Le virosi della patata

(PVY, PLRV, PVA, PVS, PVM, PVX)

Procedura di analisi dei tuberi-seme tramite saggio ELISA

Mauro Dal Prà, Cristian Gretter, Romana Bravi

Laboratorio CREA DC - Sede di Lonigo (VI)

dc.lonigo@crea.gov.it

Versione 1 -07/2023

A livello mondiale il virus del mosaico nervale, PVY (Potato Virus Y), e quello dell'accartocciamento fogliare della patata, Potato Leaf Roll Virus (PLRV), sono tra i più diffusi ed economicamente importanti ed interessano, principalmente, specie vegetali appartenenti alla famiglia delle solanacee. Nel caso della patata, le infezioni possono causare ingenti danni economici che interessano sia la qualità dei tuberi destinati al mercato fresco, sia i tuberi-seme destinati alla riproduzione. In caso d'infezioni precoci, sono state riportate perdite di prodotto fino all' 80%. Tali perdite sono causate sia dal numero che alle ridotte dimensioni dei tuberi per pianta. La gravità dell'infezione virale dipende da vari fattori, quali l'epoca in cui avviene l'infezione, il numero di piante infette, il ceppo virale e la varietà di patata coltivata. In generale la trasmissione delle virosi avviene per contatto di materiale infetto oppure tramite principalmente l'afide *Myzus persicae*, ad esclusione di PVX, in corrispondenza della comparsa delle forme alate dell'insetto. La fonte principale d' inoculo che causa il diffondersi della malattia in campo è comunque rappresentata dall'utilizzo di tuberi infetti che daranno origine a piante malate dalle quali il virus sarà trasmesso a quelle sane.

Virus dell'Accartocciamento Fogliare della patata – PLRV

L'agente dell'accartocciamento fogliare della patata, Potato Leaf Roll Virus (PLRV), è un virus ampiamente diffuso in tutto il mondo che può provocare gravi infezioni con un calo produttivo compreso tra il 50 e l'80%. Il sintomo tipico causato da PLRV consiste nel ripiegamento verso l'alto del margine fogliare, prevalentemente nelle foglie apicali della pianta. Le piante infette mostrano anche una colorazione verde meno intensa. Le piante nate da tuberi infetti (infezione secondaria) mostrano sintomi di accartocciamento sulle foglioline dei germogli che, col procedere dell'infezione, tendono ad assumere una colorazione rossastra e una consistenza coriacea. Le piante, inoltre, possono presentare una crescita stentata e un portamento eretto. I tuberi sono in genere asintomatici, tuttavia, in alcune varietà essi possono presentare una cosiddetta "necrosi a rete", costituita da piccoli elementi di tessuto scolorito che si estendono su tutto il germoglio dopo un mese di conservazione.

Virus del Mosaico Nervale – PVY

Il PVY possiede un'elevata propensione a ricombinarsi scambiando segmenti del suo genoma. Il PVY esiste in natura come complesso di ceppi e varianti genetiche (strains) caratterizzate e denominate sulla base della loro origine geografica, biologica, sierologica e sulle proprietà molecolari. Queste includono la forma "comune" del virus, PVY^{O}, che causa sintomi di mosaico sulle foglie di diversi ospiti e le forme PVY^{N} e PVY^{NTN} che portano alla formazione di macchie necrotiche su foglie e tuberi di patata. Il PVY^{NTN}, in particolare, provoca la formazione di lesioni necrotiche di forma anulare sui tuberi, che possono

estendersi alla polpa in alcune varietà particolarmente suscettibili; quest'ultima malattia è denominata Potato Tubers Necrotic Ringspot Disease (PTNRD). In generale, le varianti "necrotiche" tendono a causare sintomi più lievi rispetto al PVY^{O}.

Altri virus del mosaico

Altri virus del mosaico di importanza minore nella coltivazione della patata sono il Potato Virus X (PVX), il Potato Virus S (PVS), il Potato Virus M (PVM) e il Potato Virus A (PVA). Tra questi il più importante è il PVX che può arrecare perdite fino al 10% della resa produttiva. Gli altri virus presentano sintomi lievi e sono poco diffusi.

Coinfezioni

Un problema addizionale è dato dalla coinfezione di due o più virus nella stessa pianta. Infatti, la coinfezione di PVX e PVY, o di uno di essi (o entrambi) con PLRV o PVA, causa sintomi molto più severi che non l'infezione di ciascuno di questi virus preso separatamente.

Difesa

Risulta spesso difficile condurre una lotta mirata con insetticidi agli afidi vettori, dal momento che essi trasmettono il virus in modo non persistente e il meccanismo d'azione di un insetticida può risultare più lento rispetto alla rapidità con cui l'afide riesce a inoculare il virus a una pianta. Ad oggi il metodo più efficace per il contenimento della malattia è l'uso di tuberi-seme sani o con un grado d'infezione molto basso. Infine, è importante la conoscenza della suscettibilità e l'espressione dei sintomi nelle singole varietà di patata al fine di applicare efficaci di tecniche colturali in grado di ridurre i livelli d'infezione.

La normativa sementiera

Il Decreto Legislativo n. 20 del 02/02/2021, "Norme per la produzione a scopo di commercializzazione e la commercializzazione di prodotti sementieri in attuazione dell'articolo 11 della legge 4 ottobre 2019, n. 117, per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) 2016/2031 e del regolamento (UE) 2017/625" definisce i requisiti necessari che devono essere soddisfatti dai tuberi-seme di patata ai fini della commercializzazione relativamente alla presenza di Organismi Regolamentati Non da Quarantena (ORNQ). Secondo la vigente normativa i virus o i sintomi di virosi che affliggono i tuberi- seme di patata sono classificati come (ORNQ). Ai fini della certificazione ufficiale i requisiti richiesti per la presenza di virus o sintomi causati da virosi nella discendenza diretta dei tuberi-

seme di patata, sono indicati nella *Tabella 1*. Le soglie di tolleranza sono espresse in percentuale numerica di tuberi infetti su un campione rappresentativo.

Categoria e classe dei tuberi-seme	***Percentuale tollerata di virosi o sintomi causati da virosi nella discendenza diretta dei tuberi-seme***
Pre- base, classe PBTC	0%
Pre-base, classe PB	0,5%
Base, classe S	1%
Base, classe SE	2%
Base, classe E	4%
Certificata, classe A	8%
Certificata, classe B	10%

Tabella 1 – Soglie di tolleranza previste dalla normativa vigente, espresse come percentuali di tuberi infetti da virus.

Di norma nei campioni di tuberi-seme di patata di categoria certificata vengono ricercati soltanto i sintomi di virosi gravi (PVY e PLRV mentre, per la categoria pre-base e base vengono ricercati sia i sintomi di virosi gravi (PVY e PLRV) sia quelli di virosi lievi (PVX, PVM, PVS, PVA).
Le percentuali di infezione sono intese come somma delle percentuali di infezione di tutti i virus ricercati.

Gestione del materiale vegetale

Dimensione del campione di tuberi-seme

Vengono prelevati 120 tuberi dalla discendenza diretta dei tuberi-seme di patata

Pre-germogliamento dei tuberi-seme

Poiché la replicazione del virus avviene nelle parti verdi della pianta ed in particolar modo nei germogli, bisogna indurre il germogliamento dei tuberi-seme. Un rapido processo di germogliamento consente di contenere la durata dell'analisi. Al fine di superare la fase di dormienza vegetativa i tuberi vengono posti in cassette da ortofrutta da 40 litri di capacità e le cassette vengono stoccate per una settimana in cella fredda, ad una temperatura che può variare tra i 4 °C ed i 10°C. Le cassette vengono successivamente spostate in un altro locale dove vengono tenute a 25 °C al buio. Questa fase d' incubazione dura fino a quando si sono attivati gli occhi e i piccoli germogli hanno una dimensione che può variare tra 5 mm e

2 cm di lunghezza. Il periodo d'incubazione varia in base alla varietà di patata analizzata ed in base alla dormienza dei tuberi ed in genere supera le 6 settimane.

Crescita in serra

Al fine di ridurre lo spazio occupato in serra, i tuberi vengono ridotti di dimensione attraverso l'ottenimento di tasselli conici (Fig. 1) utilizzando un tassellatore automatico oppure manualmente con l'utilizzo della lama di un coltello o di uno scavino. I tasselli vengono realizzati in modo che il germoglio prescelto si trovi al centro del tassello, al fine di evitare la rottura del germoglio stesso. I tuberi tassellati vengono conservati nel caso si rendesse necessario ripetere l'analisi.
I tasselli vengono trattati con acido gibberellico, al fine di contrastare ogni eventuale effetto residuo della dormienza ed accelerare la crescita dei germogli. Il trattamento avviene immergendo i tasselli per 15' in una soluzione di acido gibberellico alla concentrazione di 1 ppm. I tasselli vengono successivamente lasciati asciugare all'aria per tutta la notte a temperatura ambiente.
Il giorno seguente vengono posti in serra, in seminiere di polistirolo o di plastica contenenti un mix di terriccio e sabbia (rapporto 3:2). Le condizioni ideali prevedono temperature che oscillano tra i 20°C ed i 25° C. Al fine di evitare contaminazioni incrociate tra i campioni di seme, nonché inquinamento da agenti esterni, sarà di fondamentale importanza, nel corso di tutte le operazioni svolte in serra, avvalersi di reti antiafidiche per prevenire il rischio che tali insetti possano trasferire i virus dai campioni infetti a quelli sani.

Prelevamento del materiale di analisi

Trascorso un periodo di 30 giorni circa, quando i germogli hanno raggiunto dimensioni comprese tra i 5 ed i 10 cm di lunghezza (Fig. 2), si procede al prelievo di una o più foglioline da ciascun germoglio, oppure, in assenza di foglioline, si spezza il germoglio al colletto. Il materiale vegetale viene posto separatamente, tubero per tubero, in bustine in polietilene per omogeneizzatori tipo Stomacher. Il prelevamento viene effettuato capovolgendo la bustina sul germoglio e recidendolo; al fine di evitare contaminazioni i germogli non vanno mai toccati con le mani. Al termine dell'operazione il materiale vegetale raccolto può essere posto immediatamente in analisi o conservato in freezer (- 20°C) per brevi periodi, in attesa di analisi successiva.

Figura 1 *– Tasselli conici ottenuti con un tassellatore automatico.*

Figura 2 *– Plantule in serra della dimensione di 5 – 10 cm, pronte per la fase successiva di campionamento.*

Analisi di laboratorio : il saggio ELISA

L' ELISA (*Enzyme -linked immunosorbent assay*) è un metodo di analisi immunoenzimatica.

Il metodo ELISA ha come fine il rilevamento e l'identificazione sia qualitativa che quantitativa di un sostanza specifica all'interno di un campione. Il test ELISA si basa sull'utilizzo di anticorpi marcati con un enzima, generalmente la perossidasi, in modo che i coniugati risultanti abbiano un'attività sia immunologica che enzimatica. Avendo uno dei componenti (antigene o anticorpo) adeso alla piastra, la reazione antigene-anticorpo è immobilizzata e pertanto potrà facilmente essere evidenziata con l'addizione del substrato che, reagendo con l'enzima, produrrà una colorazione osservabile a vista e quantificabile con lo spettrofotometro. Nel caso delle virosi della patata viene utilizzata una variante della tecnica, denominata Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-ELISA). Un primo anticorpo virus specifico viene fatto aderire al fondo dei pozzetti della piastra. Si esegue un lavaggio e in seguito si introducono i campioni di analisi. Nel caso dei campioni positivi, l'antigene si lega all'anticorpo. Si lava ulteriormente per togliere antigeni in eccesso o non legati. Il secondo anticorpo coniugato con la fosfatasi viene quindi aggiunto e si lega all'antigene immobilizzato, formando la caratteristica struttura a sandwich". L'aggiunta finale del substrato produrrà una colorazione osservabile a vista nei campioni positivi. L'utilizzo di un lettore automatizzato di piastre permette infine di distinguere i campioni colorati perché positivi da quelli colorati a causa del "rumore di fondo".

Sensibilizzazione delle piastre (Coating)

L'analisi avviene in piastre da 96 pozzetti per ELISA test, tipo Nunc-Maxisorp^{tm}. Su ogni piastra avviene la ricerca di un singolo virus. Quindi, nel caso di un campione di tuberi seme di categoria certificata servono 2 piastre: una sensibilizzata per PLRV, una per PVY. Per un campione di tuberi categoria pre-base e base servono 6 piastre (PLRV, PVY, PVA, PVS, PVM, PVX). Si indica sul bordo di ogni piastra

mediante pennarello indelebile: data, tipo di virus per cui viene sensibilizzata e codice del campione di analisi.

I kit contenenti gli anticorpi specifici per questo saggio sono facilmente reperibili sul mercato. Per la sensibilizzazione di 1 piastra si utilizzano 20 ml di tampone di sensibilizzazione (coating buffer) a T° ambiente, a cui va aggiunta la specifica IgG (gamma globulina) secondo il tipo di virus da determinare, nella diluizione di 1:200 (100 µl di IgG in 20 ml di Coating buffer per piastra). Si distribuiscono 200 µl di soluzione in ciascun pozzetto, mediante pipetta multicanale e puntali di plastica monouso (Fig. 3); si copre la piastra con l'apposita pellicola adesiva al fine di evitare l'evaporazione e si pone in frigo a 4°C per tutta la notte o a 37° C per 4 h.

Le piastre vengono poi lavate 4 volte con il tampone di lavaggio (washing buffer) a temperatura ambiente. L'operazione viene eseguita con un lavatore automatico di piastre ELISA (Fig. 4).

Figura 3 *– Sensibilizzazione delle piastre ELISA da 96 pozzetti. Il Coating buffer è distribuito con una pipetta multicanale.*

Figura 4 *– Lavatore di piastre automatizzato.*

Preparazione del campione

I tessuti vegetali vengono addizionati, all'interno delle bustine che li contengono, con il tampone di estrazione (Conjugate/Sample buffer) in un rapporto peso/volume di circa 1:20. Si procede quindi al pestaggio dei tessuti tramite l'utilizzo di un lab blender, quale ad esempio il BagMixer 400 CC (Interscience); particolare attenzione va posta allo scopo di evitare perdite di succo dovute a rottura dei sacchettini lungo i margini di saldatura (Fig. 5).

Ogni piastra viene utilizzata per saggiare 94 tuberi, i rimanenti 2 pozzetti sono destinati al testimone positivo ed al testimone negativo. Mediante pipetta monocanale e puntali in plastica monouso si prelevano 200 µl di succo di ogni germoglio/piantina testato, che vengono distribuiti nei singoli pozzetti della piastra secondo lo schema di riempimento prestabilito. Il testimone negativo e positivo (in genere

forniti dal produttore insieme agli anticorpi) vengono pipettati nel 95esimo e 96esimo pozzetto rispettivamente (posizioni G12 e H12). Al termine dell'operazione, la piastra è coperta con l'apposita pellicola adesiva e posta ad incubare in frigo a 4°C per tutta la notte.
Il giorno successivo si eseguono 4 lavaggi della piastra con washing buffer a temperatura ambiente, utilizzando il lavatore automatico.

Figura 5 *– Preparazione del campione. Omogeneizzazione dei tessuti. Principi del metodo.*

Applicazione del coniugato anticorpo/fosfatasi alcalina

Il tampone di coniugazione (Conjugate/Sample buffer) a temperatura ambiente viene addizionato con il coniugato anticorpo/fosfatasi alcalina specifico per il virus in questione, secondo il rapporto di diluizione 1:200 (100 µl di coniugato in 20 ml di Conjugate/Sample buffer per piastra). Si distribuiscono 200 µl di soluzione per pozzetto mediante pipetta multicanale e puntali monouso. Al termine dell'operazione, la piastra è coperta con l'apposita pellicola adesiva e posta ad incubare 4 h a 37° C. Le piastre vengono poi lavate 4 volte con il tampone di lavaggio (washing buffer) a temperatura ambiente. L'operazione viene eseguita sempre con il lavatore automatico di piastre ELISA.

Saggio enzimatico

Immediatamente prima dell'utilizzo, si discioglie il 4-nitrofenil-fosfato alla concentrazione di 1 mg/ml in tampone substrato (substrate buffer 1x). Si preparano 20 ml di soluzione per ciascuna piastra. Si distribuiscono 200 µl di soluzione per pozzetto mediante pipetta multicanale e puntali monouso. Al termine dell'operazione, la piastra è coperta con l'apposita pellicola adesiva e posta ad incubare a temperatura ambiente al buio. La reazione colorimetrica viene lasciata sviluppare per un periodo compreso tra i 30 minuti e le 2 ore (Fig. 6).

Si effettua la lettura dei valori di assorbanza dei singoli pozzetti della piastra mediante un lettore di piastre ELISA a 405 nm (Fig. 7).

La positività o negatività di ogni singolo pozzetto viene determinata confrontando il valore di OD ottenuto per quel pozzetto con il valore soglia (threshold). Per valori di assorbanza superiori o uguali al valore soglia , il campione viene considerato sicuramente positivo. Per calcolare il valore di soglia è necessario preparare una o più piastre contenenti unicamente campioni negativi. Il valore di soglia si ottiene calcolando la media dei valori dei risultati e sommando il triplo della deviazione standard.

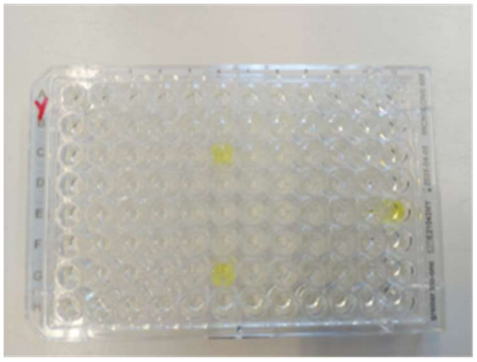

Figura 6 *–Reazione colorimetrica dopo 30 minuti di sviluppo.*

Figura 7 *–Lettore di piastre ELISA.*

Interpretazione dei risultati

L'incidenza di ogni virosi per campione è calcolata come percentuale di tuberi infetti sui 94 totali esaminati. Alla fine viene calcolata la percentuale totale di tuberi infetti da una qualsiasi delle virosi prese in esame durante l'analisi. Un campione viene ritenuto non idoneo alla certificazione, quando il numero di tuberi infetti supera il valore percentuale indicato dalle attuali disposizioni legislative per la corrispondente categoria.

Principali strumenti e materiale di laboratorio occorrenti

Bilancia analitica con sensibilità di 0,001 g
Micropipetta monocanale a volume 20-200 µl con relativi puntali non sterili
Micropipetta multicanale a volume 20-200 µl con relativi puntali non sterili
Deionizzatore/distillatore acqua
Frigorifero a 4°C
Stufa a 37°C
Phmetro
Agitatore magnetico
Lavatore automatico piastre
Lettore di piastre Elisa con filtro per lettura OD a 405 nm
Cappa chimica da laboratorio
Lab Blender tipo Stomacher o BagMixer
Campioni positivi di riferimento
Campioni negativi di riferimento
Becher di volume 1 L e bottiglie Schott DuranTM da 1 L
Pipettatore automatico
Tassellatore meccanico
Bustine in polietilene per omogeneizzatori tipo Stomacher

Norme di laboratorio

Sarà necessario provvedere alla disinfezione di tutte le superfici di lavoro e degli strumenti utilizzati tramite etanolo al 70% o ipoclorito al 1%, sia prima che dopo la manipolazione dei campioni. Non è invece necessario sterilizzare vetreria e soluzioni. Sarà sufficiente utilizzare acqua bidistillata. Le soluzioni, che non contengono NaN3, vanno preparate in giornata, mantenute in frigo a 4°C fino al momento dell'utilizzo e sostituite dopo 3 giorni se non sono ancora state consumate completamente.
In alternativa le soluzioni possono essere congelate a -20°C per essere conservate più a lungo. Le soluzioni contengono sostanze chimiche pericolose per l'operatore, quali dietanolamina e polivinilpirrolidone. E' importante quindi utilizzare i guanti, mascherina FPP2 e cappa chimica durante la preparazione delle soluzioni.

COMPOSIZIONE BUFFERS

PBS (1x) pH 7.4 / 1000 ml

in acqua distillata:

NaCl	8,0 gr
KH_2PO_4	0,2 gr
Na_2HPO_4	2,9 gr
KCl	0,2 gr

COATING BUFFER pH 9.6 / 1000 ml

in acqua distillata:

Na_2CO_3	1,59 gr
$NaHCO_3$	2,93 gr

WASHING BUFFER pH 7.4 / 1000 ml

in PBS 1x:

Tween 20	0,5 ml

EXTRACTION BUFFER pH 7.4 / 1000 ml
specifico per tuberi e germogli di patata

in PBS 1x:

PVP (polivinilpirrolidone) K 10 – K 40	20,0 gr
Albumina di siero bovino	2,0 gr
Tween 20	0,5 ml

CONJUGATE BUFFER pH 7.4 / 1000 ml

in PBS 1x:

PVP (polivinilpirrolidone) K 10 – K 40	20,0 gr
Albumina di siero bovino	2,0 gr
Tween 20	0,5 ml

SUBSTRATE BUFFER pH 9.8 / 1000 ml

in acqua distillata - pH calibrato con HCl

Dietanolamina	97,0 ml

1 mg/ml di 4-nitrofenil-fosfato va aggiunto al substrate buffer immediatamente prima dell'uso.

Bibliografia

Accartocciamento fogliare della patata: Potato Leafroll Virus, PLRV. https://www.citteriopatate.it/wp-citterio/wp-content/uploads/2018/12/3.1-Accartocciamento.pdf

Abd El-Aziz MH. 2020. The Importance of Potato virus Y Potyvirus. *J Plant Sci Phytopathol*. 4: 009-015.

APAT - Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici (2006) – Quaderno Agronomico della Patata

Della Bartola, M.; Byrne, S. and Mullins, E. 2020. Characterization of Potato Virus Y Isolates and Assessment of Nanopore Sequencing to Detect and Genotype Potato Viruses. *Viruses*, 12(4), 478. https://doi.org/10.3390/v12040478

Dupuis, B. 2017. The movement of potato virus Y (PVY) in the vascular system of potato plants. *Eur J Plant Pathol* 147, 365–373. https://doi.org/10.1007/s10658-016-1008-5

Johnson, S.B. Potato diseases caused by PVY and PLRV. Bulletin 2492. Extension University of Maine

Potato virus A (PVA): http://ephytia.inra.fr/en/C/21039/Potato-Potato-virus-A-PVA

Potato virus M: http://frenchseedpotato.com/index/potato-virus-m

Potato Viruses: https://ipm.cahnr.uconn.edu/potato-viruses/

PVX, mosaico latente della patata (virus X della patata): https://www.agripat.it/info-tecniche/pvx-mosaico-latente-della-patata-virus-x-della-patata/

Virus X della Patata: https://fitogest.imagelinenetwork.com/it/malattie-piante/malattie-parassiti/virus-e-virosi/virus-e-virosi/virus-x-della-patata/2628