

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 56

SCHEDA TECNICA PER INDAGINI

SULL'ORGANISMO NOCIVO:

Tomato brown rugose fruit virus

REV.	DESCRIZIONE REVISIONE	COMPILAZIONE	APPROVAZIONE	DATA DI ADOZIONE	FIRMA
0	Revisione 0	GDL per il Programma di indagine sugli organismi nocivi delle piante	CFN 25-26/10/2023	15/11/2023	

Indice

Premessa	3
1. Informazioni Generali	3
1.1 Tassonomia e inquadramento	3
1.2 Normativa vigente	4
1.3 Distribuzione geografica	5
1.3.1 Presenza in Italia	5
2. Aspetti biologici dell'organismo	6
2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo	6
2.2 Sintomi/segni	7
2.3 Piante ospiti (ospiti principali/minori)	7
3. Siti di maggiore rischio	8
3.1 Aree a rischio/ Risk areas	8
4. Indagine/survey	8
4.1 Osservazione visiva	9
4.2 Campionamento	16
4.3 Indagine con trappole	19
5. Diagnosi	20
5.1 Campione/Matrice	20
5.2 Test per l'identificazione	20
Bibliografia	23

Premessa

La scheda tecnica di indagine per un organismo nocivo o gruppo di organismi nocivi affini riporta le informazioni sull'inquadramento tassonomico e normativo, la diffusione a livello mondiale e nazionale, gli aspetti di carattere generale sul ciclo biologico, le istruzioni su come condurre e quando rilievi visivi e campionamenti sulla base di ampie illustrazioni dei sintomi o danni causati sulle specie ospiti e, nel caso di insetti, le modalità di indagine attraverso l'uso di trappole. La scheda riporta anche le informazioni sulle metodologie diagnostiche per l'identificazione del singolo organismo nocivo o gruppo affine.

La scheda tecnica di indagine tiene conto dei **regolamenti comunitari** e/o **decreti nazionali**, dell'esperienza dei Servizi Fitosanitari Regionali (SFR) nel controllo del territorio, degli standard internazionali (**EPPO**, ISPM etc..). La scheda è uno strumento funzionale al riconoscimento dell'organismo nocivo in dotazione al personale tecnico impegnato nell'esecuzione delle indagini (Ispettori fitosanitari, Agenti fitosanitari, Assistenti fitosanitari, Tecnici rilevatori).

La scheda tecnica di indagine viene elaborata da un gruppo di lavoro di esperti (**SFR** e **CREA-DC**) per l'organismo nocivo considerato, con l'eventuale coinvolgimento di altri esperti di Enti di Ricerca e Università. La scheda di indagine viene approvata dal **Comitato Fitosanitario Nazionale** (CFN) e revisionata periodicamente per gli aggiornamenti normativi, distribuzione geografica e procedure di indagine.

1. Informazioni Generali

1.1 Tassonomia e inquadramento

Nome scientifico: *Tomato brown rugose fruit virus*

Nome comune: Tomato brown rugose fruit virus

Codice EPPO: TOBRFV

Posizione tassonomica:

Regno: Viruses and viroids (1VIRUK)

Categoria: Riboviria (1RIBVD)

Famiglia: *Virgoviridae* (1VIRGFF)

Genere: *Tobamovirus* (1TOBAG)

Specie: *Tomato brown rugose fruit virus* (TOBRFV)

Categorizzazione

EU: Organismo nocivo soggetto a misure di emergenza

EPPO: A2 List

1.2 Normativa vigente

EUROPEA:

- **Regolamento (UE) 2016/2031** del Parlamento europeo e del Consiglio, del 26 ottobre 2016, relativo alle misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante, che modifica i regolamenti (UE) n. 228/2013, (UE) n. 652/2014 e (UE) n. 1143/2014 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga le direttive 69/464/CEE, 74/647/CEE, 93/85/CEE, 98/57/CE, 2000/29/CE, 2006/91/CE e 2007/33/CE del Consiglio;
- **Regolamento (UE) 2017/625** del Parlamento europeo e del Consiglio, del 15 marzo 2017, relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari, recante modifica dei regolamenti (CE) n. 999/2001, (CE) n. 396/2005, (CE) n. 1069/2009, (CE) n. 1107/2009, (UE) n. 1151/2012, (UE) n. 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio, dei regolamenti (CE) n. 1/2005 e (CE) n. 1099/2009 del Consiglio e delle direttive 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE e 2008/120/CE del Consiglio, e che abroga i regolamenti (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE del Consiglio e la decisione 92/438/CEE del Consiglio (regolamento sui controlli ufficiali);
- **Regolamento delegato (UE) 2019/1702** della Commissione del 10 agosto 2019 che integra il regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio stabilendo l'elenco degli organismi nocivi prioritari;
- **Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072** della Commissione che stabilisce condizioni uniformi per l'attuazione del regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante e che abroga il regolamento (CE) n. 690/2008 della Commissione e modifica il regolamento di esecuzione (UE) 2018/2019 della Commissione e ss.mm.ii.;
- **Regolamento di esecuzione (UE) 2020/1191** della Commissione dell'11 agosto 2020 che istituisce misure per impedire l'introduzione e la diffusione nell'Unione del virus ToBRFV (Tomato brown rugose fruit virus) e abroga la decisione di esecuzione (UE) 2019/1615 e ss.mm.ii, come modificato da ultimo con il **Regolamento di Esecuzione (UE) 2023/1032** della Commissione del 25 maggio 2023 che istituisce misure per impedire l'introduzione e la diffusione nel territorio dell'Unione del virus ToBRFV (Tomato brown rugose fruit virus) e modifica il regolamento di esecuzione (UE) 2020/1191.

NAZIONALE:

- **Decreto Legislativo 2 febbraio 2021, n. 19.** "Norme per la protezione delle piante dagli organismi nocivi 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"(GU Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana - Serie generale n.48 del 26 febbraio 2021) e s.m.i;

1.3 Distribuzione geografica

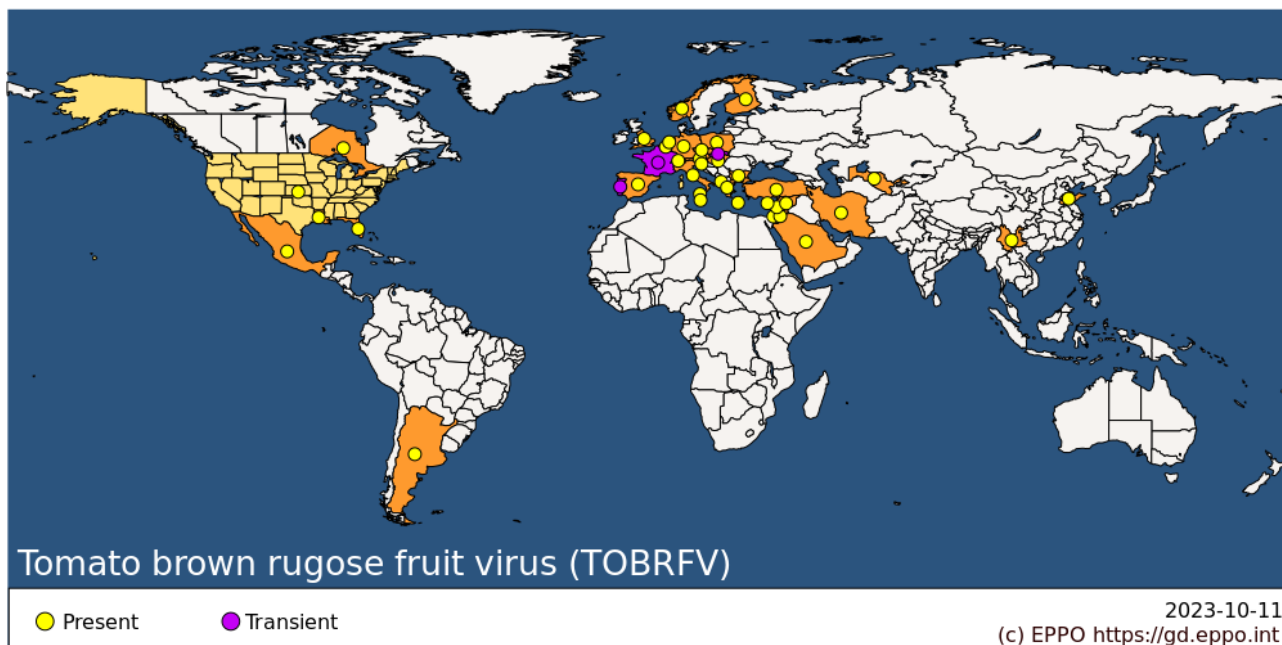
Africa: assente

America: Argentina, Canada, Mexico, Stati Uniti d'America,

Asia: Arabia Saudita, Cina; Iran, Israele, Giordania, Libano, Siria, Uzbekistan

Europa: Albania, Austria, Belgio, Bulgaria, Cipro, Finlandia, Francia, Germania, Grecia, Italia, Malta, Paesi Bassi, Norvegia, Polonia, Portogallo, Slovacchia, Slovenia, Spagna, Svizzera, Turchia, Regno Unito Repubblica Ceca, Ungheria;

Oceania: assente



<https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV/distribution>

1.3.1 Presenza in Italia:

2018: prima segnalazione ottobre - dicembre 2018 prima segnalazione in aree circoscritte nelle provincie di Ragusa, Siracusa, Agrigento e Caltanissetta - EPPO RS 2019/013

2019: confermati focolai nelle sole provincie di Ragusa e Siracusa - EPPO RS 2019/144

Servizio fitosanitario nazionale

Scheda tecnica ufficiale n. 56

Schede indagine organismi nocivi

Scheda tecnica per indagini su: Tomato brown rugose fruit virus

Pag. 6 di 25

2020: segnalato in Sicilia, provincia di Ragusa, su peperone. Stessa serra in cui l'anno precedente era stato coltivato pomodoro poi eradicato per infezione da ToBRFV - EPPO RS 2020/080;

2021: diverse segnalazioni in diverse altre regioni (Toscana, Puglia, Lazio, e Campania);

2023: segnalato in Sardegna.

2. Aspetti biologici dell'organismo

2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo

ToBRFV è stato riscontrato per la prima volta in Israele e Giordania, rispettivamente nel 2014 e 2015, in piante di pomodoro (*Solanum lycopersicum*) in coltivazione protetta, dotate di resistenza ai tobamovirus (Tm-22). Dopo queste prime segnalazioni, a partire dal 2018 il virus si è diffuso stabilmente in Messico, e rapidamente segnalato in diversi paesi Europei (Germania, Grecia, Italia, Olanda, Regno Unito, Turchia, Francia, Spagna). Inoltre, è stato segnalato negli Stati Uniti, ed in Cina. In Messico, Giordania e Italia, sono stati riportati casi di infezione naturale anche su peperone (*Capsicum annuum*) non portante i geni (L) per la resistenza al tomato mosaic virus (TMV).

Il virus, inoltre, è stato trovato naturalmente presente in specie infestanti come *Chenopodium murale* e *Solanum nigrum* e altre 10 specie erbacee spontanee degli ambienti mediterranei.

In condizioni di laboratorio, è stato possibile ottenere un'infezione sperimentale su specie di tabacco (*Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. sylvestris*, *N. tabacum*, ibridi di *Petunia*, *Datura stramonium*, *Chenopodium* spp), mentre su melanzana (*S. melongena*) e patata (*S. tuberosum*) l'infezione non è stata riscontrata.

La modalità di trasmissione di ToBRFV avviene per contatto, implicando una trasmissione per succo infetto in presenza di lesioni e quindi soluzione di continuità che si può verificare per: contatto tra pianta e pianta, apparato radicale lesionato nelle fasi di trapianto, innesto, nonché trasmissione antropica (strumenti di lavoro, mani e indumenti contaminati) in tutte le operazioni colturali dal trapianto, potatura, picchettamento, legatura, irrorazione e raccolta) ma anche accidentale nelle fasi di conferimento e commercializzazione. Analogamente a tutti i membri del genere Tobamovirus, la particella virale di ToBRFV è molto stabile, ed è quindi in grado di sopravvivere per lunghi periodi nei residui colturali, anche nel terreno, e su attrezzi, picchetti, fili per traliccio, contenitori, bancali per serre e vassoi per piantine contaminati, contenitori per la raccolta e confezionamento dei frutti, dove la concentrazione virale è molto alta.

ToBRFV è presente sui tegumenti seminali (contaminazione per polpa infetta del frutto) con la potenzialità ad infettare l'embrione nelle fasi di emersione ed accrescimento mentre è certa la non presenza del virus nell'embrione. La trasmissione per seme è stata riportata intorno al 1,8% per seme non trattato (Davino et al., 2020), ma sono necessarie ulteriori prove sperimentali su quantità di seme maggiore e accertarne la reale entità. Tuttavia, anche nel caso in cui la trasmissione da seme risultasse più bassa, la trasmissibilità del virus per contatto (ad esempio durante il trapianto di piantine o la gestione regolare della coltivazione) consente una rapida diffusione dell'infezione all'interno di una serra. La trasmissione per seme (1,9%) è stata accertata anche in *S. nigrum*. L'efficacia di trattamenti di disinfezione alla semente tra quelli utilizzati per disattivare la capacità infettiva di altri tobamovirus (fosfato trisodico, acido cloridrico, ipoclorito di sodio), trattamento

termico e prodotti commerciali, è stata verificata per ToBRFV evidenziando l'inattivazione del virus nella sua capacità infettiva anche se ancora rilevabile su seme attraverso i saggi molecolari (Chanda et al., 2021; Davino et al., 2020; Salem et al., 2022). Anche per questo aspetto di prevenzione occorrono ancora approfondite indagini.

Infine, prove sperimentali hanno dimostrato la trasmissione di ToBRFV mediante bombi (*Bombus terrestris*), importanti impollinatori del pomodoro nei sistemi di coltura protetta.

2.2 Sintomi/segni

Il virus prende il nome dalle macchie marroni ad aspetto rugoso (brown rugose) che sono state riscontrate sui frutti nella prima identificazione del virus in Giordania. Tuttavia, i sintomi possono variare con la varietà, le condizioni climatiche e stagionalità, fino ad un quadro completamente asintomatico come riscontrato anche nei nostri ambienti climatici nel periodo invernale.

Tra quelli riportati e più frequenti si possono includere:

Foglie: mosaicatura (in particolare su foglie più giovani e germogli laterali) da lieve a grave, bollosità, frastagliatura dei margini soprattutto delle foglie apicali fino ad una deformazione fusiforme (needles) o totale restringimento del lembo, striature marroni (necrotiche), macchie di colore bruno o giallo, irregolari più o meno estese sulla lamina fogliare.

In genere, la pianta subisce una consistente riduzione dello sviluppo ed una mancata produzione utile, da 4 a 6 palchi/ciclo in meno.

Bacche: scolorimenti, marmorizzazione clorotica (che può apparire simile all'infezione con il virus del mosaico del pepino - PepMV), alterazione colorimetrica dello stato di maturazione. Nei frutti giovani anche deformazione e lesioni necrotiche. Sintomi di necrosi sono riportati anche su steli fiorali e sepali. A causa dei sintomi, i frutti delle piante infette perdono valore di mercato o non sono commercializzabili.

Piantine da trapianto: l'infezione, sia che avvenga tramite seme contaminato che per trasmissione meccanica, compreso l'innesto, in fase di allevamento in vivaio, manifesta sintomi solo dopo lo sviluppo di almeno le prime 6/7 foglie vere. Pertanto, durante la crescita delle piantine in vivaio, così come nel corso del trapianto è difficile identificare visivamente la presenza di ToBRFV.

2.3 Piantе ospiti (ospiti principali/minori)

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) e il peperone dolce (*Capsicum annuum*), peperone (per le varietà non dichiarate resistenti ai tobamovirus) sono riportati come principali ospiti. Nonostante le specie appartenenti al genere *Capsicum* sono indicate come ospiti, le segnalazioni di focolai di infezioni naturali sono stati segnalati solo in Messico, Giordania e Italia (solo su piantine prima del trapianto).

Infezioni naturali sono state inoltre osservate in numerose specie infestanti come *Amaranthus retroflexus*, *Beta vulgaris subsp. Maritima*, *Chenopodium murale*, *Corchorus olitorius*, *Erigeron canadensis*, *Malva parviflora*, *Oxalis corniculata*, *Portulaca oleracea*, *Solanum elaeagnifolium*, *Solanum nigrum*, *Taraxacum officinale*, *Veronica syriaca*, che potrebbero agire come possibili serbatoi di inoculo per ToBRFV.

3. Siti di maggiore rischio

3.1 Aree a rischio/ Risk areas

I siti di maggior rischio sono:

- Punti di ingresso doganali: importazione semente soprattutto se arriva da paesi in cui il virus è presente; piantine laddove è consentita l'importazione (paesi europei); frutti di importazione proveniente da paesi in cui il virus è presente o supposto (paesi mediterranei);
- Areali produttivi (coltivazione protetta);
- Vivai.

I siti a maggiore rischio secondo la codifica Europhyt sono:

All'aperto: 1.1 campo; 1.3 vivai 2.1 giardini privati; 2.5.2 centro giardinaggio; 2.5.9 mercati, rivenditori, negozi, rivendite all'ingrosso;

Al chiuso: 3.1 serra; 3.2 sito privato, diverso da una serra; 3.4.2 centro per il giardinaggio; 3.4.4 aeroporti, porti; 3.4.7 grossisti, mercati, rivenditori.


4. Indagine/survey

Modalità di indagine previste

- ✓ Osservazione visiva – Visual Inspection
- ✓ Campionamento – Sample Taking
- ✓ Indagine con trappole - Trapping

4.1 Osservazione visiva

Aspetti generali: L'obiettivo dell'ispezione visiva è quello di identificare il quadro sintomatologico causato da ToBRFV. L'osservazione andrebbe condotta principalmente su pomodoro focalizzandosi su foglie e frutti. Sulle foglie i sintomi dell'infezione possono variare con la varietà e le condizioni ambientali/stagionali. Potrebbe anche essere utile ispezionare areali produttivi di peperone, di cui è nota la varietà non dotata di resistenza, soprattutto se in vicinanza a pomodoro.

Sito di Indagine	Cosa guardare	Periodo di osservazione	Immagini
<p>Tutti i siti ritenuti a maggior rischio, con particolare attenzione a:</p> <p>Areali produttivi (1.1 campo; 3.1 serra; 3.2 sito privato, diverso da una serra)</p> <p>Luoghi di vendita (2.5.2 centro giardinaggio; 3.4.2 centro per il giardinaggio).</p>	<p>Foglie:</p> <p>- Mosaicatura da lieve a grave, (chiazze clorotiche o pallide) si sviluppano sulle foglie più giovani e sui germogli laterali.</p>	<p>Pomodoro</p> <p>piante adulte in piena fase vegetativa, di fioritura, e durante tutto il ciclo produttivo,</p>	 <p>Sintomi su pianta di pomodoro (Fonte: CREA-DC)</p>

- Bollosità delle foglie



Sintomi su pianta di pomodoro (Fonte: CREA-DC)

-Apici vegetativi a pennacchio con foglie ad aspetto frastagliato



Sintomi su pianta di pomodoro (Fonte: CREA-DC)

Getti ascellari e
basali con
mosaicatura

- Frastagliatura
con in alcuni
casi
deformazione
fusiforme
(needles).



Sintomi su pianta di pomodoro (Fonte: regione Piemonte)



Sintomi su pianta di pomodoro (Fonte: CREA-DC)

- Riduzione del lembo fogliare



Sintomi su pianta di pomodoro (Fonte: CREA-DC)

Frutti:

- Scolorimento, maturazione non uniforme



Sintomi su bacca di pomodoro Fonte: CREA-DC

- Deformazioni
e necrosi



Sintomi su bacca di pomodoro Fonte: regione Piemonte



Sintomi su bacca di pomodoro Fonte: regione Siciliana

Tutti i siti ritenuti a maggior rischio, con particolare attenzione a:

Areali produttivi
(1.1 campo; 3.1 serra; 3.2 sito privato, diverso da una serra

Luoghi di vendita (2.5.2 centro giardinaggio; 3.4.2 centro per il giardinaggio).

Foglie:

Clorosi, mosaico malformazione dell'apice

Frutti:

Deformazioni, decolorazioni e necrosi

Peperone:


piante adulte in piena fase vegetativa, di fioritura, e durante tutto il ciclo produttivo



Sintomi su foglie di peperone Fonte: Prof. Davino



Sintomi su bacche di peperone Fonte: Prof. Davino

<p>Tutti i siti ritenuti a maggior rischio, con particolare attenzione a:</p> <p>Areali produttivi (1.1 campo; 3.1 serra; 3.2 sito privato, diverso da una serra</p> <p>Luoghi di vendita (2.5.2 centro giardinaggio; 3.4.2 centro per il giardinaggio).</p>	<p>Foglie: - mosaico e bollosità</p>	<p><i>Chenopodium</i>: piante spontanee presenti all'esterno o bordure dei siti produttivi, durante il periodo produttivo</p>	 <p>Sintomi su foglie di <i>Chenopodium</i> Fonte: CREA-DC</p>

4.2 Campionamento

Aspetti generali:

La concentrazione del virus può variare significativamente a seconda delle diverse parti delle piante, si consiglia dove possibile di utilizzare sempre campioni fogliari sintomatici.

Sito di Indagine	Cosa prelevare	Periodo di Prelievo	Come conservare
<p>Tutti i siti ritenuti a maggior rischio, con particolare attenzione a:</p> <p>Areali produttivi (1.1 campo; 3.1 serra; 3.2 sito privato, diverso da una serra)</p> <p>Luoghi di vendita (2.5.2 centro giardinaggio; 3.4.2 centro per il giardinaggio).</p>	<p style="text-align: center;">FOGLIE E FRUTTI IN PRODUZIONE</p> <p><u>Campioni sintomatici:</u> In presenza di sintomi sospetti, prelevare porzioni di getti, foglie (almeno 3 e preferibilmente le giovani o i getti ascellari) anche se in presenza di frutti asintomatici Contrassegnare il campione con ID. Attuare già ogni misura di azione di prevenzione alla diffusione e contenimento in attesa dell'esito del test diagnostico</p> <p><u>Campioni asintomatici:</u> per i campioni fogliari in assenza di sintomi evidenti, prelevare le prime foglie apicali (penultima e terzultima foglia o intero getto ascellare) in quanto di</p>	<p style="text-align: center;">Durante tutto il periodo produttivo</p>	<p>Il materiale vegetale deve essere asciutto, posto in buste di plastica da conservare a basse temperature o in luoghi freschi per evitare disidratazione. Ogni campione deve essere opportunamente siglato sulla busta. Usare sacchetti di dimensioni adeguate a non comprimere le piante/parti vegetali campionate.</p> <p>In attesa della consegna al laboratorio il materiale va conservato in frigorifero a 4°C</p> <p>Spedizione del campione: i campioni raccolti devono arrivare al laboratorio di diagnosi entro 72 ore dal loro prelievo, preferibilmente in borse termiche evitando il contatto diretto con piastra eutettica (siberino)</p> <p><u>NB:</u> durante le fasi di campionamento è bene prestare attenzione massima a possibili contaminazioni: utilizzare indumenti, guanti, copri-calzari monouso, con cambi nel passaggio da una serra ad un'altra.</p>

	<p>solito la concentrazione virale è maggiore nei tessuti in accrescimento.</p> <p>Campioni pool di più piante (fino a 5 piante) da saggiare con test molecolari.</p> <p>Per i frutti asintomatici un'alternativa è anche il prelievo del calice del frutto (sepali).</p> <p>Piante da impianto</p> <p>il campione è costituito da 200 foglie per sito di produzione e per cultivar, preferibilmente giovani foglie della parte superiore delle piante</p>		
<p>Tutti i siti ritenuti a maggior rischio, con particolare attenzione a punti di ingresso: (1.3 vivai; 2.5.9 mercati, rivenditori, negozi, rivendite all'ingrosso; 3.4.4 aeroporti, porti; 3.4.7 grossisti, mercati, rivenditori.</p>	<p>PARTITE DI SEMENTI</p> <p>Il virus è presente sui tegumenti e quindi è sufficiente lavorare il seme nella sua integrità.</p> <p>Per il campionamento delle sementi seguire le indicazioni riportate nel documento ISPM31. In dettaglio:</p> <p>Per lotti di non oltre i 3000 semi, campionamento ipergeometrico in grado individuare con</p>	<p>Durante tutto l'anno</p>	<p>Il campione minimo di laboratorio per partite di seme è di 3000 semi. Qualora il lotto fosse suddiviso in più colli, si consiglia di prelevare un sub-campione per ogni collo per arrivare alla quantità dei 3000 semi o più complessivi. Nel caso di piccole partite, abbassare la quantità di semi fino ad arrivare ad una quota rappresentativa del 10-20 %.</p>

un'affidabilità del 95% un livello di presenza di seme infetto del 10% o superiore
Per lotti oltre i 3000 semi (ma inferiore a 30000 semi)
campionamento ipergeometrico in grado individuare con un'affidabilità del 95% un livello di presenza di seme infetto del 1% o superiore.
Per lotti oltre i 30000 semi
campionamento ipergeometrico in grado individuare con un'affidabilità del 95% un livello di presenza di seme infetto del 0,1% o superiore

NB ogni subcampione non può essere oltre i 1000 semi

4.3 Indagine con trappole

Aspetti generali:

non applicabile

Sito di indagine	Tipologia di trappola	Posizionamento trappola	Periodo di esposizione - frequenza consigliabile dei controlli	Immagini

5. Diagnosi

Protocolli ufficiali SFN:

- Documento tecnico ufficiale del Servizio Fitosanitario Nazionale N° 14 – Metodi diagnostici: Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato brown rugose fruit virus

Standard di riferimento:

- PM7/146(2) 2022 – ToBRFV

5.1 Campione/Matrice

Preparazione del campione:

FOGLIE E FRUTTI: da ogni campione (massimo 200 foglie), polverizzato (con la massima attenzione a non disperdere materiale) usando azoto liquido oppure in alternativa sistemi meccanici come la macerazione in tampone fosfato in buste dotate di doppia rete, prelevare circa 100 mg polvere o 100 ml di estratto, rispettivamente, di tessuto fogliare o di frutto. Le polveri dei campioni azotati possono essere conservate a -20°C anche per diversi mesi prima dell'analisi.

SEMI: Per i semi, il virus è presente sui tegumenti e quindi è sufficiente lavorare il seme nella sua integrità. La semente disinfettata con metodi fisici o chimici quali estrazione acida, ipoclorito di sodio, trisodio fosfato, è idonea ai test diagnostici. Semente confettata o trattata con altri formulati chimici (fungicidi e insetticidi) potrebbe non dare risultati attendibili ai test per effetti inibitori da parte dei formulati chimici stessi. In questo caso, un ulteriore sub-campione della partita trattata deve essere contaminato con il virus in laboratorio e accertata la presenza nei test diagnostici

Tipologia del campione seme: Dal 1 Ottobre 2020 non è più possibile utilizzare il test ELISA per i semi, che dovranno essere saggiati esclusivamente con i metodi di real-time RT-PCR riportati sulla normativa europea (Annex - point 3). Lo schema di campionamento dei semi segue il documento ISPM31 con un sub campione massimo di 1000 semi. Laddove possibile il campione minimo è di 3000 semi da suddividere in 3 sub-campioni da 1000 semi ciascuno. Nel caso di piccole partite, il sub-campione da analizzare dovrà essere costituito sempre da un massimo di mille semi.

5.2 Test per l'identificazione

Tipologie diagnostiche:

- ELISA
- PCR
- real-time RT-PCR

Test diagnostici sierologici

I campioni fogliari e di frutti provenienti da coltivazione possono essere saggiati mediante ELISA, anche se attualmente sono disponibili kit commerciali sierologici per ToBRFV che tuttavia non hanno una buona specificità dando origine a reazioni incrociate con altre specie del genere Tobamovirus. Quindi se ne consiglia l'utilizzo come saggio preliminare di screening ma in caso di positività si deve procedere ad un'identificazione molecolare. Inoltre, secondo le indicazioni della normativa europea, Reg. (UE) 2020/1191 e ss.mm.ii, l'ELISA può essere utilizzata solo su campioni sintomatici, ed in caso di positività ci deve essere un'analisi molecolare confermativa, mediante RT-PCR o real-time RT-PCR secondo i metodi riportati qui di seguito.

Test diagnostici molecolari:

Estrazione RNA totale

L'estrazione dell'RNA totale viene eseguita utilizzando il kit Qiagen RNeasy Plant mini-kit, o analogo kit di estrazione commerciale. Per i semi si può utilizzare il campione pretrattato come sopra riportato (250 semi in 10 ml di tampone fosfato o 1000 semi in tampone GH+)

Test molecolari:

Metodi di prova per rilevare ToBRFV su sementi:

L'agente patogeno può essere rilevato mediante real-time RT-PCR utilizzando diversi protocolli, come riportato nell'allegato della normativa europea del Reg. (UE) 2020/1191 e ss.mm.ii (punto 3 Allegato del Reg.(UE) 2023/1032):

- RT-PCR real-time con utilizzo dei primer e delle sonde descritti nel protocollo ISF (2020);
- RT-PCR real-time con l'utilizzo dei primer delle sonde di Menzel & Winter (2021);
- RT-PCR real-time con l'utilizzo dei primer e delle sonde di Bernabé-Orts et al. (2021).

In caso di esito positivo, lo stesso campione deve essere saggiato e validato da una prova confermativa eseguita con un metodo diverso da quello precedentemente utilizzato, scelto fra i metodi di real-time RT-PCR sopra riportati.

NB. *In caso di esiti discordanti durante l'analisi di sementi "confettate", il rivestimento deve essere rimosso e la prova deve essere eseguita nuovamente,*

Metodi di prova per rilevare ToBRFV su piante da impianto:

L'agente patogeno può essere rilevato mediante RT-PCR o real-time RT-PCR utilizzando diversi protocolli, come riportato nell'allegato della normativa europea Reg. (UE) 2020/1191 e ss.mm.ii (punto 4 Allegato del Reg. (UE) 2023/1032):

- RT-PCR convenzionale con l'utilizzo dei primer di Alkowni et al. (2019);
- RT-PCR convenzionale con l'utilizzo dei primer di Rodriguez-Mendoza et al. (2019);
- RT-PCR real-time con l'utilizzo dei primer delle sonde di Menzel & Winter (2021);

- RT-PCR real-time con l'utilizzo dei primer e delle sonde di Bernabé-Orts et al. (2021).

In caso di esito positivo, lo stesso campione deve essere saggiato e validato da una prova confermativa eseguita con un metodo diverso da quello precedentemente utilizzato, scelto fra i metodi di RT-PCR o real-time RT-PCR sopra riportati.

Bibliografia

- Alkowni R, Alabdallah O & Fadda Z (2019) Molecular identification of tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine. *Journal of Plant Pathology* 101, 719-723.
- Bernabé-Orts JM, Torre C, Méndez-López E, Hernando Y & Aranda MA (2021) New Resources for the Specific and Sensitive Detection of the Emerging Tomato Brown Rugose Fruit Virus. *Viruses* 13, 1680.
- Chanda B, Shamimuzzaman M, Gillard A & Ling KS (2021) Effectiveness of disinfectants against the spread of tobamoviruses: Tomato brown rugose fruit virus and cucumber green mottle mosaic virus. *Virology Journal* 18:7 doi.org/10.1186/s-12985-020-01479-8
- Cambrón-Crisantos JM, Rodríguez-Mendoza J, Valencia-Luna JB, Alcasio-Rangel S, García-Ávila CJ, López-Buenfil JA & Ochoa-Martínez DL (2018) First report of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1). DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1810-5
- Davino S, Caruso AG, Bertacca S, Barone S & Panno S (2020) Tomato brown rugose fruit virus: seed transmission rate and efficacy of different seed disinfection treatments. *Plants* 9, 1615; doi:10.3390/plants9111615
- Dombrovsky A. & Elisheva S (2017) Seed Transmission of Tobamoviruses: Aspects of Global Disease Distribution. 10.5772/intechopen.70244.
- EPPO (2022) PM7/146(2) Tomato brown rugose fruit virus. *EPPO Bulletin* 52, 665-692. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/epp.12891>
- Levitzky N, Smith E, Lachman O, Luria N, Mizrahi Y, Bakelman H, ... & Dombrovsky A (2019) The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of Tomato brown rugose fruit virus contributing to disease spread in tomatoes. *PLoS one* 14(1), e0210871.
- Link SK, Tian T, Gurung S, Salati R & Gilliard A (2019) First report of tomato brown rugose fruit virus infecting greenhouse tomato in the U.S. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1959-PDN>
- Luria N, Smith E, Reingold V, Bekelman I, Lapidot M, Levin I, et al. (2017) A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes. *PLoS ONE* 12(1), e0170429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429>
- Menzel W, Knierim D, Winter S, Hamacher J & Heupel M (2019) First report of tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in Germany. *New Disease Reports* 39, 1. [<http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.001>]
- Menzel W & Winter S (2021). Identification of novel and known tobamoviruses in tomato and other solanaceous crops using a new pair of generic primers and development of a specific RT-qPCR for ToBRFV. *ACTA Horticulturae* 1316, 143-148.

- Panno S, Caruso AG & Davino S (2019) First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus on Tomato Crops in Italy. *Plant Disease* <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN>
- Salem N, Mansour A, Ciuffo M, Falk BW & Turina M (2016) A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives of Virology* 161(2), 503-506.
- Salem NM, Cao M, Odeh S, Turina M & Tahzima R (2019) First report of tobacco mild green mosaic virus and tomato brown rugose fruit virus infecting *Capsicum annum* in Jordan. *Plant Disease* <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1189-PDN>
- Salem NM, Sulaiman A, Samarah N, Turina M & Vallino M (2022) Localization and mechanical transmission of tomato brown rugose fruit virus in tomato seeds. *Plant Disease* 106(1), 275–281
- Salem NM, Abumuslem M, Turina M, Samarah N, Sulaiman A, Abu-Irmaileh B & Ata Y (2022) New weed hosts for tomato brown rugose fruit virus in wild Mediterranean vegetation. *Plants* 11, 2287. <https://doi.org/10.3390/plants11172287>
- EPPO. European and Mediterranean Plant Protection - <https://www.eppo.int>
- International Seed Federation protocol: https://www.worldseed.org/wp-content/uploads/2019/09/ Tomato-ToBRFV_2019.09.pdf