

Le proteine codificate dai virus possono essere distinte in:

- proteine strutturali, componenti essenziali del capsido e per l'assemblaggio dell'acido nucleico virale
- proteine strutturali, con funzioni specifiche relative alla replicazione dell'acido nucleico.

Se le proteine vengono codificate ma c'è un eccesso allora vengono stipate nei corpi d'inclusione. Il capsido è formato da poche proteine ripetute molte volte. Queste sub-unità si aggregano secondo una specifica simmetria, cubica (particelle sferiche), elicoidale (particelle tubolari) o con una struttura complessa.

La modalità con cui le subunità proteiche si associano fra loro nel capsido determina la struttura quaternaria di una particella virale.

I virus utilizzano pochissimi tipi di subunità ripetuti perché:

- permette di avere un genoma più corto
- riduce la possibilità di errore nella sintesi delle molecole proteiche
- il danneggiamento di una subunità raramente distrugge l'infettività di una cellula.

Le proteine strutturali sono caratterizzate da regioni a carattere globulare detti domini, hanno inoltre segmenti detti bracci o giunture, utili per interagire con altre catene peptidiche.

Nei fitovirus le molecole di RNA sono sempre lineari, mentre quelle di DNA sono sempre circolari. L'informazione genetica può essere racchiusa in un'unica molecola (genoma monopartito) di acido nucleico oppure ripartita in più molecole (genoma multipartito).

L'RNA virale che funge direttamente da messaggero è detto di polarità o di senso positivo. Al contrario le molecole di RNA o di DNA con la sequenza complementare a quella dell'RNA che funge da messaggero sono dette di polarità o di senso negativo.

La trascrizione dell'mRNA è catalizzata da un'enzima (RNA trascrittasi) contenuto nel rivestimento proteico di questi virus.

Inoltre il corredo genetico può essere suddiviso in più particelle, dando vita ai virus multicomponenti. In questo caso è interessante notare come avvenga il fenomeno della pseudoricombinazione genetica. Gli mRNA presentano all'estremità 5':

- un cappuccio o cap, costituito da un residuo di metilguanosa
- una proteina di origine virale (Vpg), unita all'RNA mediante un legame covalente.

All'estremità 3' presentano:

- una sequenza poliadenilica o coda poli(A)
- una sequenza ripiegata simile alla struttura a trifoglio tipica degli RNA di trasferimento
- un gruppo -OH sulla molecola di ribosio senza strutture particolari.

Sequenza leader: AUG. Specifica l'inizio della sintesi proteica. In aggiunta, si può trovare una regione conosciuta come IRES (sito d'entrata dei ribosomi) alla quale si attacca direttamente la subunità ribosomiale.

Il corredo genetico comprende geni precoci, espressi all'inizio del ciclo infettivo, geni precoci differiti e geni tardivi, che sono espressi successivamente. Il gene viene espresso quindi solo quando è necessario.

- RNA polimerasi che catalizza l'unione di un residuo nucleotidico al successivo sullo stampo di una catena di RNA
- elicasi, enzima che rompe la doppia elica di RNA formata in fase di replicazione

- RNA trascrittasi, enzima incorporato nelle particelle virali dei virus con RNA di senso negativo o con dsRNA
- proteasi, enzima che scinde la poliproteina in corrispondenza di determinati amminoacidi
- proteina del capsido
- proteina di movimento, capaci di legarsi agli acidi nucleici, di stabilire interazioni idrofobe con il sistema di membrane della cellula e di incrementare il limite di esclusione molecolare dei plasmodesmi facilitando il passaggio intercellulare dell'RNA virale
- proteina per la trasmissione mediante vettori.

Il ciclo dei fitovirus con RNA positivo a singola elica si può suddividere in una serie di fasi:

- 1) ingresso del virus nella cellula, i fitovirus devono entrare direttamente in contatto con il protoplasma cellulare in quanto non sono in grado di attraversare la cuticola che riveste le parti aeree delle piante e la parete cellulare
- 2) decapsidazione e traduzione di geni precoci che esprimono proteine funzionali, proteine che catalizzano la trascrizione, replicazione del genoma virale
- 3) replicazione (trascrizione) del genoma virale, dopo aver codificato la sintesi di proteine della replicazione, dirige la sintesi di nuovi filamenti di RNA con la partecipazione di un complesso enzimatico di RNA replicasi. Dapprima si forma una doppia elica complementare al genoma, successivamente i filamenti si distaccano dando vita ad un secondo ciclo di replicazione, creando così molteplici copie dell'RNA di partenza
- 4) traduzione di geni tardivi che esprimono altre proteine funzionali e una o più proteine strutturali
- 5) assemblaggio delle particelle virali, avviene l'associazione fra i filamenti di RNA genomico e le molecole proteiche del capsido formando particelle virali complete. Il numero di particelle prodotte per cellula varia di molto a seconda del virus e dell'ospite. TMV produce da 1 a 10 milioni di particelle virali per cellula.
- 6) diffusione nell'ospite
- 7) trasmissione dell'infezione da pianta a pianta

Meccanismi di traduzione degli RNA virali

i ribosomi delle cellule eucariotiche preferiscono mRNA monocistronici, gli mRNA virali sono generalmente policistronici, ovvero una molecola di mRNA contiene l'informazione per proteine diverse. Per adattarsi al sistema di produzione delle proteine delle cellule eucariotiche e per la regolazione genica, i fitovirus hanno sviluppato diversi meccanismi che utilizzano singolarmente o in combinazione:

- formazione di un mRNA subgenomico
- sintesi di una poliproteina
- inizio della traduzione del secondo codone AUG
- scorrimento del modulo di lettura dei ribosomi in corrispondenza di una sequenza di STOP
- suddivisione del genoma in diversi segmenti di RNA
- soppressione saltuaria del codone di arresto
- collegamento dei ribosomi all'interno della catena mRNA, in corrispondenza degli IRES
- scorrimento discontinuo dei ribosomi.

Le proteine di movimento sono riunite in 6 superfamiglie:

1. proteine affini alla proteina di movimento di TMV

2. proteine codificate dal blocco trigenico
3. proteine dei tymovirus
4. proteine codificate dal blocco bigenico
5. proteine analoghe a quelle da shock termico (Hsp: heat shock protein)
6. proteine degli umbravirus

Hanno la funzione di regolare il trasferimento di virioni o dell'acido nucleico virale da cellula a cellula e a lunga distanza attraverso il tessuto vascolare. Le proteine di movimento hanno la capacità di legarsi agli acidi nucleici, stabilire interazioni con le endomembrane della cellula e di incrementare il limite di esclusione molecolare dei plasmodesmi.

Il trasferimento da cellula a cellula può avvenire attraverso i plasmodesmi oppure attraverso strutture tubolari, costituite dalla proteina di movimento, che si estendono tra le cellule contigue.

Il legame tra RNA virale e proteina di movimento è aspecifico, mentre quest'ultima per il trasporto intra- ed intercellulare dell'RNA virale deve interagire con specifici componenti del citoscheletro, del reticolo endoplasmatico e dei plasmodesmi della cellula infetta e quindi, se mancano queste interazioni, non è in grado di svolgere questa funzione di trasporto.

Il trasferimento a lunga distanza attraverso i tubi cribrosi avviene attraverso questi passaggi: mesofillo -> guaina del fascio -> parenchima -> cellule compagne -> tubi cribrosi
guaina del fascio+parenchima=libro

il caricamento dei fotoassimilati nei tubi cribrosi si può compiere mediante due vie:

- via del simplasto, tramite i plasmodesmi
- via dell'apoplasto, tramite lo spazio intercellulare e in ultima istanza attraverso la membrana plasmatica delle cellule compagne. Quest'ultima modalità di caricamento avviene mediante un meccanismo attivo.

Il passaggio di un virus o del suo acido nucleico dalle cellule parenchimatriche ai tubi cribrosi avviene attraverso la via del simplasto.

Il movimento dei virus attraverso le cellule conduttrici dello xilema avviene seguendo la via dell'apoplasto, a differenza del movimento a lunga distanza tramite i tubi cribrosi che avviene seguendo la via simplastica.

La trasmissione di un virus può essere:

- verticale, il virus passa direttamente da una pianta infetta alla sua progenie tramite il seme o il materiale di propagazione vegetativa
- orizzontale, l'infezione interessa una pianta originariamente sana.

Trasmissione per contatto

avviene tramite microlesioni dei tessuti superficiali della parte epigea o ipogea della pianta. È una trasmissione comune solo a pochi virus. Per contatto diretto quando una pianta sana viene a contatto con una infetta, e la trasmissione avviene tramite lesioni e rottura di tricomi dovuta allo sfregamento delle foglie, oppure per contatto indiretto, ovvero attraverso le ferite provocate da certe operazioni colturali.

Trasmissione per propagazione vegetativa

la propagazione di una pianta infetta da virus mediante un suo organo vegetativo o una sua porzione é in grado di dare luogo a un nuovo individuo infetto. Questa trasmissione costituisce una sorgente d'inoculo precoce all'interno del semenzaio o di una coltivazione, che consente successivamente tramite vettori oppure per contatto la diffusione del virus.

Trasmissione per seme

circa 120 di virus vegetali si trasmettono attraverso il seme. I virus possono trovarsi nell'embrione oppure restare circoscritti al tegumento seminale (trasmissione embrionale), o trattenuti sulla superficie del seme (trasmissione non embrionale).

Nel caso di una trasmissione non embrionale la trasmissione avviene per seme-contatto, ovvero quando i cotiledoni sfregano contro i tessuti di rivestimento di un seme contaminato.

Trasmissione per polline

questo tipo di trasmissione si verifica quando le particelle virali trasportate dai granuli pollinici si diffondono ai tessuti della pianta portatrice dei fiori impollinati.

Trasmissione accertata per una decina di virus.

Agenti subvirali

costituiti da una molecola di RNA, con una organizzazione piú semplice di quella dei virus:

- i viroidi, che utilizzano le funzioni biologiche della cellula ospite per la replicazione e la diffusione nei tessuti delle piante. Sono molecole di RNA circolare a singolo filamento a basso peso molecolare. L'RNA é privo di griglie di lettura funzionali e pertanto non agisce da messaggero. Nella sequenza nucleotidica vi sono regioni autocomplementari che determinano il ripiegamento dell'RNA in una struttura secondaria, in grado di partecipare direttamente a funzioni del viroide e di interagire con fattori dell'ospite. Non hanno rivestimento proteico, e si replicano nel nucleo o nei cloroplasti. Utilizzano per la replicazione una polimerasi dell'ospite. L'RNA presenta un modulo altamente conservato, chiamato regione centrale conservata (CCR). La replicazione avviene attraverso la via detta circolo rotante (rolling circle) che si esplica mediante due modalit : simmetrica o asimmetrica. Quest'ultima modalit  dipende se l'RNA viroideale sia dotato o meno di attivit  catalitica. Si svolge secondo tre tappe fondamentali:
 - RNA polimerizzazione, enzima RNA polimerasi
 - scissione dei filamenti di RNA, enzima RNasi
 - ligazione delle estremit , enzima RNA ligasi

Un viroide si muove da una cellula ad un'altra attraverso i plasmodesmi, mentre a distanza utilizza il canale floematico. É in grado di legarsi alle proteine istoniche, di competere o interferire con il sistema di elaborazione degli acidi nucleici dell'ospite e di regolare l'espressione di alcuni geni. Pu  indurre attivit  enzimatiche, fosforilazione di proteine o la metilazione di sequenze specifiche, dando il via ad una cascata di eventi che porta ad una risposta patogenetica da parte dell'ospite. La trasmissione avviene per contatto, per seme, polline e per vettori

- i satelliti, i quali dipendono dalla polimerasi di un virus specifico per la replicazione (virus helper).

I satelliti sono corte molecole di RNA a filamento singolo che si replicano soltanto in cellule infettate da un virus specifico, denominato virus helper, che fornisce le proteine necessarie per

la loro replicazione. I satelliti sono parassiti molecolari del virus helper e competono con il suo RNA per la replicazione. Si suddividono in due classi: virus satelliti e acidi nucleici satelliti. I virus satelliti hanno il genoma che codifica per la propria proteina capsidica, mentre necessitano delle proteine codificate dal virus helper per la loro replicazione. La presenza di un virus satellite solitamente riduce la concentrazione del suo virus helper nei tessuti dell'ospite, per competizione fra i due tipi di RNA. Solo in alcuni casi si registrano variazioni sull'espressione sintomatologica. Gli RNA satelliti si differenziano dai virus satelliti in quanto non codificano le proteine per la loro replicazione e nemmeno quelle per il proprio capsido. Sono racchiusi in un involucro formato da subunità proteiche codificate dal virus helper. Gli RNA satelliti che attenuano l'intensità dei sintomi provocati dal virus helper (benigni) possono essere utilizzati per limitare i danni causati da ceppi virulenti dello stesso virus helper. Si usano due strategie: preimmunizzazione e piante transgeniche. La preimmunizzazione consiste nell'inoculazione meccanica delle piantine da proteggere.

Citopatologia

ovvero le modificazioni osservabili nelle cellule dei tessuti vegetali risultanti dalle infezioni virali. La prima firma di un virus sono strutture note come corpi d'inclusione, che contengono le proteine strutturali e non strutturali codificate dal genoma virale.

I corpi d'inclusione possono trovarsi nel nucleo o nel citoplasma.

La replicazione dei virus necessita di membrane sulle quali si aggancia il complesso enzimatico polimerasico. I siti di sintesi sono vescicole di piccole dimensioni, isolate, in piccoli gruppi o ammassate a formare accumuli.

Le proteine strutturali, quelle che formano il capsido virale, vengono sintetizzate nel citoplasma. Le proteine strutturali possono accumularsi intracellularmente dando origine ad inclusi di grande valenza diagnostica.

Identificazione dei virus

Sierologia

alla base della sierologia vi è l'interazione tra una proteina chiamata antigene e gli anticorpi prodotti contro quella stessa proteina dal sistema immunitario dei vertebrati. Di ciascun antigene solo alcune regioni specifiche si combinano con gli anticorpi, queste regioni sono chiamate epitopi o determinanti antigenici. Agli anticorpi viene dato il nome generico di immunoglobine (Ig).

Per la preparazione di un antisiero l'animale deve essere immunizzato con iniezioni di preparati di particelle virali altamente puri. Possono essere preparati due tipi di antisieri:

- policlonali che contengono anticorpi contro tutti i possibili epitopi dell'antigene. Questi antisieri non riescono a discriminare due ceppi virali molto simili fra loro.
- monoclonali prodotti con un solo tipo di epitopo. Questi antisieri sono altamente specifici e questa è la loro principale limitazione. La preparazione avviene attraverso la fusione dei linfociti B estratti dalla milza di un animale immunizzato con il virus prescelto con cellule di mieloma di topo, un tipo di cellule tumorali. Tra i vari prodotti della fusione, denominati ibridomi, si selezionano quelli che producono linee di anticorpi in grado di riconoscere epitopi diversi fra loro.

Per rilevare la combinazione tra antigene e anticorpo esistono tre metodi principali:

1. osservando la formazione di un precipitato
2. per osservazione diretta al microscopio elettronico

- mediante reazione enzimatica, si sfrutta un anticorpo coniugato da un enzima capace di produrre il viraggio di colore di un opportuno substrato. Diretto se si sfrutta un singolo anticorpo coniugato, indiretto se ad un primo anticorpo viene utilizzato un secondo anticorpo coniugato (ELISA indiretta o sandwich). L'intensità del colore che si ottiene dopo il viraggio dipende dalla concentrazione dell'antigene che può essere misurata con appositi spettrofotometri.

Per virus con basso potere immuogeno o di cui è difficile ottenere preparati purificati, si utilizzano metodi basati sulle proprietà dell'acido nucleico.

I metodi diretti utilizzano le informazioni fornite dall'acido nucleico. I profili elettroforetici delle molecole di RNA a doppio filamento estratti dai tessuti infetti e separati e rilevati mediante elettroforesi sono un esempio di metodo diretto. I metodi indiretti permettono la diagnosi in base alle proprietà del DNA ricombinante e all'ibridazione molecolare. L'ibridazione molecolare consiste nel riconoscimento specifico fra sequenze complementari che porta alla formazione di un filamento bcatenario stabile, denominato ibrido. Le sequenze complementari sono quelle di una sonda nucleica o di un primer e una molecola bersaglio. Le sonde nucleiche sono frammenti di acido nucleico recanti un marcatore, che consentono di identificare in un pool di molecole di acido nucleico la presenza di sequenze ad esse complementari.

Il DNA è amplificato da reazioni a catena della DNA-polimerasi. Dopo ogni turno di amplificazione, il DNA è quantificato. I metodi comuni di quantificazione includono l'uso delle colorazioni fluorescenti che intercalano con il DNA doppio-filamento (ds) e gli oligonucleotidi modificati del DNA (denominati sonde) che sono fluorescenti una volta ibridati con un DNA. Spesso la PCR real-time è combinata con la PCR Retro Trascrizionale (RT-PCR) per quantificare i livelli di espressione di specifici RNA: la retro-trascrizione (o trascrizione inversa) produce del DNA complementare a singolo filamento detto cDNA (complementary DNA) mantenendo inalterati i rapporti relativi di concentrazione delle diverse specie degli RNA. In questo modo è possibile, ad esempio, misurare l'espressione relativa di un gene ad un tempo particolare, o in una cellula o in un tipo particolare di tessuto. La combinazione di queste due tecniche è spesso denominata RT-PCR quantitativa.

La marcatura può essere effettuata:

- intercalanti fluorescenti, ovvero molecole che si insinuano in qualche modo nella doppia elica di DNA e donano una colorazione visibile in fluorescenza
- sonde fluorescenti, ovvero costrutti oligonucleotidici sintetici in grado di donare selettivamente la fluorescenza ai segmenti amplificati.

Difesa

nelle piante difficile la lotta ai virus perché non reagiscono all'infezione con una risposta immunitaria. Per questo una pianta infettata da un virus è destinata a morire oppure a rimanere infetta per il resto dei suoi giorni.

La resistenza genetica appare come la misura più promettente in termini di risultati e di durata. Le piante hanno due principali meccanismi definibili come attivi e passivi. Un soggetto può essere attivamente resistente perché è dotato di barriere fisiche che impediscono al vettore di inoculare il virus oppure produce inibitori che interferiscono con il ciclo replicativo del patogeno. Questo tipo di resistenza è dominante. Una pianta che resiste passivamente è invece caratterizzata dalla mancanza di specifici componenti necessari al virus per la sua replicazione, oppure li possiede in forma mutata e pertanto inutilizzabili.

Schematizzando i meccanismi di resistenza possono classificarsi in tre categorie:

1. immunità in cui il virus non si replica all'interno della pianta
2. resistenza costitutiva o innata, conferita dai geni dell'ospite, questa resistenza viene detta anche ereditabile. Si può esprimere sotto varie forme: resistenza ai vettori, alla trasmissione con vettori o seme, inibizione del movimento inter- e intracellulare e ridotta manifestazione di sintomi
3. resistenza acquisita derivante dalla preventiva esposizione di una pianta suscettibile a fattori che limitano la moltiplicazione del patogeno.

I ceppi virali che vengono tenuti sotto controllo sono definiti avirulenti nei confronti dell'ospite. Al contrario troviamo ceppi virali virulenti.

Protezione incrociata

consiste nel pre-inoculare una pianta con ceppi attenuati di un virus o di un RNA satellite per proteggerla dalle infezioni di ceppi virulenti dei medesimi agenti.

Ha avuto il pregio di suggerire l'uso di geni virali per la trasformazione di piante da rendere resistenti al donatore dei geni stessi. Questa è la resistenza derivata dal patogeno (PDR). Costituita da sequenze nucleotidiche isolate dal genoma del patogeno, clonate e trasferite stabilmente nel genoma dell'ospite.

Come sono costituiti i costrutti (pacchetto di geni da trasferire)?

- Promotori, più usato RNA 35S di CaMV, che comandano l'espressione del gene trasferito nell'ospite
- Geni marcatori
- Transgeni, sono utilizzati sia geni virali, codificanti e non codificanti, e geni esogeni di varia natura.

La resistenza si esplica in varie forme. Può interferire direttamente nelle fasi iniziali dell'infezione virale o con la sua diffusione locale o sistemica, ovvero con la replicazione del patogeno.

La resistenza mediata da RNA si esplica attraverso il silenziamento genico post-trascrizionale (PTGS). Le piante si difendono dalle infezioni virali inattivando l'RNA del patogeno attraverso un processo di degradazione sequenza-specifico. Nelle piante trasformate un aumento della concentrazione degli RNA citoplasmatici dovuto alla presenza contemporanea dei trascritti del transgene e dell'RNA del virus scatenerebbe il meccanismo di degradazione dell'RNA.

Protezione incrociata

è una forma di resistenza indotta nella pianta dall'infezione sistemica o da un isolato o ceppo virale contro l'infezione successiva da un altro isolato o ceppo dello stesso virus. Dei due virus coinvolti quello inoculato per primo, che innesca il meccanismo di protezione, è detto protettore, mentre il secondo è detto sfidante. Di regola l'isolato inoculato per primo deve indurre sintomi attenuati.

Questa resistenza viene anche detta preimmunità. Perché avviene la protezione?

1. Nutrizionale, il primo virus termina tutte le risorse indispensabili per il secondo virus presenti nel citoplasma
2. siti di replicazione, sarebbero presenti in un numero limitato e sarebbero occupati dal primo virus
3. capside virale, viene impedita la decapsidazione del secondo virus.

In realtà probabilmente sfrutta anch'essa il silenziamento genico. In alcuni casi si inoculano piante poco dopo l'emergenza con una variante lieve del virus, prima che sopraggiunga l'infezione di quest'ultimo. Gli isolati virali devono rispondere alle seguenti caratteristiche:

- indurri sintomi lievi
- causare infezione sistemica e diffondersi in tutti i tessuti
- essere geneticamente stabili
- non essere facilmente trasmissibili tramite vettori
- fornire protezione contro un gruppo di virus più ampio possibile
- prestarsi facilmente alla inoculazione, da fornire agli agricoltori.

Per l'inoculazione massale delle piante sono state sperimentate varie tecniche:

- inoculazione manuale per strofinamento delle piante in emergenza in pieno campo
- lieve strofinamento delle piante in vaso tramite rulli e nastro trasportatore
- inoculazione con pistola a pressione, utilizzando come inoculo un succo vegetale infetto estratto in tampo neutro, addizionato di polvere abrasiva (carborundo) e carbone attivo.

Complesso del legno riccio

I responsabili dell'avversità e malattia del legno riccio sono un insieme di virus polimorfi trasmessi da nematodi, piccoli vermicelli cilindrici, e dalle cocciniglie, che provocano deformazioni nel tronco della vite. Può avere delle forti ripercussioni anche a livello economico sui vigneti, portando meno frutti sulle viti, modificazione fogliare, una crescita lenta seguita da una morte precoce.

La sintomatologia si manifesta prevalentemente:

- Scanalatura o butterature a carico dei tessuti legnosi del fusto in prossimità del punto d'innesto
- Subarosi e fessurazioni corticali
- Suberosi radicali.

Gli agenti responsabili sono GVA e GVB. GVA presenta un ssRNA con 5 ORF, mentre GVB presenta un genoma sempre ssRNA ma 2 ORF.

La difesa consiste in buone pratiche agronomiche: evitare il reimpianto immediato, selezionare portainnesti che resistono ai nematodi e lotta ai vettori.

CMV, mosaico del cetriolo

uno dei virus più diffuso al mondo. Il genoma è ssRNA(+) tripartito, codificante per 5 proteine, in particolare 1 proteina di movimento e 1 proteina strutturale (formante il capsido virale, simmetria isometrica). Le 3 proteine rimanenti sono 2 responsabili della replicazione, 1 soppressore del silenziamento genico dell'ospite.

Il virus provoca un mosaico molto evidente, associato a bollosità e spiccate malformazioni fogliari. Le piante colpite manifestano frequentemente fenomeni di nanismo, e una conformazione cespugliosa molto spinta, a causa dell'accorciamento degli internodi. Viene favorita dalle temperature elevate, la perdita di produzione può raggiungere il 100%. Per difesa bisogna ricorrere alle varietà resistenti, impiegare materiale di propagazione sano e certificato. Eliminare le piante malate e i residui infetti, proteggere le serre con reti anti-insetto e controllo diretto ai vettori (afidi).

Virus dell'avvizzimento maculato del pomodoro (TSWV)

L'agente responsabile é un tospovirus, é trasmesso in modo persistente propagativo da un tripide. Il genoma é un ssRNA tripartito di tre dimensioni diverse (lungo, medio corto).

La malattia é necrotica e spesso con esito letale. I soggetti infetti mostrano taglia ridotta e lesioni necrotiche. I frutti possono arrivare a maturazione ma appaiono deturpati da anulature necrotiche, si spaccano ed espongono superfici interne suberosi. La lotta ai tripidi é difficoltosa, perché si inseriscono nelle aree protette delle piante. Possono essere impiegate pacciamature di tipo riflettente, sembra dimostrato che cosí facendo l'incidenza della malattia puó essere ridotta di oltre il 70%. Sono commercializzate varietà di pomodori resistenti a TSWV (anche se alcuni ceppi grazie al riarrangiamento del genoma riescono a bucare la resistenza).

Accartocciamento fogliare della vite (GLRV)

Grande diffusione e importante incidenza economica. Genoma costituito da un ssRNA codificante dalle 6 alle 12 ORF. Sono coinvolte infatti nove entità virali. Trasmesse attraverso il materiale vivaistico e attraverso le punture di cocciniglie. I sintomi compaiono principalmente sulle foglie, che presentano i lembi fogliari ripiegati verso il basso (accartocciamento), con alterazioni cromatiche. Le nervature rimangono verdi. Le foglie presentano una consistenza rigida, dovuta all'ispessimento dei tessuti. In questa virosi é normale il processo di lignificazione dei tralci. I grappoli risultano meno numerosi con bacche piú piccole e un ridotto tenore zuccherino. La maturazione dei grappoli avviene uniformemente.

La difesa é affidata all'uso di materiale di moltiplicazione sano e alla lotta ai vettori.

Papaya ringspot virus (PRSV)

genoma costituito da ssRNA(+), codificante per una lunga poliproteina. É trasmissibile in maniera meccanica, durante le operazioni colturali, e tramite vettori, in questo caso afidi, in maniera non persistente.

La papaia mostra ingiallimento, distorsione delle foglie e mosaico. Sul tronco compaiono strane macchie e striature oleose. Il frutto presenta inoltre protuberanze e il classico ringspot. I sintomi della cucurbita tendono ad essere simili a quelli della papaia. Questo virus produce due tipi di corpi di inclusione visibili al microscopio elettronico.

Vaiolatura delle drupacee (sharka-plum pox virus)

genoma costituito da ssRNA(+), con 5' la proteina virale e a 3' coda polyA, codifica una lunga poliproteina, la sintesi inizia dalla seconda tripletta AUG.

É la virosi piú pericolosa delle drupacee. La diffusione avviene mediante materiale di propagazione e afidi. Prima di vedere i sintomi possono passare anche diversi anni. Le foglie manifestano aree clorotiche, evidenti alla ripresa vegetativa, e tendono a scomparire con la stagione calda. Sui frutti iniziano a comparire le stesse aree clorotiche in prossimità della maturazione, che avviene in modo irregolare. I frutti colpiti si presentano deformati, con depressioni e spesso cadono precocemente.

É necessario estirpare l'intera pianta, per evitare l'emissione di polloni. La sharka é una delle fitopatologie da denunciare e la lotta é obbligatoria.

Complesso della maculatura infettiva (GFkv)

Genoma costituito da ssRNA (+), caratterizzato da 4 ORF e da 2 zone non tradotte a 5' e 3'. Assume una localizzazione floematica. Causa effetti visibili e caratteristici in *V. Rupestris*. Consistono in una maculatura clorotica traslucida dei tessuti fogliari, e nello schiarimento delle nervature, talvolta le lamine appaiono arricciate e contorte, e lo sviluppo é sensibilmente ridotto. Non si conoscono al momento vettori naturali, anche se é stata osservata la sua diffusione in campo. La via piú importante rimane quella dell'utilizzo di materiale di propagazione infetto.

Il CAV, Centro Attività Vivaistiche, é una cooperativa di vivaisti che ha come obiettivo il raggiungimento della massima qualità nella produzione del materiale vivaistico. Effettuando l'analisi, il controllo e la produzione di piante di categoria base per i propri associati e per clienti esterni, il tutto nell'ambito del Sistema di Certificazione Nazionale ed Europea. Il CAV dispone anche di un laboratorio, atto ad effettuare le analisi fitopatologiche sul proprio materiale in conservazione e per conto terzi. Il laboratorio é autorizzato anche ad effettuare saggi sanitari per l'omologazione di cloni di vite. La sfera operativa del CAV riguarda il settore delle piante da frutto e delle piante orticole. L'intero processo, in ottemperanza alle leggi nazionali ed europee, porta alla produzione di piante certificate dal punto di vista genetico e fitosanitario.

Il CAV dispone di tutte le strutture necessarie ad espletare le fasi di conservazione e pre-moltiplicazione del materiale di propagazione nell'ambito della certificazione nazionale ed europea. Il CAV dispone inoltre delle strutture e degli strumenti per eseguire la termoterapia finalizzata al risanamento delle piante da virus e la loro successiva moltiplicazione tramite tecniche di micropropagazione.

Il CAV offre ai propri soci e a terzi il servizio di ispezione e di campionamento nei campi di piante madri e nei vivai certificati, come previsto dai decreti sulla certificazione e dalle norme sulla lotta obbligatoria. Il CAV produce e vende materiale di categoria base ai propri soci e a clienti terzi nazionali ed esteri.

Il laboratorio di analisi si preoccupa dei saggi biologici, delle analisi fitopatologiche, dell'identificazione varietale, della selezione assistita da marcatori e delle analisi nematologiche.

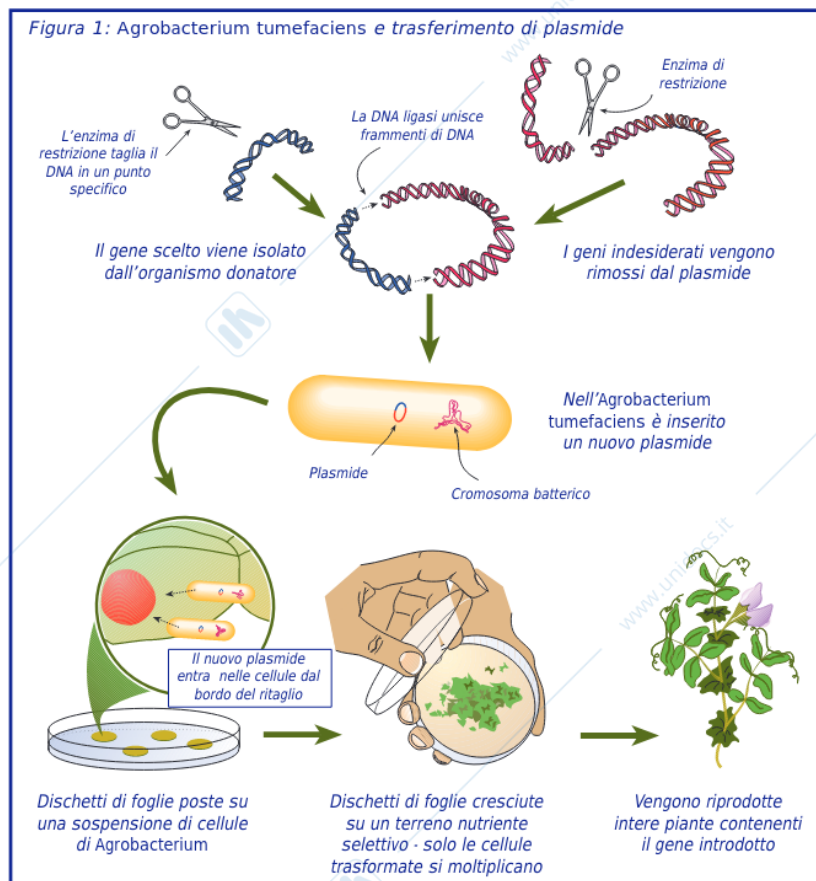
Ultima lezione di laboratorio

In serra l'obiettivo era vedere la percentuale di infezione delle foglie, l'ultimo laboratorio consisteva nel vedere la percentuale di infezione non piú visivamente ma in maniera analitica. I metodi utilizzati sono stati la RT-PCR e una retrotrascrittasi, perché si andava a cercare il gene target per la polimerasi.

Il DNA è amplificato da reazioni a catena della DNA-polimerasi. Dopo ogni turno di amplificazione, il DNA è quantificato. I metodi comuni di quantificazione includono l'uso delle colorazioni fluorescenti che intercalano con il DNA doppio-filamento (ds) e gli oligonucleotidi modificati del DNA (denominati sonde) che sono fluorescenti una volta ibridati con un DNA. Spesso la PCR real-time è combinata con la PCR Retro Trascrizionale (RT-PCR) per quantificare i livelli di espressione di specifici RNA: la retro-trascrizione (o trascrizione inversa) produce del DNA complementare a singolo filamento detto cDNA (complementary DNA) mantenendo inalterati i rapporti relativi di concentrazione delle diverse specie degli RNA. In questo modo è possibile, ad esempio, misurare l'espressione relativa di un gene ad un tempo particolare, o in una cellula o in un tipo particolare di tessuto. La combinazione di queste due tecniche è spesso denominata RT-PCR quantitativa.

Piante transgeniche

Sono definite piante geneticamente modificate, con un gene aggiunto o transgeniche quelle piante



che hanno ricevuto uno o più geni da una diversa pianta o organismo, o che hanno aggiunto al loro genoma un gene o geni che sono stati alterati o uniti in modo particolare. Si utilizza per creare piante transgeniche *agrobacterium tumefaciens*, che è in grado di trasferire materiale genetico nelle piante. È un batterio del terreno che contiene oltre ad un suo cromosoma, un plasmide induttore di tumore (Ti). Questo frammento di DNA contiene geni che sono responsabili della formazione del tumore del colletto. È possibile asportare i geni che causano questi tumore e sostituirli con geni selezionati,

utilizzando il plasmide Ti come un vettore di trasferimento di nuovi geni nella piante. Le piante della famiglia delle Solanceae, tabacco, pomodoro e patata hanno dato i migliori risultati.

