulla conclusione del primo anno si è svolto a Vittoria (RG) in data 23 Febbraio 2018. Ha riscosso un notevole successo, al quale hanno partecipato più di 250 tra operatori e tecnici del settore ortivo ed ha visto tra i relatori Professori di Patologia vegetale delle Università di Palermo e Catania e ricercatori del CNR (Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante), che hanno approfondito in maniera molto specifica e dettagliata tutti gli aspetti legati ai patogeni oggetto del progetto, con particolare riferimento alla gestione ed al controllo dei nuovi ricombinanti di TYLCV e TYLCSV.

Il secondo seminario si è svolto il 28 febbraio 2019 a Vittoria (RG). Hanno partecipato più di 400 persone, tra operatori e tecnici del settore ortivo. Il tema della giornata di incontro è stato: I Virus del pomodoro: la prevenzione è la miglior difesa.

Infine, nel corso di ciascun seminario è stato distribuito agli operatori del settore del materiale divulgativo, allo scopo di informare il più possibile sulla problematica in questione.

Durante gli anni di progetto sono state distribuite 12 schede fitopatologiche con il patrocinio di Assosementi.



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE SULLA INTERAZIONE TECNOLOGIA-AMBIENTE  
(C.I.R.I.T.A.)

## CAPITOLO 9 – RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- BELABESS Z., DALLOT S., EL-MONTASER S., GRANIER M., MAJDE M., TAHIRI A., BLENZER A., URBINO C., PETERSCHMITT M., 2015. *Monitoring the dynamics of emergence of a non-canonical recombinant of Tomato yellow leaf curl virus and displacement of its parental viruses in tomato*. *Virology*, 486: 291–306.
- DAVINO S., DAVINO M., ACCOTTO G. P. (2008). A single-tube PCR assay for detecting viruses and their recombinants that cause tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin. *Journal of Virological methods*. 141(1): 93-98.
- DAVINO S., PANNO S., ARRIGO M., LA ROCCA M., CARUSO A. G., LO BOSCO G., (2017). *Planthology: an application system for plant diseases management*. *Chemical Engineering Transactions* 58 – 2017 – ISBN 978-88-95608-52-5 – ISSN 2283 – 9216 – DOI: 10.3303/CET1758104.
- DEAN F.B., NELSON J.R., GIESLER T.L., LASKEN R.S., 2001. *Rapid amplification of plasmid and phage DNA using phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification*. *Genome research*, 11 (6): 1095-1099.
- FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, (2017). <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (accessed 07 May 2019).
- ISTAT (2018): <http://www.agri.istat.it>
- MOUNT D.W., 2007. *Using the basic local alignment search tool (BLAST)*. *Cold Spring Harbor Protocols*, pdb-top17.
- STANLEY J., (1995). Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology*. 206: 707-712.