

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"



Dipartimento di Agraria

DOTTORATO DI RICERCA IN AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

XXVI CICLO

INDIRIZZO: PATOLOGIA VEGETALE

Caratterizzazione biologica, sierologica e molecolare di un nuovo Nepovirus riscontrato in Campania su Aeonium sp.

TUTOR: Ch.mo Prof. Daniela Alioto

CO-TUTOR: Dott. Luisa Rubino

COORDINATORE: Ch.mo Prof. Domenico Carputo

DOTTORANDO
Dott. Roberto Sorrentino

2011-2014

Abstract

During 2011, *Aeonium* plants of an unidentified species with virus-like symptoms were collected from a private garden in Scafati (Salerno). Plants exhibited faint chlorotic spots and rings on both leaf surfaces. A virus was successfully transmitted, by sap inoculation, to test plants, including *Nicotiana benthamiana* which was used for electron microscopy observations and virus purification. Examination of tissue sap from symptomatic test and *Aeonium* plants revealed the presence of isometric particles with angular contours, *ca.* 30 nm in diameter. The particles presented single coat protein (CP) subunits 54 kDa in size, that encapsidated single-stranded positive-sense RNA species of 7,549 (RNA1) and 4,010 (RNA2) nucleotides. A third RNA molecule 3,472 nts in size, was detected in infected *Aeonium* plants: it is supposed to represent a defective interfering (DI) RNA because entirely derived from RNA2 with a 537 nts deletion in the coding region of movement protein. The structural genomic organization of both RNAs and the morphological and cytopathological features were comparable to those of nepoviruses. In addition, amino acid sequence comparisons of CP and the Pro-Pol region (a sequence containing parts of the proteinase and polymerase) with those of other nepoviruses showed that the *Aeonium* virus belongs to the subgroup A of the genus *Nepovirus* and is phylogenetically close to *Tobacco ringspot virus* (TRSV). Comparison of each single domain of TRSV and the *Aeonium* virus polyproteins disclosed a relatively low percentage of identity throughout. Moreover, the *Aeonium* virus showed to be serologically distinct from TRSV. Based on the species demarcation criteria for the family *Secoviridae*, the virus appears to be a novel member of the genus *Nepovirus* for which the name of *Aeonium ringspot virus* (AeRSV) is proposed.

The evidence of recovery in test plants infected with AeRSV indicated the activation of post-transcriptional gene silencing. Thus, the second part of the study was focalized on the interaction of AeRSV with host defense responses during symptom induction and subsequent recovery. Results showed that, although RNA silencing is active during the recovery phase, the reduction of virus titer is not required for symptom disappearance. In addition, it was demonstrated that AeRSV does not code a suppressor for RNA silencing since it is unable to restore the wild phenotype in *Arabidopsis* reporter line SUC-SUL already silenced for the *sulfur* gene.

INDICE

1	Introduzione	1
1.1	<i>I fitovirus</i>	1
1.2.1	<i>I nepovirus</i>	3
1.2.2	<i>Tassonomia del genere</i>	4
1.2.3	<i>Proprietà dell'acido nucleico</i>	6
1.2.4	<i>Gamma di ospiti, sintomi e principali malattie da nepovirus</i>	8
1.2.5	<i>Trasmissione</i>	10
1.3.1	<i>Il silenziamento genico</i>	12
1.3.2	<i>Il meccanismo del silenziamento nell'interazione pianta-virus</i>	14
1.3.3	<i>Soppressione del silenziamento genico</i>	17
1.4	<i>La pianta modello Arabidopsis thaliana</i>	21
1.5	<i>Le Xerofite /Classificazione e caratteri botanici del genere Aeonium</i>	23
2	Scopo della tesi	26
3	Materiali e Metodi	27
3.1	<i>Trasmissione meccanica</i>	27
3.2	<i>Purificazione del virus</i>	28
3.3	<i>Microscopia elettronica</i>	29
3.4	<i>Sierologia</i>	31
3.5	<i>Das-ELISA</i>	31
3.6	<i>Analisi proteina del capsido</i>	34
3.7	<i>Estrazione di RNA</i>	35
3.7.1	<i>RNA da tessuti infetti</i>	35
3.7.2	<i>RNA da particelle</i>	35
3.8	<i>Clonaggio molecolare</i>	36
3.8.1	<i>Retrotrascrizione dell'RNA genomico</i>	36
3.8.2	<i>Preparazione del vettore plasmidico e ligazione</i>	37
3.8.3	<i>Preparazione delle cellule competenti</i>	37
3.8.4	<i>Trasformazione batterica</i>	38
3.9	<i>Estrazione ed analisi del DNA plasmidico</i>	38
3.10	<i>Sequenziamento del genoma virale</i>	39
3.11	<i>Determinazione del primo nucleotide degli RNA genomici</i>	40
3.12	<i>Amplificazione tramite PCR del genoma virale</i>	41
3.13	<i>Clonaggio nel vettore plasmidico pGem-T</i>	42

3.13.1 Purificazione dei prodotti di PCR	43
3.14 Produzione di una ribosonda marcata con digossigenina (DIG)	43
3.15 Ibridazione molecolare	44
3.15.1 Separazione degli RNA su gel denaturante	44
3.15.2 Ibridazione con sonda marcata con DIG	45
3.16 Allevamento ed inoculazione di <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
3.17 Gel denaturante per piccoli RNA	48
3.18 Produzione di sonda marcata con ^{32}P	50
3.19 Lavaggi membrana ed esposizione su Phosphor Screen	52
3.20 Ibridazione con sonda LNA	53
4 Risultati 1	55
<hr/>	
4.1 Caratterizzazione biologica	55
4.2 Caratterizzazione sierologica di AeRSV	60
4.2.1 Purificazione del virus e produzione di un antisiero policlonale	60
4.3 Microscopia Elettronica	61
4.3.1 Analisi citopatologiche	62
4.4 Validazione di un protocollo diagnostico ELISA	64
4.5 Analisi della proteina del capsido e dell'acido nucleico virale	67
4.6 Determinazione delle sequenze nucleotidiche	68
4.7 Confronto con altri Nepovirus	73
4.8 Produzione di una sonda molecolare e validazione di protocolli "tissue printing" e "dot-blot"	76
4.9 Indagini epidemiologiche	78
5 Discussione 1	80
<hr/>	
6 Risultati 2	87
<hr/>	
6.1 Caratterizzazione del processo infettivo in <i>N. benthamiana</i>	87
6.2 Interazione AeRSV - Silenziamento genico dell'RNA	91
6.2.1 Accumulo di RNA virale in mutanti di <i>A. thaliana</i>	92
6.2.2 Accumulo di RNA virale in <i>N. benthamiana</i> RDR6	96
6.2.3 Accumulo di piccoli RNA in <i>A. thaliana</i> e <i>N. benthamiana</i>	97
6.3 RNA genomico e vsRNAs in <i>N. benthamiana</i> p19	101
7 Discussione 2	103
<hr/>	

<u>8 Conclusioni</u>	<u>110</u>
----------------------	------------

<u>9 Bibliografia</u>	<u>112</u>
-----------------------	------------

Introduzione

1.1 I fitovirus

I virus sono entità biologiche, costituite da un acido nucleico (DNA o RNA di polarità positiva o negativa) inserito in un involucro proteico (capside) in alcuni casi rivestito da una membrana lipoproteica (*Rhabdoviridae*, *Tospoviridae*) e che compiono il proprio ciclo vitale nelle cellule di un organismo ospite come parassiti obbligati (Hull, 2002).

Lo studio dei virus dei vegetali, o fitovirus, rappresenta un importante capitolo della Patologia vegetale. I fitovirus, infatti, sono causa di danni economici ingenti alle colture, anche perché, a differenza delle malattie fungine o batteriche, non è possibile adottare strategie di lotta diretta contro di essi. La conoscenza di un patogeno a livello molecolare è importante per lo sviluppo di strategie di lotta innovative. Infatti, allo stato attuale le uniche modalità di contenimento delle virosi in agricoltura consistono nell'adozione di precise misure di profilassi (lotta ai vettori e alle infestanti, uso di varietà resistenti, etc), unite ad un costante monitoraggio del territorio.

I virus con genoma costituito da RNA di polarità positiva (RNA(+)) rappresentano il gruppo più numeroso e tra essi vi sono molti virus responsabili di patologie economicamente importanti. Le particelle virali dei virus con genoma ad RNA(+) contengono molecole di RNA a singola elica con funzione di RNA messaggero che può essere direttamente tradotto in proteine dai ribosomi dell'ospite. L'intero ciclo di replicazione di tali virus avviene nel citoplasma. Il genoma virale codifica un numero limitato di proteine, strutturali e non strutturali, che sono funzionali per il completamento del processo infettivo. Le proteine non strutturali includono le proteine che compongono il complesso replicativo virale, tra cui la RNA polimerasi RNA dipendente, le proteine di movimento, i soppressori del silenziamento genico.

Alcune possono svolgere una doppia funzione in quanto i) agiscono nel ciclo di replicazione e ii) prevengono o contrastano la risposta antivirale delle piante.

Nonostante le numerose differenze nella morfologia delle particelle e nella gamma di ospiti, i virus ad RNA(+) condividono importanti caratteristiche nel ciclo di replicazione. Poiché essi non hanno la polimerasi inserita nel capsido proteico, il genoma virale è, nelle prime fasi dell'infezione, tradotto per produrre tale enzima. Nel citoplasma l'RNA virale entra in un complesso di replicazione che è sempre associato al sistema di membrane. In questo complesso, la replicazione di una molecola di RNA di polarità positiva inizia al terminale 3' favorendo la sintesi di eliche complementari di polarità negativa (-). Queste danno luogo con i filamenti positivi ad intermedi di replicazione a doppia elica (*double strand* RNA, dsRNA). Le eliche negative sono utilizzate come stampo per la sintesi di una progenie di nuove molecole di RNA positivo. Tale progenie sarà il substrato per altri cicli di replicazione e per la sintesi di proteine virali quali le proteine di rivestimento. Gli RNA(+) sintetizzati interagiscono con le proteine strutturali per generare progenie di particelle virali che si diffondono nelle cellule vicine attraverso i plasmodesmi e, poi, nell'intera pianta attraverso i fasci vascolari (Fig. 1).

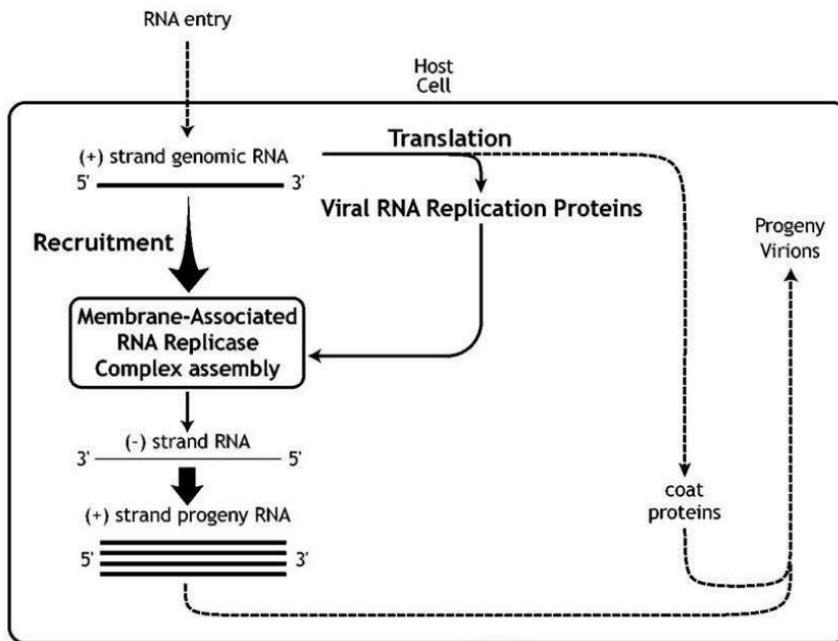


Fig. 1 – Schema generale della replicazione di un virus con genoma ad RNA di polarità positiva. Tutte le fasi specifiche della replicazione sono raffigurate con frecce continue, mentre le fasi che non influenzano la replicazione sono raffigurate con frecce tratteggiate. (schema adattato da Noueir, A. O., e P. Ahlquist. 2003).

1.2.1 *Inepovirus*

I nepovirus sono un gruppo di fitovirus, trasmessi da nematodi, con particelle isodiametriche di *ca.* 28 nm in diametro. Il termine nepovirus indica virus trasmessi da nematodi (*ne*) con simmetria del capsido di tipo poliedrico (*po*) (Cadman, 1963).

Tali virus possiedono un genoma bipartito ad RNA lineare, a singola elica di polarità positiva con una proteina legata covalentemente al terminale 5' (Viral Protein genome-linked, VPg) ed una sequenza poliadenilica o coda poli(A) al terminale 3'.

I due acidi nucleici sono racchiusi all'interno di capsidi icosaedrici costituiti da 60 subunità proteiche del peso di 52-60 kDa. Le particelle dei nepovirus sono di tre tipi e vengono classificate in base al coefficiente di sedimentazione in: top (49-56 S), middle (86-128 S), bottom (115-134 S) (Kurstak, 1981). Tali particelle contengono rispettivamente l'RNA1

(particelle B) e l'RNA2 (particelle M), entrambi necessari per il processo infettivo. Le particelle T si presentano vuote in quanto prive degli acidi nucleici. Tale aspetto è legato al fatto che nei nepovirus le subunità proteiche si possono autoaggregare in assenza dell'acido nucleico. In taluni casi le particelle M contengono due molecole di RNA2.

La specie tipo di questo genere è il *Virus della maculatura anulare del tabacco* (*Tobacco ringspot virus*, TRSV), virus descritto per la prima volta nel 1927 negli USA (Wingard e Priode, 1927).

1.2.2 Tassonomia del genere

Il genere *Nepovirus* appartiene alla famiglia *Secoviridae*, ordine *Picornavirales* nel quale sono classificati virus in grado di infettare vertebrati, insetti, artropodi, piante superiori, funghi ed alghe.

L'ordine *Picornavirales* è stato creato per ridefinire la classificazione di molti virus identificati, fino al 2008, come "picornavirales-like" ed inseriti nella superfamiglia o supergruppo dei picornavirales (Le Gall et al., 2008).

I membri di quest'ordine condividono molte proprietà; infatti essi hanno particelle icosaedriche di 25-30 nm di diametro con simmetria pseudo T=3, un genoma costituito da RNA a singola elica di polarità positiva ssRNA(+), monopartito o bipartito, che codifica poliproteine che si scindono per attività di una proteasi con struttura simile alla chimotripsina, codificata dal genoma del virus. Il genoma contiene, inoltre, un tipico "blocco di replicazione" costituito da una elicasi di tipo III, una proteasi ed una RNA polimerasi RNA dipendente (Hel-Pro-Pol).

All'interno dei *Picornavirales*, i virus che infettano le piante sono stati raggruppati nella famiglia *Secoviridae*, a sua volta divisa in due sottofamiglie

i *Comovirinae* ed una seconda sottofamiglia non ancora assegnata ad un *taxon* (cioè senza nome). Alla sottofamiglia *Comovirinae*, appartengono i generi:

- *Comovirus*
- *Fabavirus*
- *Nepovirus*

Alla seconda sottofamiglia sono assegnati i generi:

- *Sequivirus*
- *Waikavirus*
- *Cheravirus*
- *Sadwavirus*
- *Torradovirus*

All'interno del genere *Nepovirus* esiste un'ulteriore classificazione che consente la suddivisione dei virus patogeni in 3 sottogruppi (A, B, C) in relazione alle dimensioni dell'RNA2.

I membri del sottogruppo A possiedono un RNA2 di dimensioni stimate in 3700-4000 nt, quelli del sottogruppo B hanno un RNA2 di 4400-4700 nt, mentre nel sottogruppo C l'RNA2 varia da 6400 a 7300 nt. I tre sottogruppi differiscono anche per i siti di taglio all'interno della poliproteina nonché per l'aminoacido della proteasi che interagisce con la posizione -1 del sito di taglio (leucina per i sottogruppi A e B, istidina per il sottogruppo C).

La lunghezza dell'RNA1 varia da 7200 a 8400 nt. Per alcune specie è stata segnalata la presenza di acidi nucleici satelliti lineari o circolari, che possono modulare l'espressione dei sintomi, la cui dimensione oscilla tra 450 1100 e 1800 nt.

1.2.3 Proprietà dell'acido nucleico

Gli RNA dei *Nepovirus* codificano poliproteine di dimensione compresa tra 150 e 260 kDa.

La proteina N-terminale codificata dall'RNA2 (P2A) è coinvolta nel meccanismo replicativo del virus (Gaire et al., 1999), mentre la porzione C-terminale codifica rispettivamente la proteina di movimento (MP) e di rivestimento o del capsido (CP) (Fig. 2).

Le proteine di movimento dei *Nepovirus* hanno la caratteristica di aggregarsi per formare strutture tubulari tra i plasmodesmi delle cellule e consentire il movimento del virus nella pianta.

La poliproteina codificata dall'RNA1 è scissa in sei peptidi. In Fig. 2 è riassunta l'organizzazione genomica e la posizione dei domini.

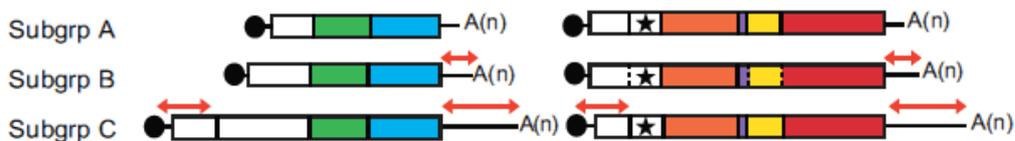


Fig. 2 – Rappresentazione della struttura e dell'organizzazione del genoma dei nepovirus. Le “Open Reading Frame” (ORF), presenti negli RNA, sono mostrate come rettangoli. All'interno dei rettangoli le linee verticali indicano i siti di taglio sperimentalmente determinati o dedotti dal confronto con altre sequenze. Al terminale 5' è presente la VPg rappresentata con un pallino nero pieno, mentre al terminale 3' è indicata la coda di poly (A). Le frecce rosse indicano le regioni del genoma che presentano identità di sequenza tra RNA1 e RNA2. I domini proteici con, all'interno, i motivi conservati sono indicati in verde (proteina di movimento), in blu (proteina di rivestimento), in arancione (elicasi), in viola (VPg), in giallo (proteasi), in rosso (RNA polimerasi RNA dipendente).

La porzione C-terminale codifica il “blocco replicativo” mentre l'estremità N-terminale ha una funzione ancora non ben definita. Per due specie di *Nepovirus*, il *Virus del mosaico dell'arabis* (*Arabis mosaic virus*, ArMV) e il *Virus della maculatura anulare del pomodoro* (*Tomato ringspot virus*, ToRSV) è stato dimostrato che tale porzione N-terminale è scissa in due

peptidi indicati come X₁ ed X₂ (Carrier et al., 2001). Per il primo non è stato ancora definito il ruolo mentre per il secondo sono state evidenziate omologie di sequenza con il cofattore della proteasi del *Virus del mosaico della vigna* (*Cowpea mosaic virus*, CPMV). Ciò nonostante X₂ non modula l'attività proteolitica in quanto sembra essere coinvolto nel meccanismo di replicazione del virus (Wang e Sanfacon, 2000).

I tratti non codificanti alle estremità 5' e 3' sono simili ma non identici. La lunghezza varia tra i sottogruppi e la maggiore omologia tra queste regioni si riscontra nel sottogruppo C.

Lo studio delle proprietà degli acidi nucleici è un importante parametro per differenziare due specie virali. Il Comitato Internazionale per la Tassonomia dei Virus (International Committee on Virus Taxonomy, ICTV) ha stabilito i seguenti criteri per distinguere le diverse specie:

- identità di sequenza inferiore al 75% tra le sequenze amminoacidiche delle proteine di rivestimento;
- identità di sequenza inferiore all'80% tra le regioni Proteasi-Polimerasi (Pro-Pol) (tale regione si estende dal motivo "GC" della proteasi al motivo "GDD" della polimerasi);
- differenze nella gamma di ospiti;
- assenza di relazioni sierologiche;
- vettori differenti;
- assenza di protezione incrociata;
- assenza di riassortimento tra RNA1 ed RNA2 nel caso di virus con genoma bipartito.

La diffusione di questi virus è legata principalmente ai nematodi vettori ed al materiale di propagazione infetto (semi, marze, talee).

1.2.4 Gamma di ospiti, sintomi e principali malattie da nepovirus

I nepovirus hanno un'ampia gamma di ospiti naturali, sia annuali che perenni e causano, su taluni di essi, manifestazioni sintomatologiche alquanto diverse in relazione al ceppo dell'entità virale, alla specie ed alla varietà della pianta ospite, allo stadio di sviluppo della pianta al momento dell'infezione e alle condizioni ambientali. L'effetto dell'infezione da nepovirus si manifesta in diversi modi, dall'assenza di sintomi alla morte della pianta. La mancanza di sintomi in alcuni ospiti naturali induce a pensare che i nepovirus siano patogeni di piante spontanee che si sono evoluti, poi, in ceppi virulenti nei confronti delle piante coltivate (Kurstak, 1981). I sintomi più ricorrenti per le infezioni da nepovirus sono: maculatura anulare, spesso confluyente in mosaico, schiarimento delle nervature, mosaico, necrosi locale, nanismo.

Alcuni nepovirus possono causare notevoli perdite di produzione e questo si verifica soprattutto per quei virus che infettano specie arboree quali ArMV, il *Virus della maculatura anulare del lampone* (*Raspberry ringspot virus*, RpRSV), il *Virus dell'accartocciamento fogliare del ciliegio* (*Cherry leaf roll virus*, CLRV), ToRSV, il *Virus della maculatura anulare latente della fragola* (*Strawberry latent ringspot virus*, SLRSV), il *Virus della foglia rasposa del ciliegio* (*Cherry rasp leaf virus*, CRLV) ed il *Virus dell'arricciamento della vite* (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV).

Tra i nepovirus alcuni sono diffusi in diverse aree di coltivazione delle specie suscettibili, come ad esempio il GFLV, mentre altri tendono ad avere una distribuzione limitata. Si possono così distinguere nepovirus europei, americani ed asiatici. Alcuni nepovirus quali il *Virus della maculatura anulare del mirtillo* (*Blueberry leaf mottle virus*, BLMoV), *Virus del mosaico con rosettamento del pesco* (*Peach rosette mosaic virus*, PRMV), *Virus della*

maculatura anulare nera della patata (*Potato black ringspot virus*, PBRSV), RpRSV e ToRSV, così come i loro nematodi vettori, non sono mai stati segnalati in Italia e pertanto sono stati inseriti nella lista EPPO dei patogeni da quarantena (EPPO A1 and A2 list of pest recommended for regulation as quarantine pests) in quanto rappresentano una grave minaccia per l'agricoltura del nostro paese. In Fig. 3 sono mostrati alcuni esempi di malattie provocate da nepovirus.

I nepovirus sono stati riscontrati in numerosi ospiti naturali erbacei ed arborei. Tra questi i principali sono: *Rubus laciniatus*, *Vitis vinifera*, *Prunus sp.*, *Ribes nigrum*, *Ribes uva-crispa*, *Fragaria sp.*, *Pelargonium*, *Gladiolus sp.*, *Petunia sp.*, *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Mentha spicata*, *Portulaca oleracea*.



Fig. 3 - Sintomi indotti da GFLV su vite (A), TRSV su tabacco (B) e RpRSV su lampone (C)

Un fenomeno strettamente legato all'infezione da nepovirus è il “*recovery*” o remissione dei sintomi. Infatti, dopo la fase iniziale in cui le piante mostrano sintomi, si assiste alla loro graduale regressione così che la nuova vegetazione ne è sempre meno interessata fino ad apparire sana. Tale fenomeno è stato descritto per la prima volta nel 1927, da Wingard, per una pianta di tabacco infetta con il *Virus della maculatura anulare del Tabacco* (*Tobacco ringspot virus*, TRSV).

Questo fenomeno è stato messo in relazione con il silenziamento genico post-trascrizionale (PTGS) come risposta della pianta alla infezione del virus

che attiva un complesso enzimatico in grado di riconoscere come potenzialmente dannose le forme replicative del virus (dsRNA).

Tuttavia, l'infezione non viene completamente annullata poiché il titolo del virus rimane a livelli molto bassi, livelli che molto probabilmente non alterano il normale ciclo della cellula (Siddiqui et al., 2008) e quindi non sono oggetto di un'ulteriore attività di PTGS. Con questa strategia i nepovirus sono in grado non solo di perpetuare l'infezione sistemica nella pianta, ma anche di accumularsi nei meristemi dove il segnale di silenziamento non arriva, così da essere trasmessi anche attraverso il seme.

L'ampia gamma di malattie e la similitudine tra le sintomatologie indotte da diversi nepovirus nello stesso ospite, non consentono una diagnosi basata esclusivamente sull'osservazioni dei sintomi. Una corretta diagnosi andrebbe sempre confermata con analisi sierologiche oppure molecolari .

Poichè i nepovirus sono facilmente trasmissibili ad indicatori erbacei l'osservazione dei sintomi e la presenza/assenza del “*recovery*” può dare una prima indicazione sull'eziologia della malattia. Gli ospiti erbacei che meglio si prestano allo studio dei nepovirus sono i seguenti: *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. murale*, *Vigna sinensis*, *Nicotiana benthamiana*, *N. rustica*, *N. clevelandi*, *Cucumis sativus*, *Petunia hybrida*, *Gomphrena globosa*.

Le sintomatologie espresse su tali indicatori sono sostanzialmente le stesse che i patogeni inducono alla piante coltivate.

1.2.5 Trasmissione

La trasmissione in campo dei nepovirus è mediata da nematodi vettori, con l'eccezione del *Virus del ribes nero* (*Blackcurrant reversion virus*, BRV) il quale è trasmesso dall'acaro *Tetranychus* sp. (Chu, 1984).

I nematodi descritti come vettori di nepovirus sono tutti Longidoridi appartenenti all'ordine Dorylaimida ed ai generi *Xiphinema*, *Longidorus* e *Paralongidorus*.

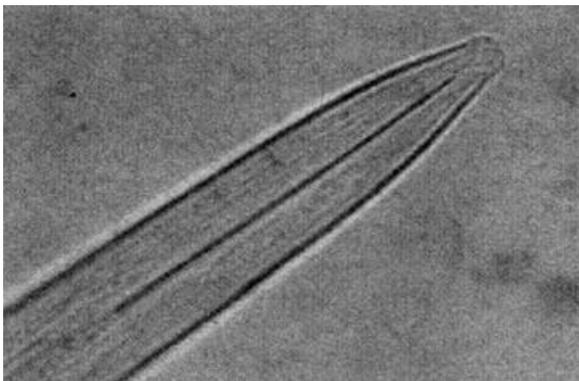


Fig. 4 – Particolare dell'odontostilo di un nematode longidoride

La trasmissione avviene durante l'attività trofica del nematode svolta a carico delle radici delle piante per mezzo di uno stiletto boccale estroflessibile (odontostilo) (Fig. 4). I nematodi acquisiscono le particelle virali durante la propria alimentazione sulle radici di una pianta infetta. Alcuni virioni sono trattenuti extra-cellularmente per adsorbimento a specifici siti di ritenzione situati nel tratto anteriore del canale alimentare. Le particelle virali, dai siti di ritenzione, vengono poi rilasciate ed inoculate nelle cellule vegetali mediante la secrezione salivare emessa nelle piante nella fase iniziale dell'alimentazione. La modalità di trasmissione è quindi molto simile al meccanismo della semipersistenza degli insetti.

Al di là della trasmissione per nematodi in letteratura è stata riportata anche la possibilità di diffusione di tali virus con insetti quali *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, *Melanopus* sp., *Epitrix hirtipennis*, *Thrips tabaci* (principalmente le ninfe), che tuttavia non sono vettori dei virus ma occasionali veicoli di diffusione per la contaminazione delle loro parti boccali.

E', inoltre, riportata la diffusione per seme, polline, innesto, mentre non è mai stata riscontrata trasmissione per contatto tra piante.

1.3.1 Il silenziamento genico

Il silenziamento dell'RNA è, attualmente, uno dei principali argomenti di ricerca in biologia molecolare e nella ricerca biomedica. L'interesse verso questo meccanismo, legato alla regolazione dei geni espressi da un organismo, è cominciato all'inizio degli anni '90 quando per la prima volta fu riscontrato questo fenomeno. Un gruppo di ricerca notò, infatti, che trasformando piante di petunia con un transgene si otteneva, come risultato, il silenziamento sia del transgene che dell'omologo. Nello specifico si tentò di incrementare la produzione di un pigmento, introducendo il DNA codificante questa informazione, mediante l'uso dell'agrobatterio ed il risultato sorprendente fu la totale assenza di pigmentazione nelle petunie trasformate. (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990). Il fenomeno, che si presentava altamente sequenza specifico, fu inizialmente indicato come co-soppressione.

Negli stessi anni un altro gruppo di ricerca svolse esperimenti con il *Virus etch del tabacco* (*Tobacco etch virus*, TEV) ed il risultato fu in accordo con il modello della co-soppressione. In sintesi, vennero prodotte piante di tabacco transgeniche in grado di esprimere la proteina di rivestimento del virus (coat protein, CP) e si appurò che tali piante, inoculate con TEV, erano in grado di superare l'infezione in 3-5 settimane. Le piante mostravano un intenso "recovery", segno che il TEV veniva bloccato dalla co-soppressione indotta dal transgene (Lindbo et al., 1993) (Fig. 5).

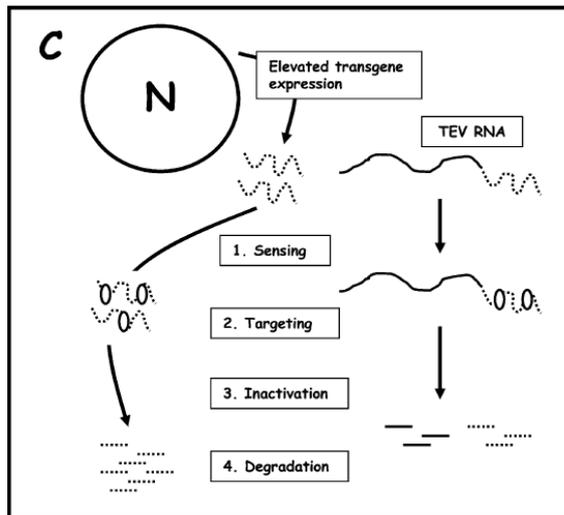


Fig. 5 – Schema della co-soppressione proposto nel 1993 da Lindbo et al.

Il VIGS (*Virus Induced Gene Silencing*) o silenziamento genico indotto da virus, è stato identificato per la prima volta in piante di tabacco transgeniche trasformate con il genoma del *Virus Y della patata* (*Potato virus Y*, PVY). Tali piante sono risultate resistenti ad infezioni di PVY indicando che il virus induce nella pianta transgenica una risposta di difesa che limita la replicazione del virus stesso e questo si verifica in seguito a un appaiamento degli RNA virali con quelli prodotti dalla pianta transgenica (Baulcombe, 1996).

Negli ultimi anni il meccanismo del silenziamento è stato profondamente analizzato giungendo alla conclusione che si verifica quando la pianta presenta un transgene oppure è infettata da un RNA virale; in entrambi i casi si attiva un meccanismo degradativo e difensivo (Eamens et al., 2008).

Lo studio di tale meccanismo difensivo ha condotto ad importanti scoperte che hanno consentito di discriminare tra silenziamento genico trascrizionale (transcriptional gene silencing, TGS) e silenziamento genico post-trascrizionale (Post Transcriptional Gene Silencing, PTGS), espressioni che chiariscono anche la localizzazione del fenomeno: nucleare e citoplasmatica.

Il silenziamento è stato descritto *in primis* nelle piante superiori e, successivamente, analizzato ed esplorato anche in altri organismi. Infatti si parla di “RNA interference” per gli animali, “gene quelling” per i funghi, ma la dizione silenziamento dell’RNA (RNAi) può essere applicata a tutti gli organismi (Hull, 2009).

1.3.2 Il meccanismo del silenziamento nell’interazione pianta-virus

I virus sono composti da un acido nucleico (DNA o RNA) avvolto da una proteina di rivestimento. Il genoma dei fitovirus è molto vario in quanto può mostrarsi lineare, circolare, monopartito o multipartito, a singola o doppia elica e di polarità positiva, negativa o ambisenso. Tali differenze implicano l’adozione di diverse strategie di replicazione il cui unico punto in comune è la produzione di intermedi di replicazione cioè RNA a doppia elica (*double-strand* RNA, dsRNA). La presenza nel citoplasma di dsRNA endogeni, di natura virale o di RNA a singola elica (single-stranded RNA, ssRNA) che formano strutture secondarie a doppia catena (“*hairpins*”, forcine) innesca il silenziamento genico dell’RNA (Virus Induced Gene Silencing, VIGS) come risposta difensiva della pianta (Ding e Voinnet, 2007). Tali RNA a doppia elica sono intercettati da proteine della pianta chiamate DICER (DCL): queste sono delle ribonucleasi di tipo III che tagliano le doppie eliche di RNA generando frammenti di lunghezza compresa tra 20-25 nt (Hull, 2009) detti piccoli RNA virali (viral small RNA, visRNA).

Gli enzimi DICER hanno un peso di circa 200 kDa e possiedono una struttura in grado di legare e tagliare il dsRNA (Fig. 6).

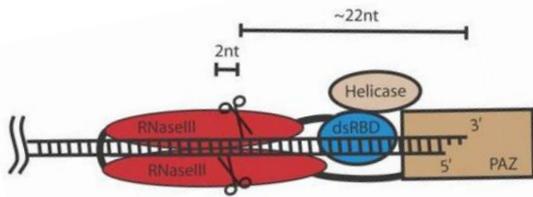


Fig. 6 – Struttura dell'enzima DICER. Il dominio PAZ C-terminale lega l'estremità del dsRNA ed i due domini RNase III provvedono al taglio. La lunghezza dei piccoli RNA prodotti dipende dalla distanza tra i due domini RNase III (in Hammond M. S., 2005)

I piccoli RNA generati dall'azione dei DICER sono stati classificati in microRNA (miRNA) e small-interferingRNA (siRNA): i primi sono coinvolti nella regolazione genica di funzioni fisiologiche naturali e nelle piante sono generati interamente nel nucleo (Vaucheret, 2006), i secondi costituiscono l'elemento chiave del meccanismo di silenziamento poiché evidenziano la presenza di RNA da degradare.

Tra le proteine della famiglia DICER, DCL1 agisce generando miRNA con funzioni di regolazione genica, mentre DCL 2, 3, 4 producono sRNA di lunghezza rispettivamente di 22, 24, 21 nt e sono coinvolti a vari livelli nel PTGS (Hull, 2009). E' stato, inoltre, identificato un ruolo gerarchico tra i DCL tale che in assenza dell'enzima primario il meccanismo di silenziamento possa proseguire per azione del secondario (Pantaleo, 2011).

In seguito all'attività catalitica di DICER a carico dei dsRNA, le eliche dei piccoli RNA prodotti si separano ed una delle due, indicata come elica *guida*, viene incorporata in un complesso enzimatico denominato RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Il RISC attivato procede nell'individuare mRNA con sequenze complementari al piccolo RNA incorporato.

L'attività di degradazione del RISC è svolta da proteine della famiglia *Argonauta* (AGO) che rappresentano l'elemento catalitico del complesso enzimatico.

Le proteine AGO hanno un peso di circa 100 kDa e possiedono due domini C-terminali PAZ e MID, implicati nel riconoscimento del piccolo RNA da caricare, ed un dominio PIWI con attività di tipo RNasi H che presiede alla degradazioni dei ssRNA con sequenza omologa all'RNA guida

(Pantaleo, 2011). Anche per le proteine AGO esiste un meccanismo compensativo che consente al RISC di essere attivo anche in assenza della proteina AGO più attiva.

Come detto in precedenza, il meccanismo del silenziamento vede nella produzione di sRNA un momento chiave in quanto essi guidano il RISC alla degradazione o inattivazione di mRNA con sequenze omologhe. Studiando a fondo l'origine dei piccoli RNA si è scoperto che nel "pathway" del silenziamento esistono sRNA primari e secondari. I primi sono generati dall'azione dei DCL verso i dsRNA mentre i secondi sono generati da DCL che operano su dsRNA generati dall'azione di specifiche polimerasi RNA dipendenti (RDR, a volte indicate con l'acronimo SDE). Queste ultime sintetizzano dsRNA a partire da ssRNA, RNA aberranti, RNA degradati, transgeni, trasposoni. L'attività delle proteine RDR si estrinseca nell'amplificazione e diffusione del segnale di silenziamento all'interno dell'intero organismo (Fig. 7).

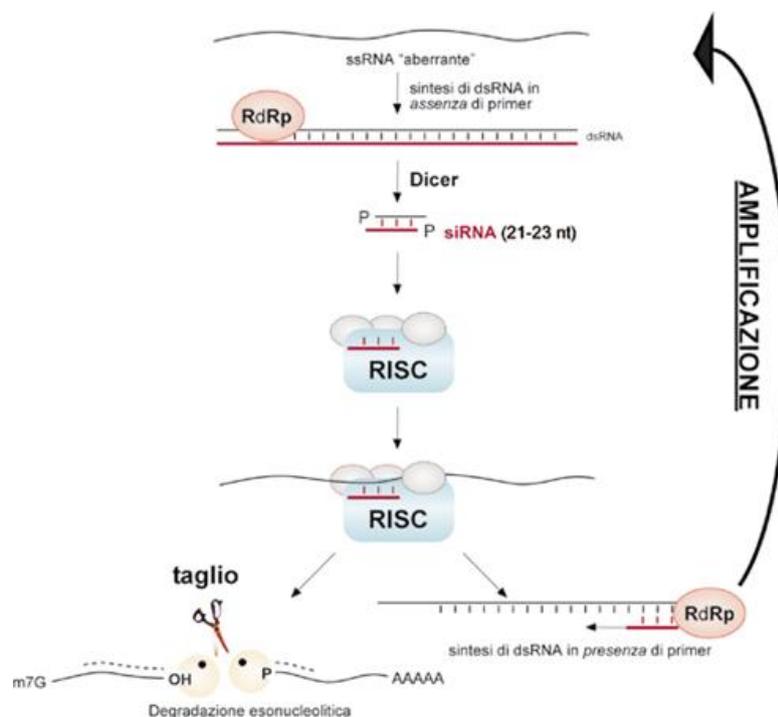


Fig. 7 – Rappresentazione grafica del meccanismo di silenziamento indotto da virus (VIGS).

1.3.3 Soppressione del silenziamento genico

Il silenziamento genico dell'RNA è il principale ostacolo per la replicazione e la diffusione dei fitovirus i quali hanno evoluto una gamma di meccanismi per superare o contrastare tale sistema difensivo. Tra le strategie adottate, la soppressione del silenziamento è la più studiata. La soppressione del silenziamento è mediata da proteine indicate come soppressori del silenziamento (*Viral suppressor RNA silencing, VSR*) oppure dalla struttura secondaria dell'RNA nel caso dei viroidi (Hull, 2009). I soppressori del silenziamento sono stati indicati per lungo tempo come determinanti di patogenicità in quanto in assenza di tali proteine il processo infettivo si arrestava o veniva in qualche modo bloccato nella pianta.

In generale i virus possono ostacolare il silenziamento a 3 livelli differenti:

1. impedendo la produzione di siRNA;
2. ostacolando l'incorporazione dei siRNA nel RISC;
3. interferendo, negativamente, con l'attività del RISC.

I VRS finora identificati appartengono a fitovirus con genoma ad RNA(+), RNA(-) e ssDNA, ed è stato appurato che non esistono omologie di sequenza tra essi. In Tab. 1 sono elencati i soppressori del silenziamento finora identificati nei fitovirus.

Genus	Virus	Suppressor
Carnovirus	Turnip crinkle virus (TCV)	CP
Closterovirus	Beet yellows virus (BYV)	p21
	Beet yellow stunt virus (BYSV)	p22
Cucumovirus	Cucumber mosaic virus (CMV)	2b
	Tomato aspermy virus (TAV)	
Furovirus	Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)	P14
Geminivirus	African cassava mosaic virus (ACMV)	AC2
	Tomato yellow leaf curl virus-China (TYLCV-C)	C2
Hordeivirus	Barley stripe mosaic virus (BSMV)	γ b
	Poa semilatifolia virus (PSLV)	
Pecluvirus	Peanut clump virus (PCV)	P15
Poterovirus	Beet western yellows virus (BWYV)	PO
	Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV)	
Potexvirus	Potato virus X (PVX)	p25
Potyvirus	Potato virus Y (PVY)	HC-Pro
	Tobacco etch virus (TEV)	
Sobemovirus	Rice yellow mottle virus (RYMV)	P1
Tenuivirus ^a	Rice hoja blanca virus (RHBV)	NS3
Tombusvirus	Tomato bushy stunt virus (TBSV)	P19
	Cymbidium ringspot virus (CymRSV)	
Tospovirus ^a	Tomato spotted wilt virus (TSWV)	NS _s

Tab. 1 – Soppressori del silenziamento genico dell'RNA identificati in fitovirus. In Rott et al., 2004.

Il primo soppressore identificato è la proteina che consente la trasmissione dei virioni da parte degli afidi (*Helper Component*, HC-Pro) dei *Potyvirus*. Tale proteina contrasta il silenziamento a diversi livelli, impedendo la normale attività dei DICER, del RDR e del RISC attivato (Anandalakshmi et al., 2000). Inoltre, è stata riportata un'interazione tra HC-Pro ed il meccanismo di separazione delle eliche dei sRNA (Chapman et al., 2004).

Tra i VRS il più studiato è la proteina p19 codificata dal genoma dei *Tombusvirus*. Tale proteina blocca il meccanismo di silenziamento sequestrando i sRNA di 21 nt ed impedendo, quindi, l'attivazione del RISC (Silhavi et al., 2002; Lakatos et al., 2004). La conferma circa la funzione svolta da P19 si è avuta analizzando la struttura del peptide il quale si mostra

come un eterodimero in grado di riconoscere e legare i piccoli RNA lunghi 21 nt (Fig. 8).

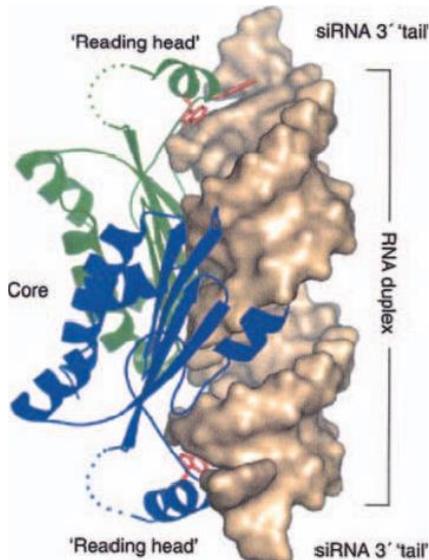


Fig. 8 – Struttura del soppressore del silenziamento p19 legato al piccolo RNA. La proteina viene indicata come “pinza molecolare” poiché i monomeri (indicati in blu ed in verde) misurano e legano i piccoli RNA di 21 nt presenti nella cellula. In Hull, 2009.

E' stato recentemente dimostrato che la proteina p19, oltre a bloccare l'attivazione del RISC sequestrando i piccoli RNA, modula l'espressione di AGO1 controllando un miRNA specifico (miRNA168) (Varallyay et al., 2013). Altri soppressori mostrano di poter inibire o alterare il normale processo di silenziamento alterando il “pathway” in fasi differenti. Ad esempio le proteine p14 (*Pothos latent virus*, PLV) e p38 (*Turnip crinkle virus*, TCV) sono in grado di legare sia i sRNA che i dsRNA ed inoltre mostrano un'attività anti-DICER4 (Deleris et al., 2006). La proteina 2b del *Virus del mosaico del cetriolo* (*Cucumber mosaic virus*, CMV) agisce contemporaneamente a più livelli in quanto ha la capacità di sequestrare sRNA, prevenire la diffusione del segnale di silenziamento nella pianta (Guo e Ding, 2002) e interagire con i domini PAZ e PIWI di AGO1 alterando la modalità di degradazione degli mRNA (Zhang et al., 2006). La scoperta dei meccanismi di funzionamento di queste proteine e lo studio dei loro meccanismi di azione servirà a chiarire ulteriormente il binomio infezione virale/sintomi.

Poiché molti soppressori agiscono a livello della biogenesi dei piccoli RNA, è ormai consolidata l'idea che la presenza di una proteina, in grado di legare sia siRNA che i miRNA, alteri la normale fisiologia della pianta inducendo le manifestazioni sintomatologiche che normalmente si riscontrano. Ciò è stato dimostrato in esperimenti con piante transgeniche che esprimono il soppressore virale e che manifestano i tipici sintomi di una pianta malata pur in assenza del patogeno nei propri tessuti (Chapman et al., 2004; Dunoyer et al., 2004; Kasschau et al., 2004).

1.4 La pianta modello *Arabidopsis thaliana*

L'*Arabidopsis thaliana* è una specie appartenente alla famiglia delle *Brassicaceae* ed è ampiamente diffusa nel mondo. Molti ecotipi sono stati individuati in popolazioni naturali e sono disponibili per analisi sperimentali; ciò nonostante gli ecotipi Columbia e Landsberg sono i due standard di riferimento per gli studi di genetica e biologia molecolare.

L'intero ciclo vitale, dalla semina alla raccolta dei frutti, necessita di sole sei settimane. Ogni porzione della pianta è molto piccola: i fiori sono lunghi 2 mm, sono autofertili ma possono essere incrociati applicando il polline sulla superficie dello stigma; i semi sono lunghi 0,5 mm e sono prodotti in silique; le giovani piantine hanno una conformazione a rosetta il cui diametro varia tra 2 e 10 cm a seconda delle condizioni di crescita (Fig. 9). Le foglie sono coperte da peli unicellulari (tricomi) spesso utilizzati come modello per studi di morfogenesi e differenziazione cellulare.

Le piante mature possono raggiungere i 15-20 cm in altezza ed hanno la capacità di emettere centinaia di silique contenenti più di 5000 semi.



Fig. 9 – Mutanti di *Arabidopsis thaliana*.

Il genoma dell'*A. thaliana* è organizzato in 5 cromosomi e contiene circa 20000 geni. Diverse migliaia di mutanti di *Arabidopsis*, difettivi in uno o più geni, sono stati prodotti negli anni. Tra questi ne esistono diversi con mutazioni in geni coinvolti nella fioritura, nella senescenza, nello sviluppo radicale, nella risposta ai patogeni, nei “*pathway*” metabolici ed in molti processi cellulari e fisiologici.

In *Arabidopsis* sono state identificate 6 proteine RDR, 4 proteine DICER e 10 proteine AGO e mediante opportune trasformazioni mediate da *Agrobacterium tumefaciens*, sono stati prodotti mutanti singoli, doppi, tripli e quadrupli, in diverse combinazioni per ognuno dei geni codificanti le proteine citate. Oltre ai genotipi mutanti esistono numerose linee “*reporter*” utili per svolgere “*screening*” preliminari. Ad esempio la linea SUC-SUL viene utilizzata per studi sul silenziamento. Questo genotipo presenta un costrutto ripetuto ed invertito che generando piccoli RNA interferenti silenzia il trascritto *SULPHUR*. Il risultato è uno schiarimento delle nervature molto netto (Fig.10) a causa dell'assenza di clorofilla nelle cellule del fasci vascolari. In presenza di un soppressore del silenziamento tale schiarimento regredisce e si ripristinata la normale pigmentazione delle nervature.



Fig. 10 – *Arabidopsis thaliana* linea reporter SUC-SUL.

1.5 Le Xerofite /Classificazione e caratteri botanici del genere *Aeonium*

Le xerofite sono piante adattate a vivere in condizioni di penuria di acqua ed a sopravvivere a lunghi periodi di siccità. Presentano caratteristiche peculiari, come la riduzione della superficie di traspirazione, la presenza di peli ed altri adattamenti atti a ridurre al minimo la perdita d'acqua (Rowley, 1994).

La differenza fisiologica principale tra le xerofite e le mesofite, cioè le piante che vivono in presenza di acqua, risiede nella capacità, da parte delle prime, di svolgere l'attività fotosintetizzante utilizzando l'anidride carbonica e l'acqua prodotta con la respirazione e non attraverso uno scambio gassoso diurno. Tale fenomeno è stato descritto, per la prima volta, nel 1813 (Heyne, 1814) nella famiglia *Crassulaceae*, da cui il nome dato al loro ciclo fisiologico "Metabolismo acido delle *Crassulaceae*" (Crassulacean Acid Metabolism, CAM).

Le *Crassulaceae* (Classe *Magnoliopsida*, Ordine *Saxifragales*) sono una famiglia botanica ampia e le specie in essa racchiuse ben si adattano ai diversi climi del mondo, dal caldo torrido del deserto africano al freddo glaciale delle zone polari. La maggior parte delle specie sono perenni con fusti erbacei, poche sono le specie annuali o biennali.

La famiglia *Crassulaceae* comprende diversi generi tra i quali il genere *Aeonium*, il cui nome deriva dal greco "aionios" cioè senza fine, che esprime la principale caratteristica fisiologica di tali piante. Gli *Aeonium* sono originari delle isole Canarie e tra essi sono annoverate 37 specie botaniche prevalentemente erbacee e perennanti. Il fusto si presenta più o meno alto, semplice o ramificato, legnoso, con foglie a rosetta all'estremità dei rami. I fiori hanno 8 o più petali, altrettanti carpelli e stami in numero doppio in

infiorescenze generalmente grandi e ramificate. Essi sono piccoli (1 – 1,5 cm di diametro), bianchi con o senza venature viola, rosa o rossi, uniti in racemi.

Scopo della tesi

Nel marzo 2011, in un giardino privato di Scafati, sintomi riconducibili ad infezione virale sono stati individuati in alcune piante di *Aeonium* sp. La sintomatologia osservata consisteva in macule e anelli clorotici visibili su entrambe le pagine fogliari, particolarmente evidenti nei mesi più caldi (Fig.11) I sintomi osservati erano ben distribuiti sull'intera pianta.

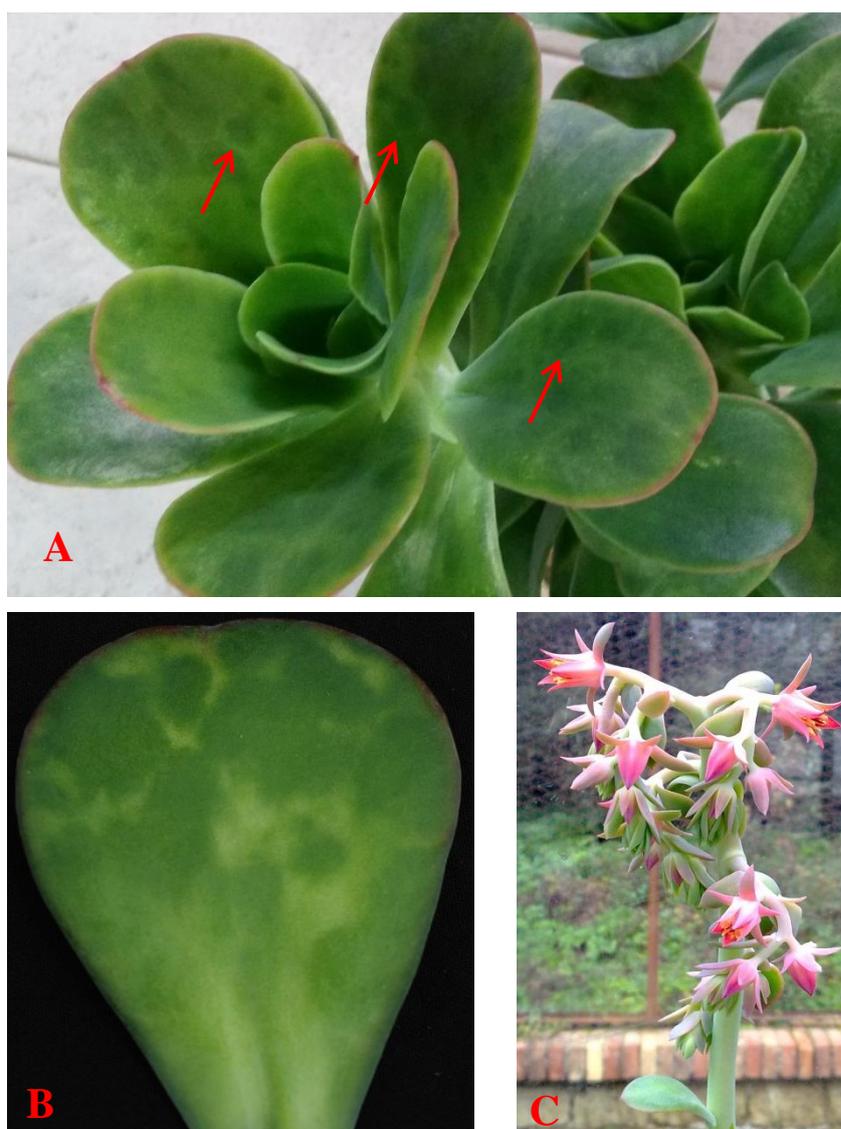


Fig. 11 – A) Pianta di *Aeonium* sintomatica; B) Particolare dei sintomi; C) Infiorescenza con fiori aperti e chiusi.
Le frecce rosse indicano i sintomi visibili sulle foglie.

Le indagini preliminari, svolte per comprendere la natura dei sintomi osservati, hanno indicato la presenza di un nepovirus nei tessuti della pianta succulenta. Pertanto, il lavoro descritto in questa tesi è stato svolto per:

- caratterizzare il virus dal un punto di vista biologico, sierologico e molecolare;
- determinare la potenziale pericolosità del virus per le piante di interesse agrario;
- comprendere il ruolo del silenziamento genico post-trascrizionale nella replicazione del virus;
- effettuare lo studio delle interazioni pianta-virus, con particolare riferimento ai meccanismi con cui il virus supera le difese della pianta.

Materiali e Metodi

3.1 Trasmissione meccanica

Il virus è stato isolato da *Aeonium* effettuando prove di trasmissione meccanica ad ospiti erbacei. La tecnica consiste nell'allevare diverse specie vegetali (piante test) in condizioni di crescita controllate, inoculandole con il succo vegetale, ottenuto dai tessuti sintomatici della pianta infetta, nella fase di maggiore suscettibilità .

La trasmissione meccanica, o per contatto, si realizza strofinando il succo estratto sulle foglie delle piante test cosparse di un opportuno agente abrasivo (celite, carborundum).

Per le prove di trasmissione meccanica sono stati utilizzati i seguenti indicatori biologici ed ortive: *Chenopodium murale*, *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *Citrullus lanatus* cv. Crimson, *Cucumis melo* cv. Proteo, *Cucurbita pepo* cv. Myconos, *Cucumis sativus*, *Ocimum basilicum*, *Vigna unguiculata*, *Phytolacca americana*, *Capsicum annum* cv. Friariello, *Datura stramonium*, *D. metel*, *Lycopersicon esculentum* cv. Principe Borghese, *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. rustica*, *N. silvestris*, *N. tabacum* cv. Samsun, *N. tabacum* cv. White Burley.

L'inoculo è stato preparato tritutando dischetti di foglie sintomatiche di *Aeonium* in un mortaio di porcellana, raffreddato in ghiaccio, in presenza di tampone fosfato 0,1 M pH 7,2, nel rapporto 1/5 (w/v). Il succo così ottenuto è stato applicato sulle foglie delle piante test, precedentemente cosparse di carborundum 600 mesh. Cinque min dopo l'inoculazione l'eccesso di inoculo è stato rimosso sciacquando le foglie con acqua sterile.

Le piante sono state mantenute in serra termocondizionata a 25°C ed osservate quotidianamente per 4 settimane.

3.2 Purificazione del virus

Per studiare le proprietà chimiche, fisiche e biologiche di un virus è necessario disporre di un preparato purificato che mantenga le proprietà infettive. Una purificazione consiste nel separare le particelle virali da tutti i componenti della cellula vegetale nella quale il virus si replica. In letteratura sono descritti numerosi protocolli di purificazione per le diverse specie virali. Lo schema generale di un protocollo può essere sintetizzato come segue:

- Propagazione del patogeno in una specie suscettibile;
- raccolta del materiale vegetale infetto;
- triturazione in tampone di estrazione;
- sedimentazione;
- chiarificazione dell'estratto;
- risospensione del pellet.

Per la purificazione del virus è stato essenzialmente seguito il protocollo descritto da Pinck et al. (1989) con alcune modifiche. Il virus è stato propagato in *N. benthamiana*; circa 30 grammi di tessuto fogliare infetto sono stati omogenati in 5 volumi di tampone fosfato di sodio 0,1 M pH 7,0, contenente acido ascorbico 0,1 M ed EDTA 0,01 M. L'omogenato è stato addizionato, goccia a goccia, con butanolo 8,5% (v/v) e lasciato in agitazione 15 min a freddo. Dopo chiarificazione dell'estratto a 10000 rpm per 10 min, le particelle virali sono state precipitate addizionando polietilene glicole (PEG 6000) all'8% e cloruro di sodio 0,2 M e raccolte, dopo un'ora, mediante centrifugazione a 10000 rpm. Il pellet è stato risospeso in 8 ml di tampone citrato di sodio 0,2 M, e sottoposto ad ultracentrifugazione (Beckman Ti-40) a 36000 rpm per 60 min. Il pellet risultante è stato risospeso in tampone citrato

di sodio 0,02M ed analizzato al TEM. La concentrazione del virus è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro a 260 e 280 nm.

3.3 Microscopia elettronica

L'osservazione e lo studio della forma e delle dimensioni delle particelle virali sono requisiti primari per l'identificazione di un fitovirus e, in molti casi, possono rappresentare un metodo rapido per l'identificazione del gruppo al quale appartiene un virus sconosciuto.

Sono state svolte osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) dei virioni in:

- "dip method" (adsorbimento su goccia) di parziale purificato e foglie infette.
- sezioni ultrasottili di foglie di *N. benthamiana* infette.

Nel caso del "dip method" il campione è stato preparato seguendo il seguente protocollo. Circa 200 mg di tessuto fogliare sono stati tritati in 400 µl di tampone fosfato 0,05 M pH 7,0 ed il succo grezzo ottenuto posizionato su superficie idrofoba (parafilm). Una griglia da microscopia elettronica da 400 mesh è stata adagiata sul succo, con il lato carbonato rivolto verso la goccia, per circa 2 min. La griglia è stata successivamente lavata con 200 µl di tampone fosfato 0,05 M pH 7,0 e 200 µl di acqua bidistillata. Infine si è proceduto alla colorazione negativa utilizzando 200 µl di acetato di uranile al 2%. L'eccesso di acetato di uranile è stato rimosso con carta Whatmann 3MM.

Per l'ottenimento di sezioni ultrasottili, i tessuti di foglie sistemicamente infette di *N. benthamiana* sono stati trattati secondo il protocollo descritto da Martelli e Russo (1984). Il campione è stato fissato in

4% glutaraldeide in tampone fosfato 0,05 M, lavato con fosfato di sodio 0,05 M, post-fissato in tetrossido di osmio all'1% per due ore e lasciato per una notte in soluzione di acetato di uranile al 2%. Successivamente, si è proceduto alla disidratazione dei tessuti in serie alcoolica (Tab. 2) e all'inclusione in resina epossidica (Spurr). Le sezioni ultrasottili sono state ottenute con ultramicrotomo LKB. Le sezioni sono state raccolte su griglie rame-rodio (Cu-Rd) da 600 mesh, colorate con citrato di piombo e i preparati colorati negativamente sono stato osservati e fotografati con il microscopio elettronico a trasmissione Philips Morgagni 282D.

Tab. 2 – Schema disidratazione in serie alcoolica

Disidratazione in serie alcoolica	
3 lavaggi in tampone fosfato 0,1 M a 4°C di 10 min ciascuno	4°C
Alcool 30%, 2 cambi di 10 min ciascuno	
Alcool 50%, 2 cambi di 10 min ciascuno	
Alcool 70%, 1 cambio di 10 min	
Una notte in alcool 70%	
Alcool 80%, 2 cambi di 5 min ciascuno	t. amb
Alcool 95%, 2 cambi di 15 min ciascuno	
Alcool 100%, 4 cambi di 15 min ciascuno	

3.4 Sierologia

I test sierologici sono utili per l'identificazione di un virus ed importanti per lo studio delle relazioni tra isolati e ceppi virali. Tali test si basano su l'interazione specifica tra anticorpi e antigeni.

Per l'ottenimento di anticorpi specifici nei confronti del nepovirus isolato da *Aeonium*, il purificato virale è stato mescolato con l'adiuvante incompleto di Freund in rapporto 1:1 ed iniettato intramuscolo ad un coniglio di razza "New Zealand". Tale operazione è stata effettuata con cadenza settimanale per tre settimane. Due settimane dopo la terza iniezione è stato prelevato il sangue e sono state separati il siero e la parte figurata. Il titolo dell'antisiero è stato determinato con il metodo della doppia diffusione in gel di agar (0,8% agar, 0,85% NaCl, 0,02% sodio azide).

Il metodo della doppia diffusione in agar è stato applicato successivamente utilizzando l'antisiero specifico ottenuto e, come antigeni, il nepovirus da *Aeonium* e TRSV. Nel gel sono stati effettuati 3 fori da 3 mm, uno centrale e due laterali. Nel foro centrale stati versati 20 µl di antisiero grezzo, mentre nei laterali 20 µl di antigene (rispettivamente il nepovirus e TRSV).

3.5 Das-ELISA

Le tecniche di rilevamento di fitovirus sono molteplici, ma l'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) è probabilmente la più semplice ed utilizzata.

Le particelle virali, presenti anche in bassa concentrazione in estratti ottenuti da piante infette, sono catturate dagli anticorpi adesi ai pozzetti di una

piastra in polistirene consentendo la reazione con un secondo anticorpo al quale è coniugato l'enzima (fosfatasi alcalina oppure perossidasi) in grado di convertire il colore di un substrato. La variazione di colore dipende dalla concentrazione del virus nei tessuti dell'ospite ed è quantificabile utilizzando uno spettrofotometro. L'antisiero ottenuto per il virus da *Aeonium* è stato coniugato con l'enzima fosfatasi alcalina.

Il kit ELISA prodotto per il virus oggetto di studio è stato saggiato utilizzando diverse diluizioni per il primo e secondo anticorpo (Fig. 12). Nello schema la prima colonna non è stata caricata con nessun campione vegetale.

II Anticorpo		1/100	1/500	1/1000	1/100	1/500	1/1000	1/100	1/500	1/1000	1/1000	1/2000
Nepo Aeon												
Sano N. Benth												
Sano C. quin												
TRSV												
I Anticorpo		1/100			1/500			1/1000			1/2000	

Fig. 12 – Schema ELISA.

La validazione del protocollo è stata realizzata eseguendo più esperimenti e variando il protocollo in alcune fasi. Il succo vegetale è stato ottenuto tritando porzioni di pianta in tampone di estrazione PBS-Tween20-PVP (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂KPO₄ 2H₂O 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, Tween-20 0,05%, PVP 40K 2%, pH 7,4). La precisione del metodo è stata valutata prendendo in considerazione i diversi valori dei controlli positivi, mentre la validità del metodo è stata valutata utilizzando diverse parti della pianta (foglie, fiori, fusto) e variando il tempo di triturazione dei campioni (20, 30, 40 s).

Il primo antisiero è stato diluito in tampone carbonato (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, 3 mM NaN₃, pH 9,6) e 200 µl della diluizione aggiunti in

ogni pozzetto. Dopo 3 ore di incubazione a 37°C la piastra è stata lavata 5 volte con tampone di lavaggio PBS-Tween 20 e sono stati addizionati 200 µl di succo vegetale. Dopo l'aggiunta dell'antigene la piastra è stata lasciata in incubazione a 4°C per una notte ed il giorno seguente è stata lavata con tampone di lavaggio 5 volte. Il secondo antisiero è stato diluito in tampone di estrazione, 200 µl sono stati aggiunti in ogni pozzetto e la piastra è stata incubata a 37°C per 3 ore.

Dopo l'incubazione la piastra è stata lavata per 5 volte con tampone di lavaggio e sono stati aggiunti 200 µl di substrato (20 mg di 4-paranitrofenilfosfato diluiti in 9,7% dietanolammina pH 9,8).

Sono state svolte letture della piastra a 405 nm ogni 10-15 minuti.

I campioni sono stati considerati positivi al raggiungimento di un valore di densità ottica (OD) pari a due volte il valore del campione sano.

3.6 Analisi proteina del capsid

La proteina capsidiale è stata analizzata in gel discontinuo di poliacrilammide.

Il gel è costituito da una componente superiore, detta “*stacking*” (di impacchettamento), ed una inferiore, detta “*resolving*” (di separazione). La composizione dei due gel è schematizzata in Tab. 3.

Tab. 3 – Composizione del gel di poliacrilammide.

SDS-PAGE 12% (10ml)		SDS-PAGE 5% (10 mL)	
H ₂ O	3,3 ml	H ₂ O	6,8 ml
Tris-HCl pH 8.8 1.5 M	2,5 ml	Tris-HCl pH 6.8 1.5 M	1,25 ml
Acrilamide/bis 30%	4 ml	Acrilamide/bis 30%	1,7 ml
SDS 10%	100 µl	SDS 10%	100 µl
APS 10%	100 µl	APS 10%	100 µl
Temed	10 µl	Temed	10 µl

La polimerizzazione del gel è avvenuta tra lastre di vetro con spaziatori di 1,5 mm.

Il parziale purificato (30 µg) è stato diluito in tampone di Laemmli 1X (TRIS-HCl, pH 6,8 250 mM, glicerolo 40%, SDS 5%, blu di bromofenolo 0,005%, β-mercaptoetanolo 10%), denaturato per 5 min in acqua bollente e caricato sul gel. La corsa elettroforetica è stata effettuata a 25 mA costanti.

Il gel è stato colorato con soluzione Comassie Brilliant Blue (0,1% Comassie Brilliant Blu, metanolo 50%, acido acetico 10%) e decolorato per 24 ore con una soluzione decolorante (25% metanolo, 7,5% acido acetico).

3.7 Estrazione di RNA

3.7.1 RNA da tessuti infetti

L'RNA totale (TNA) è stato estratto seguendo il protocollo descritto in Dalmay et al. (1993). Il tessuto fogliare (100 mg) è stato tritato in mortaio di porcellana freddo in presenza di 600 μ l di tampone di estrazione (100 mM Glicina-NaOH pH 9,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% SDS, 1% NLS); il succo ottenuto è stato trasferito in tubo eppendorf contenente 600 μ l di fenolo saturato con acqua, sottoposto ad agitazione su vortex per 60 s e centrifugato per 2 min. La fase acquosa risultante è stata ulteriormente estratta con 600 μ l di fenolo-cloroformio (1:1) e successivamente solo con cloroformio. L'RNA è stato precipitato con 2,5 volumi di etanolo assoluto in presenza di sodio acetato 0,3 M, pH 5,5 a -20°C . Dopo un'ora, l'RNA è stato centrifugato per 20 min a 4°C , il pellet lavato con etanolo al 70% e risospeso in acqua sterile.

3.7.2 RNA da particelle

200 μ l di parziale purificato sono stati mescolati con 200 μ l di tampone di estrazione (100 mM Glicina-NaOH pH 9,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% SDS, 1% NLS) e 400 μ l di fenolo saturato con acqua. Il tubo eppendorf è stato agitato su vortex per 60 s. Dopo centrifugazione per 2 min a 13000 rpm la fase acquosa è stata trasferita in tubo eppendorf contenente 200 μ l di fenolo saturato con acqua e 200 μ l di cloroformio. Il tubo è stato agitato su vortex 60 s e centrifugato 2 min. La fase acquosa risultante è stata addizionata di 400 μ l di cloroformio, agitata su vortex e centrifugata. L'RNA estratto è stato precipitato come descritto nel paragrafo precedente.

La concentrazione dell'RNA è stata determinata spettrofotometricamente. Un μg di RNA è stato, denaturato a 65°C per 5 min in 50% formamide deionizzata-EDTA e raffreddato rapidamente in ghiaccio per 2 min. Il campione così preparato è stato caricato su gel di agarosio (1,2%) in tampone Tris-Borato-EDTA (TBE). La corsa è stata effettuata a 100 V costanti ed il campione è stato visualizzato mediante colorazione con etidio bromuro.

3.8 Clonaggio molecolare

3.8.1 Retrotrascrizione dell'RNA genomico

La sintesi del cDNA è stata realizzata con il kit “cDNA Synthesis System” (Roche Applied Science, Mannheim, Germania). La reazione di retrotrascrizione è stata innescata con un oligo d(T)_{24} oppure con primer specifici disegnati *ad hoc* utilizzando, come stampo, 2 μg di RNA estratto da particelle virali purificate. La reazione è stata incubata a 42°C per un'ora. La seconda elica di cDNA è stata ottenuta degradando l'elica di RNA con un lieve trattamento con RNasi H, ed utilizzando i prodotti di tale degradazione come innesco per l'azione dell'enzima DNA polimerasi I. Le estremità del prodotto ottenuto sono state rese “*blunt*” utilizzando l'enzima T4 DNA polimerasi.

Il prodotto ottenuto è stato estratto con fenolo-cloroformio, precipitato con etanolo assoluto e risospeso in 6,5 μl di acqua sterile.

3.8.2 Preparazione del vettore plasmidico e ligazione

Il ds-cDNA ottenuto è stato clonato in vettore plasmidico pUC19, contenente il gene per la resistenza all'ampicillina. Il vettore è stato linearizzato mediante digestione con l'enzima *Sma*I e successivamente trattato con 10 U di fosfatasi alcalina di intestino di vitello (*Calf intestinal alkaline Phosphatase*, CIP, New England Biolabs) per 60 min a 37°C, per defosforilare le estremità del plasmide.

Il plasmide linearizzato e defosforilato è stato successivamente purificato su gel di agarosio "*Low Melting Point*" (LMP), mediante eluizione della banda, estrazione fenolica e precipitazione alcoolica in presenza di tRNA (5 µg) e 0,2 M NaCl.

Il ds-cDNA è stato inserito nel plasmide, trattato con *Sma*I e CIP, utilizzando l'enzima T4 DNA ligasi (200 U). La mix di reazione è stata incubata a 25°C per circa 3 ore. Come controllo della qualità del vettore preparato, il plasmide linearizzato è stato "ligato" in assenza dell'inserito nelle stesse condizioni.

3.8.3 Preparazione delle cellule competenti

Sono stati inoculati 3 ml di LB (mezzo di coltura Luria-Bertani) con una colonia di *Escherichia coli*, ceppo XL-Blue1, e incubati in agitazione a 250 rpm per 15 ore a 37°C (coltura satura).

10 ml di LB sono stati inoculati con 20 µl di coltura batterica satura ed incubati a 37°C in agitazione fino al raggiungimento di una densità ottica A_{600} pari a 0,6 O.D. La sospensione batterica è stata trasferita in tubo sterile da 10 ml, centrifugata a 6000 rpm per 5 min, risospesa in tampone di trasformazione (50 mM cloruro di calcio, 10 mM Tris, pH 7.6, 50 µg/ml timidina) e lasciata

in ghiaccio per 20 min. Successivamente la coltura batterica è stata centrifugata per 5 min a 6000 rpm e risospesa in 600 µl di tampone di trasformazione. Le cellule sono state lasciate a 4°C ed utilizzate entro 24 ore.

3.8.4 Trasformazione batterica

La miscela di ligazione (5 µl) è stata posta a contatto con 100 µl di cellule competenti in tubo sterile da 10 ml in ghiaccio per 30 min e poi sottoposta a shock termico a 42°C per 45 s. La coltura batterica trasformata è stata incubata a 37°C per un'ora dopo l'aggiunta di 500 µl di LB, in leggera agitazione (150 rpm), per permettere lo sviluppo della resistenza all'ampicillina.

La coltura batterica trasformata (200 µl) è stata distribuita su piastre di LB-agar contenente ampicillina (75 µg /ml), precedentemente trattate con 40 µl di IPTG (0,1 M), 40 µl di X-Gal (20 mg/ml) allo scopo di distinguere le colonie derivanti dalla trasformazione con il vettore contenente un inserto di DNA (bianche) da quelle con il vettore vuoto (blu). Le piastre sono state lasciate in incubazione a 37°C per 14 ore.

3.9 Estrazione ed analisi del DNA plasmidico

Le colonie contenenti l'inserto sono state trasferite su substrato (LB) agarizzato contenente ampicillina ed inoculate in 3 ml di LB liquido contenente lo stesso antibiotico.

Il DNA plasmidico è stato estratto con il kit "Nucleospin Plasmid" della Macherey-Nagel (Düren, Germania). In breve, le cellule batteriche sono state

lisate con appositi soluzioni tampone per liberare il DNA plasmidico; questo è stato legato ad una speciale membrana di silice contenuta in colonnine pronte all'uso che hanno consentito l'allontanamento del lisato cellulare e l'eluizione del DNA plasmidico purificato.

Il DNA plasmidico (200 ng) è stato opportunamente digerito con enzimi di restrizione per stimare la dimensione degli inserti. Le digestioni enzimatiche sono state visualizzate dopo corsa elettroforetica in gel d'agarosio 1,2% e colorazione con bromuro di etidio (10 µg/ml).

3.10 Sequenziamento del genoma virale

I cloni di maggiore dimensione sono stati sequenziati con il metodo Sanger utilizzando un servizio di sequenziamento esterno (MWG Operon EuroFins, Ebersberg, Germania). Ogni clone è stato sequenziato in due direzioni e la sequenza ottenuta è stata confermata su cloni diversi. Le sequenze nucleotidiche sono state assemblate ed analizzate con l'ausilio del software DNA Strider 1.4 (Marck, 1988) e dei programmi del gruppo EMBOSS disponibili on-line al seguente collegamento <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/>.

Il confronto con le sequenze nucleotidiche presenti in banca dati è stato realizzato con BLAST (Altschul et al., 1990)

3.11 Determinazione del primo nucleotide degli RNA genomici mediante 5'-RACE

Le sequenze al terminale 5' di entrambi gli RNA genomici sono state analizzate mediante il kit "5'/3' Race Kit" (Roche Applied Science, Mannheim, Germania). E' stato sintetizzato un cDNA utilizzando l'oligonucleotide R4 N (posizione). A questo sono stati aggiunti, all'estremità 3', dei residui di guanina (GTP) mediante l'azione dell'enzima "Terminal deoxynucleotidil Transferasi" (Tdt). Tale enzima, in presenza di cationi bivalenti, catalizza l'addizione di code omopolimeriche ad eliche a singolo filamento di DNA. Il cDNA risultante è stato usato come stampo per una reazione di amplificazione mediante PCR condotta con la coppia di oligo dq21/R4N e l'enzima *Taq* DNA polimerasi. Il prodotto di PCR è stato clonato nel vettore plasmidico pGEM-T-easy (Promega, Madison, USA). Il nucleotide terminale è stato determinato sequenziando 10 cloni diversi.

3.12 Amplificazione tramite PCR del genoma virale

L'intero genoma virale è stato risequenziato in seguito ad amplificazione tramite reazione a catena della polimerasi (PCR). In Tab. 4 è riportato lo schema utilizzato per allestire la reazione di PCR.

Tab. 4 – Schema per la preparazione della reazione di PCR

10X PCR Buffer	50 μ l
10 mM dNTPs mix	1 μ l
50 mM MgCl ₂	1,5 μ l
Oligo senso 10 mM	2,5 μ l
Oligo antisenso 10mM	2,5 μ l
cDNA	0,5-10 μ l
<i>Taq</i> polimerasi (5 U/ml)	0,5 μ l
Acqua sterile	fino a 50 μ l

In Tab. 5 è riportato lo schema delle condizioni di amplificazione

Tab. 5 – Condizioni di amplificazione utilizzate

Denaturazione iniziale	95°C	3 min	
Denaturazione	95°C	30 s	35 cicli
Appaiamento	T _m - 5°C	30 s	
Estensione	72°C	30 s	
Estensione finale	72°C	10 min	

Le coppie di oligonucleotidi specifiche per i due RNA genomici sono elencate in Tab. 6.

Tab. 6 – Oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione ed il sequenziamento del genoma del nepovirus isolato da *Aeonium*

RNA2 5'	senso	TTGAAAATTCCTCACAGGGTTCCC
RNA2 3162 N	antisenso	GCCAACCAGTAGCTGCAACAAGCCAGA
RNA2 1968 P	senso	GGCCCCTACAGTAGTTCCTGACCGG
RNA2 2216 N	antisenso	CCACCTAGTGCTGCAACGTCTATCC
RNA2 970 P	senso	CCAAAGGAGGTGTCCAGCGCCC
RNA2 1259 N	antisenso	GAGTTCCTCCACCCCTTCTCAA
RNA2 565 N	antisenso	CCGGAAGAGACTCACAGAACTCACGCTCC
RNA2 4 N	antisenso	GAGGGCTCCATTGGAGCAG
Eco-ClaRNA2	senso	ggaattcatcgatTAATACGACTCACTATAggTTGAAAATTCCTCACA
RNA2 3987	antisenso	GTGTTGACAAACACGACACTAAGA
RNA2 3794	senso	CCTCGGCACAAGTGAAAACGAC
Oligo d(T)-Sma-Xba	antisenso	gctctagagctccccggggaTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
RNA1 7094 P	senso	CCAGGAGCAGCCCTTCTGATC
RNA1 2414 N	antisenso	CCATGCCCCGCAACAGTTTATGGCC
RNA1 1529 N	antisenso	CCTTGTC AAGTACACCGTTTGC GATGCC
RNA1 327 N	antisenso	GGGGCATCGAGAGACACCCACGCTGG
RNA1 93 N	antisenso	GGCAGTAAAAGCCCATAGTCACAGTGG
RNA1 11Rev 4757 N	antisenso	GGATCATCTGCCACAAGCACACTGGG
RNA1 9Rev 6455N	antisenso	CCCCTGTGTGTGCTGCATGCAC
RNA1 – 4022 N	antisenso	GGACCACGAATTGCATTCACCACAGG
RNA1 – 3812 P	senso	GGAGGTTCTGCTGTTGGGGGTATGG

3.13 Clonaggio nel vettore plasmidico pGem-T

I prodotti di PCR ottenuti sono stati clonati nel vettore plasmidico pGEM-T-easy (Promega, Madison, USA). La reazione è stata condotta in 10 μ l totali, utilizzando 50 ng (1 μ l) di vettore plasmidico, 3 unità di T4 DNA ligasi (1 μ l) e quantità opportune di prodotto di PCR purificato.

3.13.1 Purificazione dei prodotti di PCR

Il prodotto di PCR è stato eluito da gel (LMP) estratto con fenolo e quantificato in gel d'agarosio 1,2%. La quantità, in ng, di prodotto di PCR da utilizzare di volta in volta è stata calcolata rispettando la seguente formula:

$$\frac{\text{ng vettore} \times \text{dimensione inserto (Kb)}}{\text{dimensione vettore (Kb)}} \times \text{rapporto molare (inserto:vettore)} = \text{ng inserto}$$

Il rapporto molare inserto-vettore utilizzato è 3:1. Per ogni clonaggio sono stati sequenziati 5 cloni e le sequenze ottenute sono state confrontate con il genoma virale, precedentemente determinato mediante “*primer walking*”, per identificare eventuali errori.

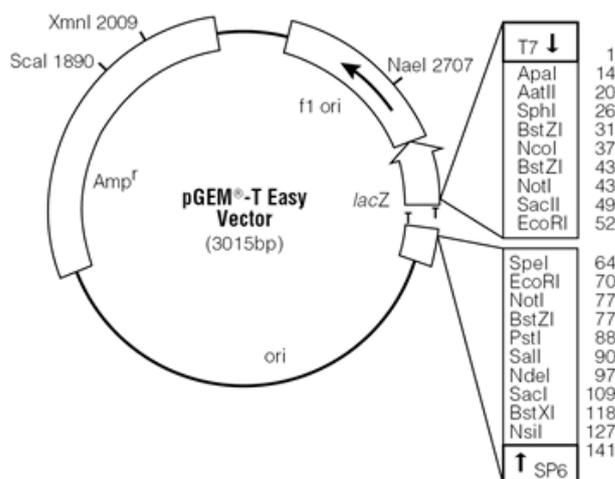


Fig. 13 - Elenco dei siti di restrizione unici presenti nel sito di inserimento del pGEM-T-easy.

3.14 Produzione di una ribosonda marcata con digossigenina (DIG)

E' stata prodotta una ribosonda in grado di ibridare con entrambi gli RNA genomici del nepovirus (R3T). La sonda prodotta è polivalente in quanto ibrida anche con il genoma di *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Tomato*

white ringspot virus (TWRSV), *Potato black ringspot virus* (PBRSV). L'amplicone è stato ottenuto utilizzando una coppia di oligonucleotidi (RNA2 3794-RNA2 3987), disegnati sul tratto 3' terminale dell'RNA2 (ultimi 217 nucleotidi), ed è stato clonato nel vettore plasmidico pGEM-T-easy. E' stata verificata l'orientazione dei cloni prodotti utilizzando l'enzima di restrizione *HincII* al fine di individuare un clone idoneo per la creazione di una sonda antiparallela. Il DNA del clone selezionato (1 µg) è stato linearizzato con l'enzima *SpeI*, estratto con fenolo-cloroformio, ed incubato a 37°C in presenza di 500 U dell'enzima T7 RNA polimerasi (1 µl) e di 2 µl di miscela di ribonucleotidi contenente UTP marcato con DIG. Dopo un'ora sono state aggiunte 4 U di DNasi I (2 µl) per degradare il plasmide e dopo 15 min di incubazione la reazione è stata interrotta ponendo il tubo in ghiaccio. La ribosonda (1 µl) prodotta è stato visualizzata in gel d'agarosio.

3.15 Ibridazione molecolare

3.15.1 Separazione degli RNA su gel denaturante

I campioni di TNA (500 ng) o RNA purificato (10-20 ng) sono stati denaturati a 65°C per 5 min, raffreddati rapidamente in ghiaccio per 2 min e quindi caricati su un gel denaturante contenente 1,2% di agarosio, MOPS 1X (20 mM MOPS, pH 7,0, 2 mM sodio acetato, 1 mM EDTA), 6% formaldeide. La corsa elettroforetica è stata svolta a 100 V per circa un'ora.

L'RNA separato è stato trasferito per capillarità su membrana di nylon (Amersham Hybond-N) utilizzando il tampone SSC 20X (NaCl 3 M, C₆H₅Na₃O₇ 2H₂O, 300 mM, pH 7,0). Il trasferimento è stato assemblato utilizzando carta Whatman 3MM e lasciato per una notte.

Il giorno seguente la membrana è stata lavata 5 min in tampone SSC 2X e lasciata asciugare su due foglietti di carta Whatman. Il fissaggio dell'RNA è stato ottenuto esponendo la membrana ai raggi UV per 4 min a 1,5 J/cm².

3.15.2 Ibridazione con sonda marcata con DIG

La membrana è stata pre-ibridata con 10 ml di soluzione “Dig Easy Hyb” (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) per 6-8 ore a 68°C per saturare eventuali siti di ibridazione aspecifica. E' stata aggiunta la ribosonda marcata con digossigenina precedentemente denaturata a 65°C per 5 min in 1 ml di soluzione di pre-ibridazione e raffreddata rapidamente in ghiaccio. La fase di ibridazione è stata protratta per 14 ore a 68°C in agitazione. Dopo l'ibridazione la membrana è stata sottoposta ad una serie di lavaggi svolti per:

- eliminare l'eccesso di sonda;
- aggiungere l'anticorpo coniugato con la fosfatasi alcalina;
- avviare la reazione chemiluminescente.

I diversi passaggi sono riportati schematicamente in Tab. 7

Tab.7 – Schema lavaggi della membrana ibridata con una ribosonda marcata con digossigenina.

Tempo	Tampone	Temperatura
2 x 10 min	SSC 2X + SDS 0,1%	temp amb
2 x 15 min	SSC 0,1X + SDS 0,1%	68°C
5 min	SSC 2X	temp amb
30 min	SSC 2X + Rnasi A (50 µg)	temp amb
5 min	SSC 2X	temp amb
2 min	Washing buffer (100 mM acido maleico, 150 mM NaCl pH 7,5, 0,3% Tween-20)	temp amb
120 min	Blocking buffer (Blocking agent 1%, 100 mM acido maleico, 150 mM NaCl pH 7.5	temp amb
30 min	Blocking buffer + 75 mU/ml Anti-Dig Ap FAB	temp amb
2 x 15 min	Washing buffer (100 mM acido maleico, 150 mM NaCl pH 7,5, 0,3% Tween-20)	temp amb
3 min	Detection buffer (100 mM TRIS-HCl, 100mM NaCl pH9,5	temp amb

Dopo l'equilibratura nel tampone di esposizione (ultimo passaggio) la membrana è stata asciugata pochi secondi su carta Whatman 3MM e messa a contatto per 5 min con 3 ml di CDP-Star (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) diluito 1:100 in tampone di esposizione.

La membrana è stata asciugata per pochi secondi su carta Whatmann, avvolta in pellicola trasparente e messa a contatto con una pellicola X-Ray per il tempo necessario (generalmente dai 10 ai 120 min).

3.16 Allevamento ed inoculazione di mutanti *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana benthamiana*

Le piante utilizzate per i saggi sono state allevate in camera di crescita ed i trapianti effettuati dopo circa due settimane dalla semina. Il fotoperiodo indotto è stato di 16-8 ore, luce-buio, mentre la temperatura è stata impostata in modo differente a seconda dell'esperimento. La temperatura di allevamento ideale è risultata essere di 22°C.

I mutanti di *Arabidopsis* scelti per questo lavoro (Tab. 8) appartengono tutti al gruppo Columbia (Col-0) e per ognuno di essi uno o più geni coinvolti nel silenziamento genico sono stati resi inattivi. Il mutante di *N. benthamiana* utilizzato possiede il gene *rdr6* disattivo.

Col-0 wt
Dcl 2
Dcl 4
Dcl 4 - Dcl 2
SDE1
HEN1

Tab.8- Elenco dei mutanti di *A. thaliana* utilizzati.

L'inoculazione è stata effettuata con RNA virale del nepovirus utilizzando come abrasivo la celite in tampone Tris-EDTA, pH 8,0.

Le piante sono state osservate per circa 15 giorni per valutare la comparsa di sintomi.

3.17 Gel denaturante per piccoli RNA

La separazione dei piccoli RNA è stata svolta in gel denaturante di poliacrilammide al 15%. Lo schema per la preparazione del gel è illustrato in Tab. 9

Tab. 9 – Schema dei reagenti e delle rispettive quantità utilizzate nella preparazione del gel di poliacrilammide utilizzato per separare gli sRNA.

Urea	5 g
Acqua	0,75 ml
10X TBE	1 ml
40% (Acrilammide:bisacrilammide 19:1)	3,75 ml
Temed	4 μ l
10% APS (ammonio persolfato)	60 μ l
TOTALE	10 ml

L'apparato utilizzato è stato il Mini Protean (BioRad, Laboratories, Hercules, CA, USA). I vetri ed il pettine sono stati lavati con sapone, asciugati e poi lavati con etanolo assoluto.

L'urea è stata pesata in beker da 25 ml, e dopo l'aggiunta di acqua sterile ed acrilammide al 40% la soluzione è stata sciolta su blocco termico a 70°C per 10 min. Tale soluzione è stata poi mantenuta a temperatura ambiente per 5 min prima dell'aggiunta, nell'ordine, di ammonio persolfato e TEMED.

Dopo aver versato il gel tra i due vetri, questo è stato lasciato polimerizzare per 60 min a temperatura ambiente e successivamente posto in tampone TBE 1X per una corsa preliminare di 30 min a 100 V costanti. La corsa preliminare viene effettuata in quanto serve a rimuovere gli eccessi di ammonio persolfato ed è necessaria per analizzare gli RNA di dimensione inferiore a 50 nucleotidi. Prima di caricare i campioni nel gel ogni singolo pozzetto è stato lavato immettendo tampone con una micropipetta per rimuovere gli eccessi di urea; ciò consente all'RNA di stabilizzarsi sul fondo del pozzetto evitando così di ottenere bande ad altezze anomale.

I campioni sono stati preparati dissolvendo l'RNA totale in tampone FDE in rapporto 1:1 e ponendo il tubo Eppendorf a 65°C per 10 min e poi subito in ghiaccio. In ogni pozzetto sono stati caricati 2-3 µg di RNA totale.

Il primo pozzetto del gel è stato caricato con un marcatore per RNA marcato con ^{32}P (Decade Marker RNA, Thermo Scientific). La preparazione del marcatore è stata effettuata adottando il seguente protocollo:

In un tubo Eppendorf sono stati aggiunti i seguenti reagenti:

Decade Marker RNA (100 ng)	1 µl
Acqua sterile	6 µl
10X Tampone di reazione per Kinase	1 µl
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, $\geq 3,000$ Ci/mmol	1 µl
T4 polinucleotide kinasi	1 µl

Dopo l'aggiunta dell'enzima la reazione è stata incubata per un'ora a 37°C dopodiché sono stati aggiunti 8 µl di acqua sterile e 2 µl di tampone di taglio ed il tubo è stato lasciato a temperatura ambiente.

Un'aliquota di 4 µl è stata denaturata a 95°C per 3 min, posta in ghiaccio e caricata sul gel.

L'elettroforesi è stata condotta a 100 V costanti ed è stata interrotta quando il colorante aveva raggiunto il fondo del gel.

Dopo la corsa elettroforetica il gel è stato lavato per 5 min in Na_2HPO_4 0,01 M per eliminare gli eccessi di urea e successivamente in 2X SSC per 5 min per poi procedere con la sistemazione del blot.

3.18 Produzione di sonda marcata con ^{32}P

Per la produzione di sonde marcate con ^{32}P è stato utilizzato il kit “DecaLabel DNA Labeling Kit” della Thermo Scientific.

Il metodo si basa sull’impiego di decameri random i quali si legano alla doppia elica di DNA denaturata innescando l’attività dell’enzima Klenow che non ha attività esonucleasica 5’-3’. Uno dei nucleotidi presenti nella reazione è marcato con ^{32}P . Lo schema della reazione è il seguente:

DNA stampo	100 ng
Tampone 5X	4 μl
Acqua sterile	Fino a 14,5 μl

Il tubo è stato posto in acqua bollente per 10 min, in ghiaccio 2 min e poi centrifugato. L’enzima è stato addizionato secondo questo schema e lasciato in incubazione un’ora a 37°C.

Mix C	1,5 μl
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-(dCTP)}$	3 μl
frammento di Klenow, exo- (5 u)	1 μl

La reazione è stata interrotta ponendo il tubo in ghiaccio.

Sono state svolte diverse prove per individuare la regione del genoma da amplificare per la produzione della sonda. In Fig. 14 sono evidenziate, in nero, le diverse regioni saggiate ed in rosso il tratto amplificato per produrre la sonda R5.

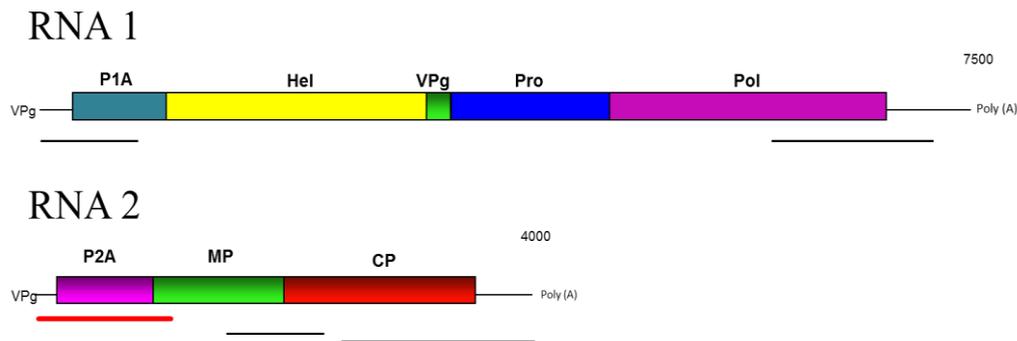


Fig. 14. – Regioni del genoma del nepovirus saggiate per la produzione di una sonda da utilizzare in esperimenti di ibridazione per vsRNA. In nero sono evidenziati i tratti del genoma saggiati. Il tratto rosso corrisponde ai primi 1259 nt dell'RNA2 ed è stato amplificato per la produzione della sonda R5.

La membrana è stata lasciata in pre-ibridazione per 6 ore in tampone di ibridazione (25% 20X SSC, 10% 50X Denharts, 4% RNA di lievito) a 68°C.

La sonda è stata denaturata utilizzando NaOH 1 M secondo il seguente schema:

Sonda	10 µl
NaOH 1M	10 µl
Acqua sterile	30 µl

La mix di reazione è stata incubata a temperatura ambiente per 5 min e poi il tubo è stato posto in ghiaccio per 5 min Sono stati poi aggiunti HCl 1 M (10 µl) e TRIS-HCl 1 M pH 7,5 (10 µl)

La sonda denaturata è stata lasciata in ghiaccio prima di essere usata.

3.19 Lavaggi membrana ed esposizione su Phosphor Screen

La membrana è stata lavata due volte con 2XSSC+0,1% SDS a 68°C per 10 min e successivamente è stato fatto un altro lavaggio, in condizioni più stringenti, con 0,1X SSC+0,1% SDS per 10 min a 68°C.

La membrana è stata poi avvolta in film plastico ed esposta al Phosphor Screen per il tempo necessario (generalmente 24 ore).

L'acquisizione dell'immagine è stata effettuata con lo Storm Scanner (Amersham Bioscience, Pittsburgh USA) utilizzando il software dedicato.

Al fine di effettuare una diversa ibridazione sulla stessa membrana, quest'ultima è stata lavata a 100°C per 10 min con soluzione 1 mM EDTA+0,1%SDS. La membrana è stata avvolta in film plastico ed esposta in Phosphor Screen per 12 ore per valutare l'assenza di segnale di ibridazione. Dopo questa valutazione la membrana è stata pre-ibridata nuovamente con una sonda differente.

3.20 Ibridazione con sonda LNA

Per verificare il corretto caricamento dell'RNA nel gel, la membrana è stata ibridata con una sonda disegnata contro miRNA159 il quale è costituzionalmente espresso nella pianta. La sonda utilizzata per questo esperimento di ibridazione è una sonda LNA (Locked Nucleic Acid) acquistata presso la ditta Exiqon (Vedbaek, Denmark).

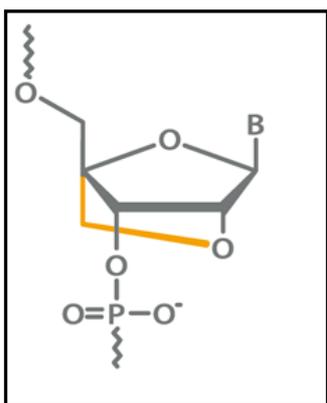


Fig. 15 – Struttura della molecola di zucchero presente in un oligo LNA.

Gli RNA di tipo LNA sono una classe di RNA di sintesi nei quali lo zucchero si presenta in forma “bloccata”, rispetto al classico ribosio, in quanto esiste un ponte che unisce l'ossigeno del C2 ed il C4. Il risultato è una maggiore stabilità quando la molecola ibrida con un'elica di DNA o RNA. Per ogni monomero LNA incorporato, la T_m aumenta di 2-8°C e ciò fa sì che un oligonucleotide LNA possa essere più corto rispetto ad un normale oligonucleotide, mantenendo comunque una T_m elevata.

L'oligonucleotide è stato marcato con ATP radioattivo mediante l'uso di una chinasi che catalizza l'addizione del nucleotide marcato alle estremità 3' terminali.

Acqua	1 μ l
Buffer PNK 10X	1 μ l
LNA oligo 1pmol	4 μ l
PNK	1 μ l
γ -ATP	3 μ l

La reazione è stata incubata a 37°C per un'ora, dopodiché il tubo eppendorf è stato centrifugato e sono stati aggiunti 40 μ l di tampone TE.

La sonda è stata denaturata come descritto nel paragrafo 3.18

L'ibridazione è stata svolta a 37°C.

Risultati 1

4.1 Caratterizzazione biologica

Le prove di trasmissione meccanica hanno consentito di isolare un virus su diversi indicatori erbacei e di valutare il tipo e l'evoluzione delle sintomatologie da essi indotte. Le piante risultate suscettibili hanno reagito all'infezione mostrando sintomatologie, per lo più costituite da maculatura anulare e mosaico, seguite da una fase di risanamento visibile dopo circa 15 giorni dall'inoculazione (Fig. 16, 17, 18 e 19). Il processo infettivo osservato si manifesta, quindi, con una fase iniziale acuta, in cui i sintomi a carico delle foglie appaiono particolarmente gravi, ed un fase di risanamento in cui si assiste ad una graduale riduzione dei sintomi fino alla comparsa di foglie del tutto asintomatiche nei nuovi palchi fogliari. Tra gli indicatori erbacei, il *Chenopodium quinoa* ed il *C. murale* hanno reagito in modo differente poiché l'evoluzione della sintomatologia è culminata nella morte dell'ospite (dati non mostrati). Tra le piante test utilizzate, la *N. benthamiana* è stata scelta per propagare il virus e per la caratterizzazione del processo infettivo. Questa specie ha reagito all'inoculazione del virus mostrando anulature locali con un diametro compreso tra 1 e 5 mm in funzione della temperatura di allevamento. Le foglie con sintomi sistemici hanno mostrato, inizialmente, un mosaico diffuso su tutta la lamina fogliare, mentre nelle foglie dei palchi superiori esso si è localizzato in prossimità dell'apice (Fig. 16).

Con la trasmissione meccanica è stata valutata, anche, la pericolosità del virus verso alcune specie erbacee di interesse agrario. E' stata riscontrata la capacità del virus di infettare localmente il melone retato e l'anguria, e sistemicamente il pomodoro, lo zucchini, il basilico e la vigna (Fig. 20). Non sono stati, invece, osservati sintomi su peperone, lattuga e scarola. Anche nelle piante coltivate suscettibili l'andamento dell'infezione procede attraverso una

fase acuta ed una immediata fase di recupero in cui la pianta emette foglie asintomatiche.

I sintomi riscontrati sui diversi indicatori erbacei e la successiva emissione di foglie asintomatiche, hanno permesso di formulare l'ipotesi che un nepovirus fosse associato alla malattia delle macule clorotiche in piante di *Aeonium*.



Fig. 16 - Sintomi riscontrati in *N. benthamiana* a seguito dell'inoculazione meccanica con succo di foglie sintomatiche di *Aeonium*. Dopo 20 giorni dall'inoculazione la pianta mostra anulature clorotiche locali e mosaico. Dopo due settimane le nuove foglie emesse si presentavano del tutto asintomatiche L: foglia con sintomi locali; S: foglia con sintomi sistemici; R: foglia in "recovery".

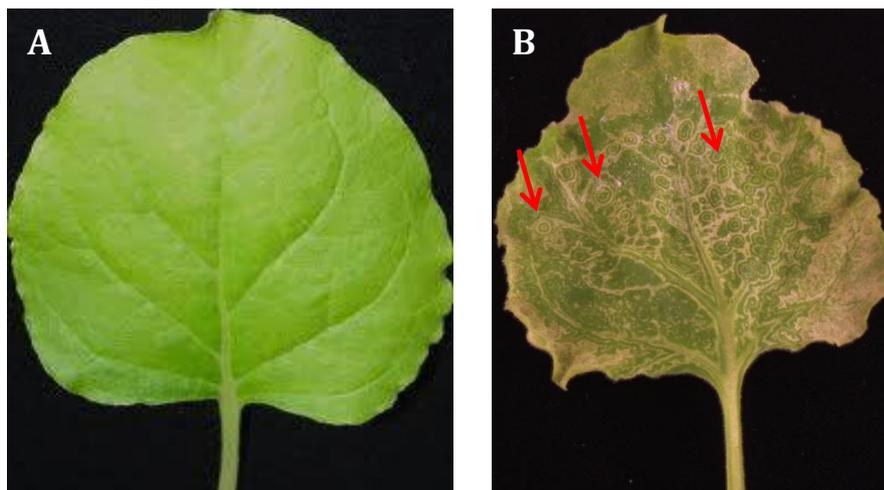


Fig. 17 – Foglie di *N. benthamiana* con sintomi locali (B) a confronto con una foglia sana (A). Le frecce rosse indicano i tipici anelli clorotici visibili in infezioni da nepovirus.

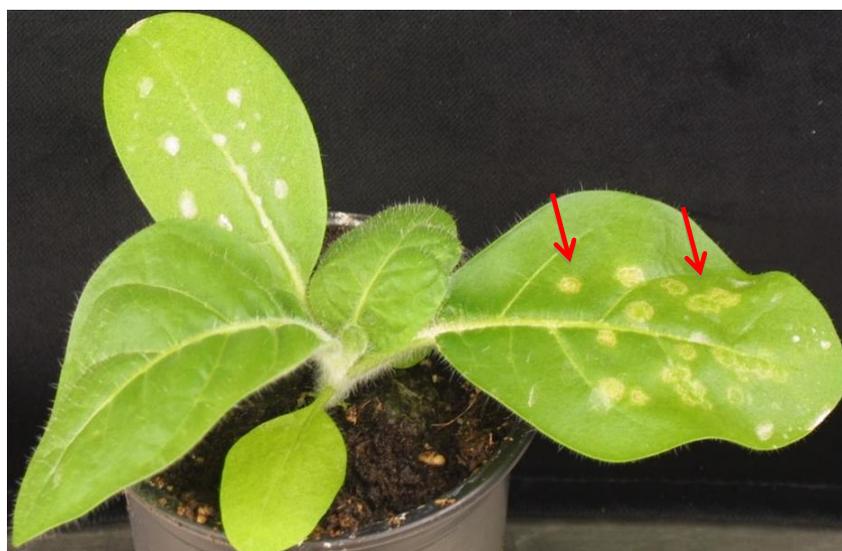


Fig. 18 – Sintomi locali riscontrati in *N. rustica*. Le frecce rosse indicano le anulature clorotiche.



Fig. 19 – Confronto tra sintomi locali (L) e sistemici (S) indotti dal virus in foglie di *Nicotianeae*. Da sinistra *N. tabacum* cv. Burley (S), *N. tabacum* cv. Kentucky (S), *N. glutinosa* (S), *N. glutinosa* (L), *N. occidentalis* (S), *N. benthamiana* (L).

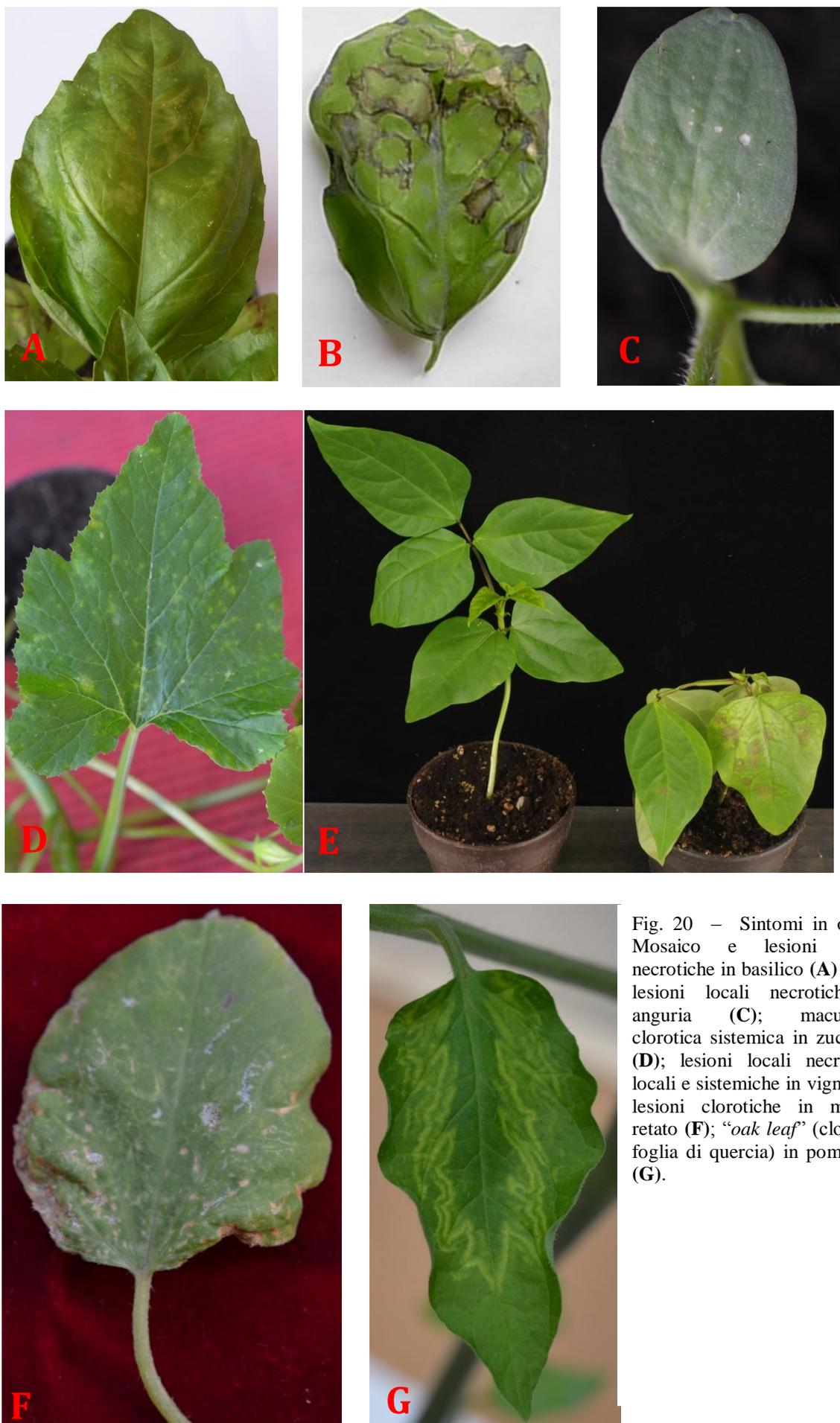


Fig. 20 – Sintomi in ortive. Mosaico e lesioni locali necrotiche in basilico (A) e (B); lesioni locali necrotiche in anguria (C); maculatura clorotica sistemica in zucchino (D); lesioni locali necrotiche locali e sistemiche in vigna (E); lesioni clorotiche in melone retato (F); “oak leaf” (clorosi a foglia di quercia) in pomodoro (G).

In Tab. 10 sono riassunti i sintomi indotti su indicatori erbacei e piante ortive.

Tab. 10 – Gamma di ospiti e sintomatologie riscontrate

OSPITE	SINTOMI	
	LOCALE	SISTEMICO
Chenopodiaceae		
<i>Chenopodium murale</i>	NLL	ASN, PD
<i>C. quinoa</i>	NLL	ASN, PD
Cucurbitaceae		
<i>Citrullus lanatus</i> cv. Crimson	C/NLL	-
<i>Cucumis melo</i> cv. Proteo	-	M
<i>C. sativus</i>	C/NLL	M
<i>Cucurbita pepo</i> cv. Myconos	-	M
Labiatae		
<i>Ocimum basilicum</i>	C/NLL	-
Leguminosae		
<i>Vigna unguiculata</i>	C/NLL	M
Phytolaccaceae		
<i>Phytolacca americana</i>	C/NLL	M
Solanaceae		
<i>Capsicum annum</i>	-	-
<i>Datura stramonium</i>	C/NLL	-
<i>D. metel</i>	C/NLL	-
<i>Lycopersicon esculentum</i> cv Principe Borghese	C/NLL	LD
<i>Nicotiana benthamiana</i>	C/NLL, RS	M, RS
<i>N. glutinosa</i>	C/NLL, RS	M
<i>N. occidentalis</i>	NLL	LD
<i>N. rustica</i>	C/NLL, RS	M, RS
<i>N. silvestris</i>	C/NLL	-
<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	C/NLL	RS
<i>N. tabacum</i> cv. White	C/NLL	M
Burley		
<i>N. tabacum</i> cv. Kentucky	C/NLL	M
Asteraceae		
<i>Lactuca sativa</i> cv. Romana	-	-
<i>L. sativa</i> cv. Canasta	-	-
<i>L. sativa</i> cv. Iceberg	-	-
<i>Cichorium endivia</i>	-	-

NLL, lesione locale necrotica; ASN, necrosi apicale sistemica; M, mosaico; C/NLL, lesione locale clorotica/necrotica; RS, macule ad anelli; LD, deformazione fogliare; PD, morte della pianta; -, assenza di sintomi.

4.2 Caratterizzazione sierologica di AeRSV

4.2.1 Purificazione del virus e produzione di un antisiero policlonale

Il virus è stato propagato in *N. benthamiana* ed i tessuti fogliari dell'ospite sono stati utilizzati per purificarlo. E' stato, così, ottenuto un parziale purificato ad una concentrazione di 0,1 mg/gr di tessuto iniziale.

La purificazione del virus è stata effettuata anche a partire da foglie sintomatiche di *Aeonium*. In questo caso la concentrazione finale del purificato è risultata essere nettamente inferiore (circa 0,01 mg/gr di tessuto fresco).

Il parziale purificato virale ottenuto da *N. benthamiana* è stato iniettato in coniglio per la produzione di un antisiero specifico. Il titolo di tale antisiero, determinato in gel agar a doppia diffusione (Fig. 21) è risultato essere di 1:256.



Fig. 21 – Doppia diffusione in gel di agar. Pozzetti: da 1 a 6 antisiero contro il virus riscontrato in *Aeonium*. Diluizioni antisieri: pozzetto 1 – 1:4; pozzetto 2 – 1:16; pozzetto 3 – 1:32; pozzetto 4 – 1:256; pozzetto 5 – 1: 512; pozzetto 6 – 1:1024

4.3 Microscopia Elettronica

Le osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione hanno evidenziato la presenza di particelle, di circa 30 nm di diametro, parzialmente o completamente penetrate dal colorante (acetato di uranile) (Fig. 22). La forma delle particelle osservate è risultata assimilabile a quella dei nepovirus.

In Fig. 22 si osservano tre tipi di particelle: alcune (freccia rossa) appaiono nere poiché dense agli elettroni, in quanto non contengono acidi nucleici (particelle T). Le particelle indicate dalla freccia verde racchiudono l'acido nucleico di minori dimensioni (particelle M), mentre quelle indicate dalla freccia nera presentano un RNA di maggiori dimensioni; per tale motivo esse non sono state penetrate dal colorante e, quindi, risultano bianche (particelle B).

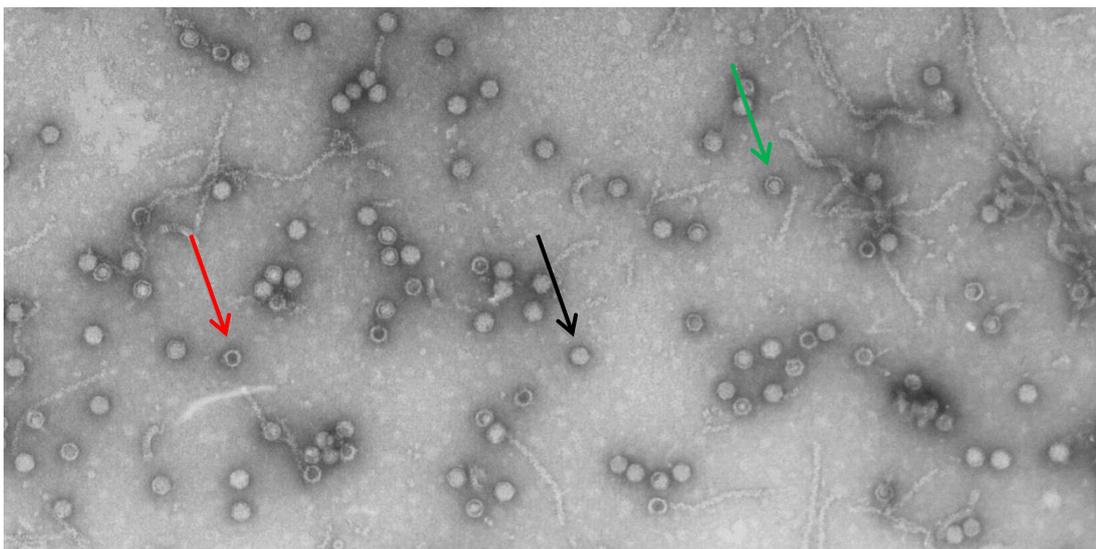


Fig. 22 – Osservazione al ME a trasmissione di un parziale purificato ottenuto da foglie infette di *N. benthamiana* inocolata con tessuto sintomatico di *Aeonium*. Le frecce indicano le tre tipologie di particelle di nepovirus.

L'antisiero prodotto è stato saggiato in prove di immunodecorazione verificandone la reazione con il virus isolato da *Aeonium*; il saggio è stato effettuato utilizzando, a confronto, un isolato di TRSV ed un antisiero contro tale virus. Il risultato ottenuto indica che l'antisiero prodotto contro il virus da *Aeonium* reagisce decorando le particelle omologhe, mentre non vi è alcuna

decorazione per le particelle di TRSV (Fig. 23 B e C). Al contrario, l'antisiero specifico per TRSV decora le particelle purificate di TRSV mentre non decora le particelle del virus da *Aeonium* (Fig. 23 D, E).

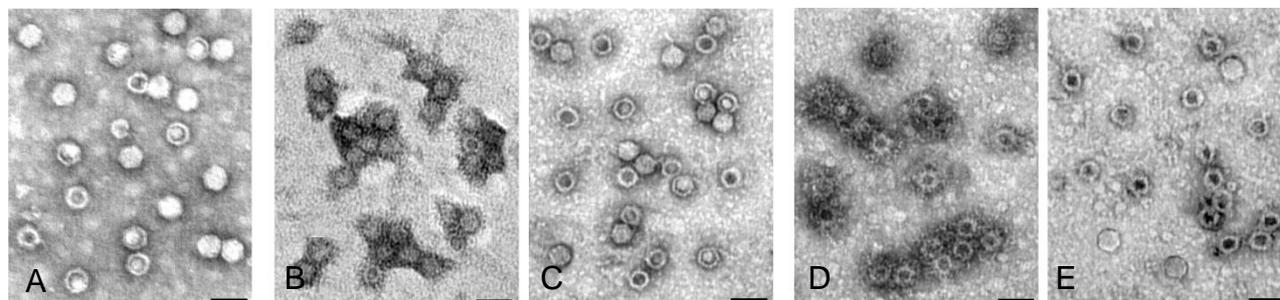


Fig. 23 – Immunodecorazione di particelle del nepovirus isolato da *Aeonium* e TRSV con gli anticorpi omologhi. A: Colorazione negativa con acetato di uranile di particelle del nepovirus oggetto di studio purificate e non frazionate. B, C: particelle del nepovirus isolato da *Aeonium* esposte, rispettivamente, all'antisiero omologo ed all'antisiero di TRSV. D, E: particelle di TRSV esposte, rispettivamente, all'antisiero omologo ed all'antisiero prodotto contro il nepovirus oggetto di studio. Barra = 50 nm.

4.3.1 Analisi citopatologiche

Le osservazioni di sezioni ultrasottili di tessuti di *N. benthamiana* infetta hanno indicato che l'organizzazione strutturale delle cellule è alquanto preservata, eccetto per la presenza di una proliferazione di membrane e di vescicole, e la presenza di numerose goccioline lipidiche nel citoplasma. Gli organelli non sono risultati alterati. Numerose particelle virali sono state osservate sparse nel citoplasma o all'interno di plasmodesmi (Fig. 24, 25 e 26)

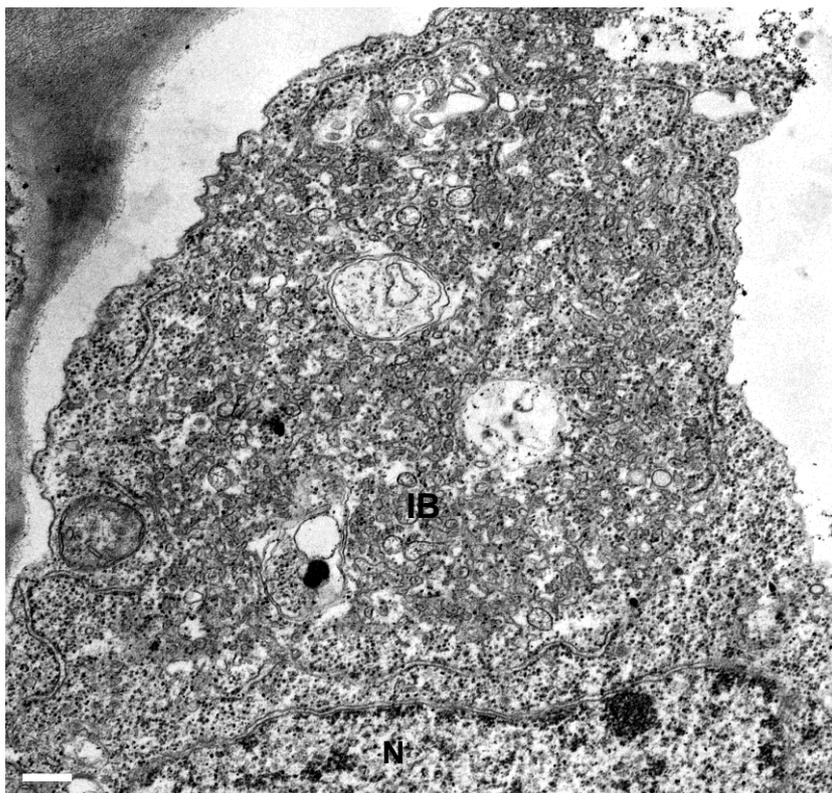


Fig. 24 – Aspetti ultrastrutturali di cellule del mesofillo di *N. benthamiana* infette con il nepovirus riscontrato in *Aeonium*. IB: corpo di inclusione citoplasmatico appressato al nucleo; N: nucleo. Barra: 250 nm

Le alterazioni citoplasmatiche sono, generalmente, appressate al nucleo la cui membrana è risultata dilatata in diversi punti (Fig. 25).

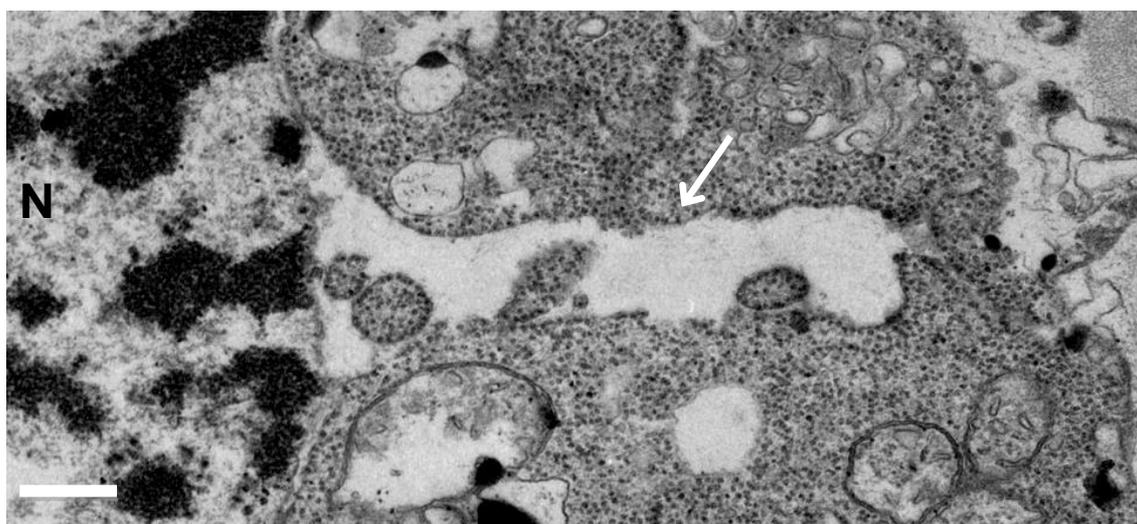


Fig. 25 – Alterazioni citoplasmatiche in *N. benthamiana* infetta con il nepovirus riscontrato in *Aeonium*. N: nucleo. La freccia bianca mostra la dilatazione della membrana nucleare. Sono visibili particelle del nepovirus sparse nel citoplasma. Barra: 250 nm

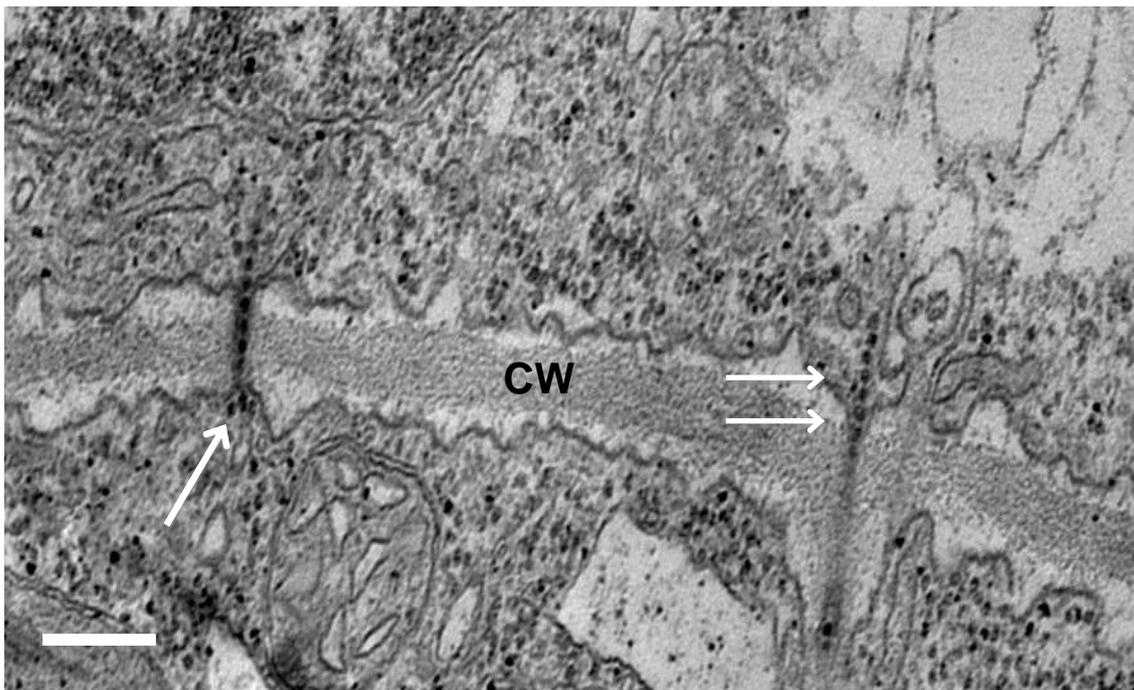


Fig. 26 - Movimento intercellulare dei virioni del nepovirus riscontrato in *Aeonium*. CW: parete cellulare. Le frecce bianche indicano le strutture tubulari, contenenti le particelle virali e connesse ai plasmodesmi, che consentono il movimento del virus da una cellula all'altra. Barra: 250 nm

4.4 Validazione di un protocollo diagnostico ELISA

Il kit ELISA prodotto è stato utilizzato per validare un protocollo diagnostico efficace da utilizzare per indagini epidemiologiche.

L'esperimento è stato svolto utilizzando foglie sintomatiche di *N. benthamiana* infetta con il virus riscontrato in *Aeonium* e foglie sintomatiche di *C. quinoa* infetto con TRSV. Come controllo negativo sono state utilizzate le foglie sane di piante di *N. benthamiana* e *C. quinoa*.

Nelle Tab. 11 e 12 sono riportati i valori di densità ottica (OD) riscontrati dopo 15 e 45 min. dall'aggiunta del substrato.

Tab. 11 - Valori di densità ottica riscontrati dopo 15 minuti. In rosso ed in nero sono evidenziati i valori di assorbanza riscontrati, rispettivamente, per i campioni infetti con il nepovirus da *Aeonium* e con il TRSV.

Coniugato		1/100	1/500	1/1000	1/100	1/500	1/1000	1/100	1/500	1/1000	1/1000	1/2000
Nepe <i>Aeonium</i>	-0,020	0,721	0,426	0,249	0,713	0,400	0,237	0,700	0,335	0,194	0,124	0,086
	-0,008	0,711	0,365	0,255	0,694	0,428	0,223	0,680	0,373	0,211	0,161	0,062
Sano N. <i>Benthamiana</i>	0,004	0,030	0,002	-0,016	0,005	-0,024	-0,021	0,038	-0,005	-0,002	-0,017	-0,010
	-0,010	0,016	0,140	-0,017	-0,002	-0,030	-0,019	0,021	-0,005	-0,006	-0,020	-0,009
Sano C. <i>quinua</i>	0,009	0,039	0,006	-0,008	0,003	0,035	-0,022	0,027	-0,008	0,019	0,014	-0,019
	0,000	0,045	0,026	-0,022	-0,003	0,000	-0,023	0,048	-0,015	-0,009	-0,028	0,004
TRSV	0,026	0,048	0,014	0,010	0,041	0,012	0,012	0,063	0,005	-0,002	-0,013	-0,014
	-0,001	0,025	0,003	0,022	0,035	0,033	0,049	0,058	-0,004	-0,001	0,015	-0,008
Coating		1/100			1/500			1/1000			1/2000	

Tab. 12 - Valori di densità ottica riscontrati dopo 45 minuti. In rosso ed in nero sono evidenziati i valori di assorbanza riscontrati, rispettivamente, per i campioni infetti con il nepovirus da *Aeonium* e con il TRSV.

Coniugato		1/100	1/500	1/1000	1/100	1/500	1/1000	1/100	1/500	1/1000	1/1000	1/2000
Nepe <i>Aeonium</i>	-0,015	0,735	0,709	0,656	0,732	0,715	0,628	0,733	0,706	0,572	0,495	0,326
	0,002	0,737	0,699	0,647	0,722	0,706	0,633	0,719	0,713	0,584	0,485	0,292
Sano N. <i>Benthamiana</i>	0,003	0,168	0,015	-0,001	0,107	0,024	0,016	0,195	0,039	0,030	-0,001	0,007
	0,004	0,100	-0,022	0,010	0,031	0,000	0,004	0,078	-0,003	-0,012	-0,030	-0,018
Sano C. <i>quinua</i>	-0,006	0,093	-0,022	0,008	0,053	-0,008	0,011	0,046	0,024	-0,004	-0,013	0,024
	-0,025	0,083	0,002	0,001	0,042	0,042	-0,012	0,026	0,015	0,029	0,022	-0,001
TRSV	0,008	0,105	0,035	0,006	0,086	0,051	0,024	0,047	0,007	0,033	0,015	0,014
	0,028	0,135	0,055	0,014	0,071	0,070	0,013	0,097	0,024	0,054	0,010	0,068
Coating		1/100			1/500			1/1000			1/2000	

Gli OD riscontrati per i campioni infetti con TRSV (evidenziati in nero in entrambe le tabelle) presentano valori di assorbanza inferiori a due volte quelli dei campioni sani. Al contrario, i valori di OD riscontrati per i campioni infetti (evidenziati in rosso in entrambe le tabelle) con il nepovirus sono risultati superiori al doppio del valore di densità ottica dei campioni sani.

Gli antisieri sono stati saggiati a diverse concentrazioni per verificare la migliore diluizione di esercizio per entrambi. I valori di OD nelle diverse combinazioni di diluizione dell'antisiero primario e di quello coniugato hanno

suggerito un utilizzo di essi alle diluizioni 1:1000, per l'antisiero primario, e di 1:500 per quello coniugato. Il campione è stato diluito 1:20 in tampone di estrazione.

4.5 Analisi della proteina del capsid e dell'acido nucleico virale

L'analisi in SDS-PAGE della proteina capsidica, dissociata in tampone di Laemmli, ha mostrato la presenza di una singola banda del peso stimato di 54 kDa (Fig. 27 A), indicando che i virioni sono costituiti da una unica specie proteica di dimensioni compatibili con quelle attese per un nepovirus.

L'RNA genomico è stato estratto dalle particelle virali purificate e la corsa elettroforetica in gel d'agarosio, ha mostrato la separazione dell'RNA in due bande (Fig. 27, B1).

L'analisi Northern ha mostrato che i due RNA genomici sono entrambi incapsidati nelle particelle virali (Fig. 27, B2). In estratti ottenuti direttamente da tessuti infetti di *Aeonium*, l'analisi Northern ha svelato la presenza di un terzo acido nucleico di peso inferiore rispetto all'RNA2 (Fig. 27, C2) e pertanto denominato RNA2'.

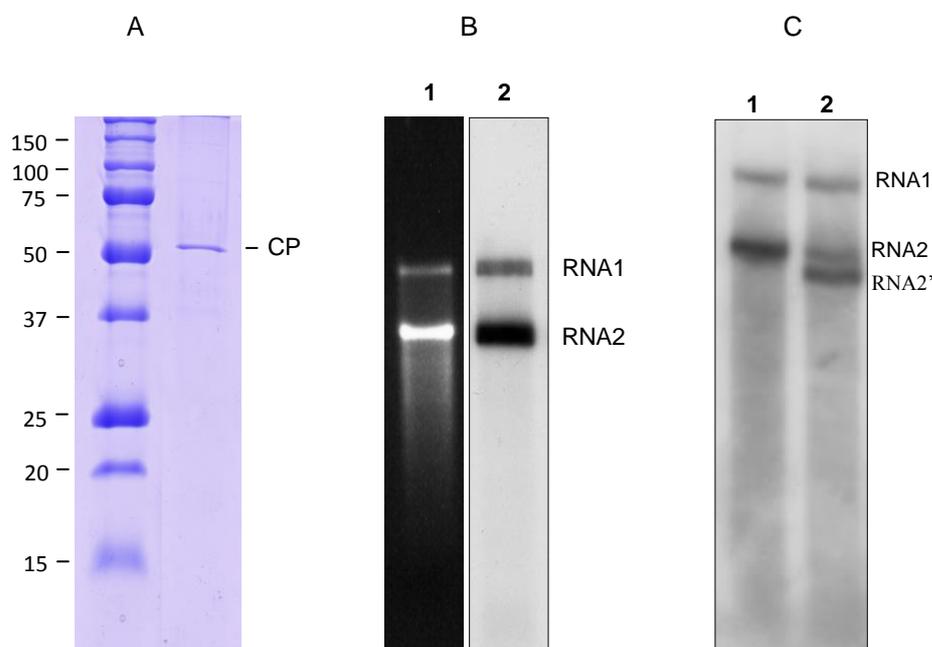


Fig. 27 – Analisi PAGE della proteina capsidica (A); elettroforesi in gel di agarosio e colorazione con etidio bromuro di RNA estratto da particelle purificate (B1); analisi Northern di RNA estratto da particelle purificate (B2); analisi Northern a confronto di estratti ottenuti da tessuti fogliari infetti di *N. benthamiana* (C1) e tessuti fogliari infetti di *Aeonium* (C2). L'ibridazione è stata svolta con la sonda R3T.

4.6 Determinazione delle sequenze nucleotidiche

L'RNA estratto da particelle virali purificate è stato denaturato ed, utilizzando un oligo d(T) come innesco, retroscritto per produrre una libreria di cDNA clonata nel vettore plasmidico pUC19. I cloni prodotti sono stati visualizzati in gel di agarosio ed alcuni sono stati selezionati per essere sequenziati. Le prime sequenze parziali sono state confrontate con le sequenze nucleotidiche disponibili in GenBank utilizzando il software BLASTn, disponibile all'indirizzo:

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome .

La ricerca di sequenze omologhe, in banca dati, ha svelato un'identità del 72% tra i cloni rappresentativi del terminale 3' dell'RNA2 ed il genoma di TRSV (Fig. 28).

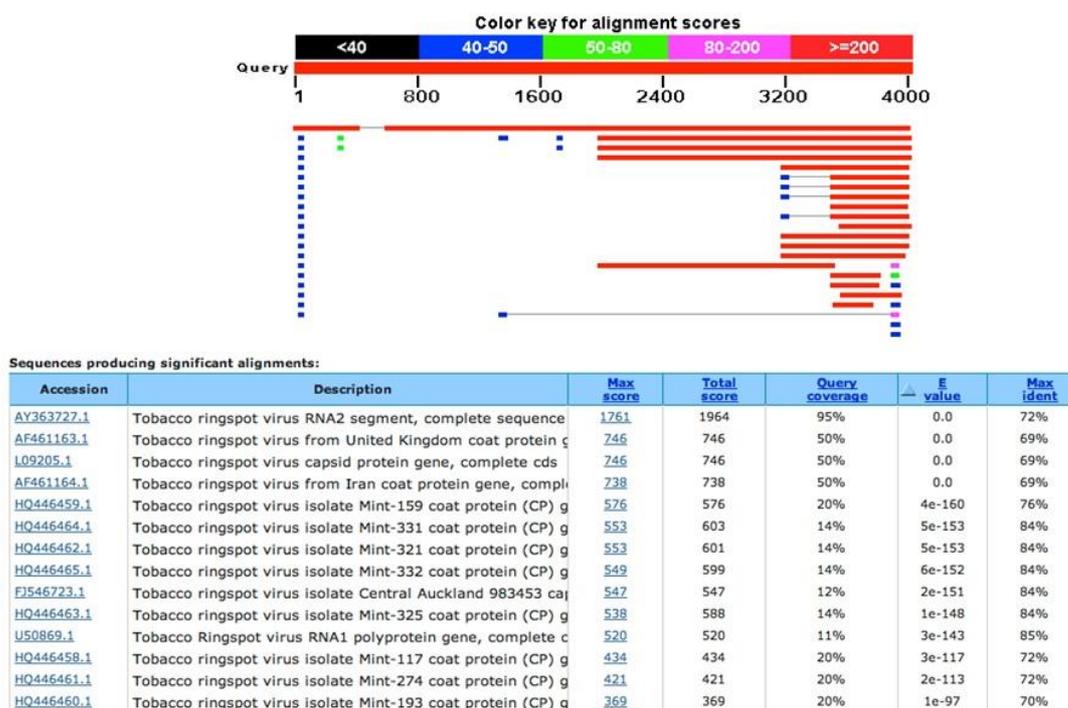


Fig. 28 – Ricerca di omologie di sequenza tra un clone parziale di RNA2 e le sequenze disponibili in "Gene Bank".

Il primo clonaggio dell'RNA2 ha prodotto un clone parziale (clone 20) di circa 4000 nt, corrispondente al 99% della lunghezza dell'acido nucleico, di cui è stata determinata la mappa di restrizione, allo scopo di generare cloni di delezione più piccoli per completarne la sequenza (Fig. 29). Per l'RNA1, il sequenziamento è stato svolto a partire dai primi cloni rappresentativi della regione 3', disegnando 3 oligo specifici (RNA1 9rev; RNA1 4022N; RNA1 1529N) per ottenere nuovi cDNA in direzione del terminale 5' (Fig. 30).

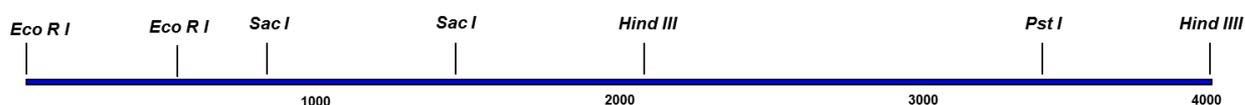


Fig. 29 – Mappa di restrizione del clone 20. Il clone è stato digerito opportunamente per ottenere i cloni 20ΔEco, 20ΔHind, 20ΔPst.

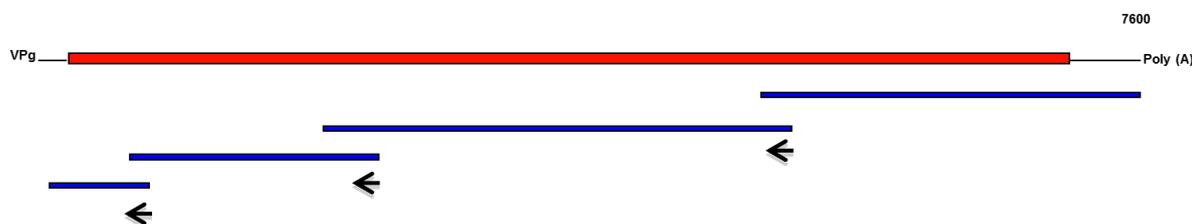


Fig. 30 – Schema per la determinazione della sequenza dell'RNA1. Le frecce nere indicano gli oligo specifici utilizzati per la produzione di nuove librerie di cDNA.

L' RNA1 contiene 7549 nt, esclusa la coda di poly(A) (GenBank “*accession number*”: JX304792) e codifica una singola “*Open Reading Frame*” (ORF). La proteina prodotta (P1) è composta da 2314 amminoacidi con una massa calcolata di 257 kDa. L'analisi bioinformatica ha indicato che la proteina P1 contiene i motivi caratteristici del cofattore della proteasi (PRO-co), dell'elicasi (NTP-B), della proteasi (PRO) e della RNA polimerasi RNA dipendente (POL), indicando che la poliproteina P1 viene scissa determinando il rilascio di proteine mature.

L'RNA2 è costituito da 4010 nt, esclusa la coda di poly(A) (GenBank "accession number": JQ670669) e contiene una singola ORF, dal nt 124 al nt 3508, che codifica una proteina (P2) costituita da 1128 amminoacidi con una massa calcolata di 126 kDa. I motivi caratteristici individuati nella proteina P2 corrispondono alla proteina di rivestimento (CP), alla proteina di movimento (MP) ed alla proteina P2A. Anche la proteina P2 viene scissa dalla proteasi virale per rilasciare 3 proteine mature.

Le sequenze nucleotidiche dei due acidi nucleici condividono un'identità di sequenza rispettivamente del 72 e 69% con l'RNA1 e l'RNA2 del TRSV.

L'acido nucleico di minori dimensioni, RNA2', è stato amplificato utilizzando RNA estratto da particelle virali purificate da *Aeonium* utilizzando, per la reazione PCR, un oligo senso contenente i primi 17 nt di entrambi gli RNA genomici (Eco-Cla-RNA2 P) (Fig. 31) e i cloni ottenuti sono stati sequenziati.

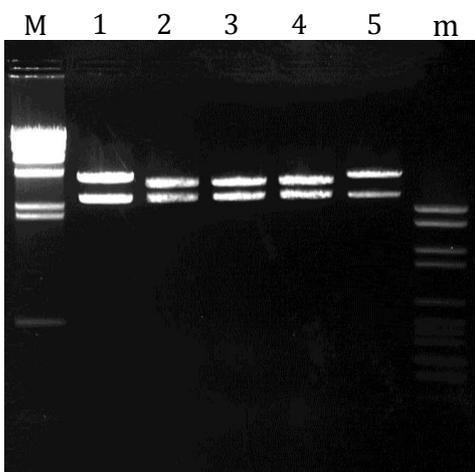


Fig. 31 – Digestione enzimatica con *EcoRI* ed *HindIII* di cloni dell'RNA2'. Corsie 1 e 5: RNA2 genomico; corsie da 2 a 4: cloni dell'RNA2'; M: marker Lambda/*HindIII*; m: marker VI

L'RNA2' è costituito da 3472 nt ed è risultato identico all'RNA2, ma con una delezione di 537 nt, dal nt 1286 al nt 1822. Esso presenta una singola ORF che si estende dal codone AUG in posizione 124-126 e codifica per una proteina (P2') costituita da 949 amminoacidi con un peso calcolato di 106 kDa. Gli eventuali prodotti maturi generati dalla proteolisi della proteina P2' sono la

proteina P2A e la proteina di rivestimento, con le stesse caratteristiche delle proteine codificate dall'RNA2 genomico, ed una proteina di movimento di peso inferiore per effetto di una delezione di 179 amminoacidi. Tale delezione è localizzata tra gli amminoacidi 389 e 567.

Le sequenze delle regioni non codificanti (“*Untranslated Region*”, UTR) al termine 5' mostrano una identità di sequenza pari al 72%. In particolare i primi 17 nt (UUGAAAAUUCUCUCACA) di entrambi gli acidi nucleici sono risultati identici e contengono una sequenza consenso (sottolineata) presente all'estremità 5' degli RNA dei nepovirus.

Le sequenze non tradotte al termine 3' contengono 501 nt (RNA1) e 500 nt (RNA2) e condividono un'identità di sequenza del 99%.

RNA1	TTGAAAATTCTCTCACACGGTTCGC---CTTTACTCAACTCTCAGTTTCTCTCTTTAAAT	56
RNA2	TTGAAAATTCTCTCACAGGGTTCCTCGATACGTTCTTTCTTC-CCTTCTTCCTTTAAAT	59
	***** *	
RNA1	TGTTTTGA-GATTTTGAT---AAATTTTGT---TTTGAGTGATCCACTGTG--ACT--	103
RNA2	TGTTTTAAAGATTGCGATTTTGAAGTTTCCTACTCTTTGGCTCCCCATTTCTTACTGC	119
	***** *	
RNA1	----	
RNA2	TCCA	123

A

Fig. 32 – Allineamenti delle sequenze 5'(A) e 3' (B) terminali degli RNA genomici del virus riscontrato in *Aeonium*.

RNA2	AACGCTGTCAATTAAATTTGATGGCTTTTGTGTTGTTGAGTCTTCTAACCAGGAGCAGCCCTT	60
RNA1	CTTGCTGTCAATTGATTTGATGGCTTTTGTGTTGTTGAGTCTTCTAACCAGGAGCAGCCCTT	60
	***** *	
RNA2	CTGATCTTTGTTGATTGGAACCTTGTGTTGACTTGGTGGTTAGTTAGACGCGTC AATAAC	120
RNA1	CTGATCTTTGTTGATTGGAACCTTGTGTTGACTTGGTGGTTAGTTAGACGCGTC AATAAC	120
	***** *	
RNA2	CGGGATCTTAATTGATTC CGTCTTAGTTTCCTGCTCCTACTGGACTGGTCTGCTCTTAG	180
RNA1	CGGGATCTTAATTGATTC CGTCTTAGTTTCCTGCTCCTACTGGACTGGTCTGCTCTTAG	180
	***** *	
RNA2	GTGAGTGGGGAAGCTGTATAAACTCAGCTTTTCGGGGGTGAGAGCCCGAGAATGTCTGTC	240
RNA1	GTGAGTGGGGAAGCTGTATAAACTCAGCTTTTCGGGGGTGAGAGCCCGAGAATGTCTGTC	240
	***** *	
RNA2	TGTCAGCTGCTTGTGTAAATGAGCTTTC TCCGAGGATAGCTCTC CTCGGCACAA GTGAAA	300
RNA1	TGTCAGCTGCTTGTGTAAATGAGCTTTC TCCGAGGATAGCTCTC CTCGGCACAA GTGAAA	300
	***** *	
RNA2	ACGACTACCGTGGCACGTTAGTAGCCAGACGGTCGGGGTAAAATCCCTAGTTAACAAAAAT	360
RNA1	ACGACTACCGTGGCACGTTAGTAGCCAGACGGTCGGGGTAAAATCCCTAGTTAACAAAAAT	360
	***** *	
RNA2	GTGTTAGGACGTTGTTTCTGGCAGCTTTGTTGGTCTATTGAGTTTCTAAAAGCTGCTTT	420
RNA1	GTGTTAGGACGTTGTTTCTGGCAGCTTTGTTGGTCTATTGAGTTTCTAAAAGCTGCTTT	420
	***** *	
RNA2	GGTATTTTGTGTGTTTGA GCCCACTGTT CATATTTGGTTTGGGGCCTTGATGTTTCTTA	480
RNA1	GGTATTTTGTGTGTTTGA GCCCACTGTT CATATTTGGTTTGGGGCCTTGATGTTTCTTA	480
	***** *	
RNA2	GTGTCGTGTTTGTCCAACAC- 500	
RNA1	GTGTCGTGTTTGTCCAACACA 501	
	***** *	

B

L'organizzazione genomica del nepovirus oggetto di studio è schematizzata in Fig. 33.

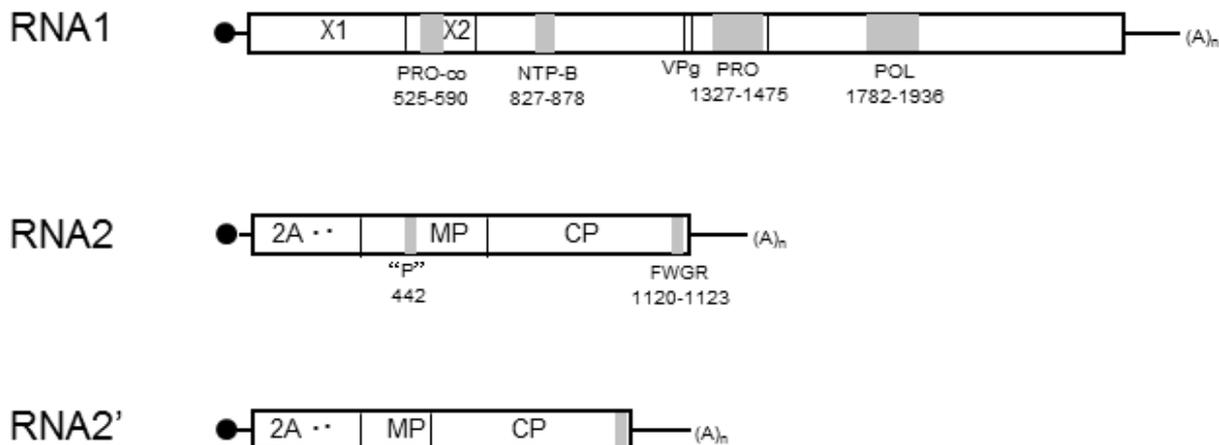


Fig. 33 – Organizzazione genomica del virus riscontrato in *Aeonium*. Le ORF presenti nei tre acidi nucleici sono indicate come rettangoli neri e le linee verticali nere al loro interno rappresentano i siti di taglio riconosciuti dalla proteasi virale. Le linee laterali ai rettangoli rappresentano le regioni non tradotte. I singoli geni sono indicati con i loro acronimi. Al terminale 5' è presente un pallino nero pieno che rappresenta la VPg, mentre al terminale 3' è indicata la presenza di una coda di adenine. I tratti grigi nei rettangoli rappresentano i domini identificati nelle sequenze amminoacidiche.

In Fig. 34 è mostrata il terzo acido nucleico ed il particolare della delezione presente in esso. La sequenza completa è stata ottenuta allineando diversi cloni parziali ed ogni singolo nucleotide è stato confermato in tre cloni differenti.

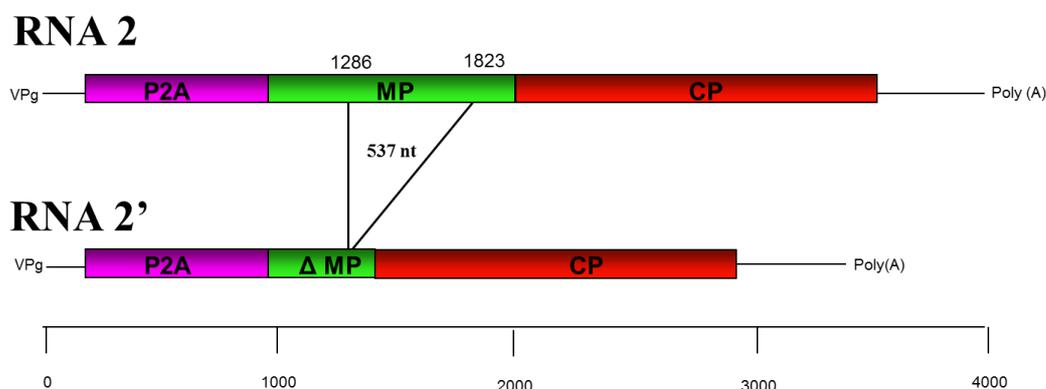


Fig. 34 – Organizzazione genomica del terzo acido nucleico. Viene evidenziata la delezione nella regione della proteina di movimento. Tale acido nucleico è presente solo nei tessuti di *Aeonium*.

4.7 Confronto con altri Nepovirus

E' stato effettuato il confronto tra le sequenze amminoacidiche del nepovirus isolato da *Aeonium* e le sequenze, di alcuni nepovirus appartenenti ai 3 sottogruppi A, B e C, disponibili in banca dati. In Tab. 13 sono riportati i valori di omologia, espressi in percentuale, tra le sequenze delle proteine P1, P2, CP e Pro-Pol. I dati ottenuti indicano che il virus in esame condivide una certa omologia di sequenza con TRSV (dato evidenziato in rosso) sia per la regione codificante la proteina di rivestimento, sia per la regione compresa tra i domini della proteasi e della polimerasi.

Tab. 13 – Percentuali di identità tra le sequenze amminoacidiche di varie regioni del virus riscontrato in *Aeonium* e quelle di altri nepovirus.

Virus	P1	P2	Pro-Pol	CP
<u>Sottogruppo A</u>				
ArMV	31	23	44	27
GDefV	30	20	42	25
GFLV	30	20	42	25
MMMoV	31	29	44	29
RpRSV	28	23	31	25
TRSV	78	70	84	66
<u>Sottogruppo B</u>				
BRSV	26	17	38	20
CNSV	28	19	36	20
GCMV	27	20	38	21
TBRV	27	20	40	25
<u>Sottogruppo C</u>				
BRV	27	17	38	23
CLRV	25	15	37	21
GBLV	27	16	42	21
ToRSV	27	15	38	23

I numeri di accessione delle sequenze sono: ArMV (*Arabidopsis mosaic virus*; NC_006057, NC_006056); GDefV (*Grapevine deformation virus*; NC_017939, NC_017938); GFLV (*Grapevine fanleaf virus*; NC_003615, NC_003623); MMMoV (*Melon mild mottle virus*; AB518485, AB518486); RpRSV (*Raspberry ringspot virus*; NC_005266, NC_005267); TRSV (*Tobacco ringspot virus*; NC_005097, NC_005096); BRSV (*Beet ringspot virus*; NC_003693, NC_003694); CNSV (*Cycas necrotic stunt virus*; NC_003791, NC_003792); GCMV (*Grapevine chrome mosaic virus*; NC_003622, NC_003621); TBRV (*Tomato black ring virus*; NC_004439, NC_004440); BRV (*Blackcurrant reversion virus*; NC_003509, NC_003502); CLRV (*Cherry leafroll virus*; NC_015414, NC_015415); GBLV (*Grapevine Bulgarian latent virus*; NC_015492, NC_015493); ToRSV (*Tomato ringspot virus*; NC_003840, NC_003839).

Avendo riscontrato una omologia di sequenza con TRSV, il confronto delle sequenze aminoacidiche è stata esteso anche agli altri prodotti genici espressi dai due virus.

In Tab. 14 sono riportati i valori di identità, espressi in percentuale, tra le sequenze amminoacidiche dei singoli peptidi codificati dal TRSV e dal nepovirus da *Aeonium*; è, inoltre, mostrata la percentuale di identità tra le sequenze nucleotidiche delle regioni non codificanti ai terminali 5' e 3'.

Tab. 14 – Percentuali di identità tra le sequenze amminoacidiche e nucleotidiche (UTR) di TRSV ed il virus riscontrato in *Aeonium*.

RNA1		RNA2	
X1	66	2A	59
X2	76	MP	84
NTP-B	89	CP	66
VPg	83	5'UTR	82
PRO	74	3'UTR	83
POL	77		
5'UTR	65		
3'UTR	83		

L'omologia tra le sequenze della proteina di rivestimento del virus da *Aeonium* e di alcune specie di nepovirus è stata utilizzata per stimare il grado di relazione all'interno del genere *Nepovirus* e tra i sottogruppi A, B e C.

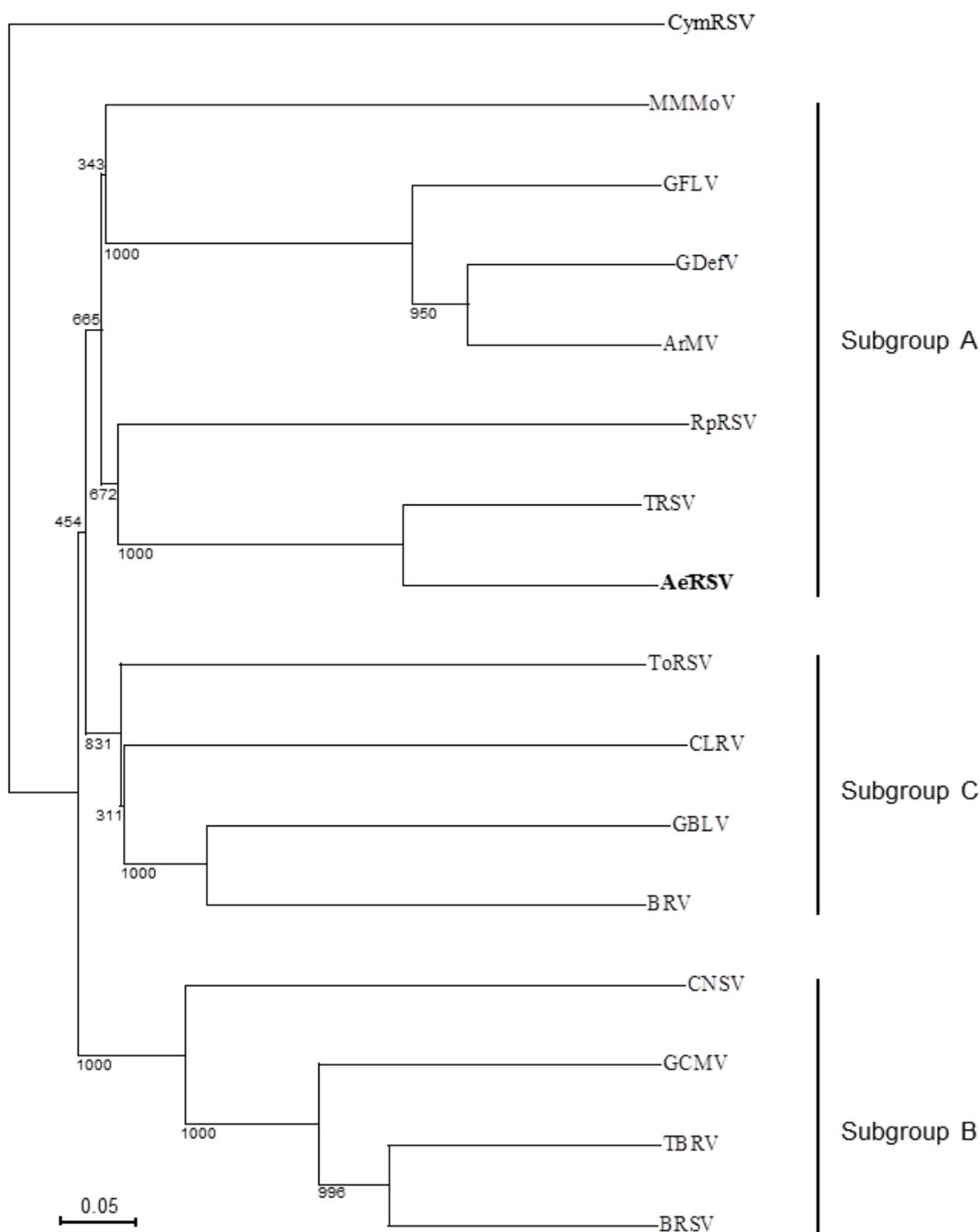


Fig. 35 - Albero filogenetico, ottenuto utilizzando il programma MEGA, prodotto dall'allineamento tra le sequenze della proteina di rivestimento dell'AeRSV e di altri membri del genere *Nepovirus*. Il *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV, genere *Tombusvirus*; numero di accessione NC_003532) è utilizzato come outgroup. I valori di bootstrap sono mostrati nei punti di ramificazione. La barra indica il numero di sostituzioni residue per sito. I numeri di accessione delle sequenze sono elencati nella didascalia della Tab. 14

4.8 Produzione di una sonda molecolare e validazione di protocolli “tissue printing” e “dot-blot”

La sonda molecolare utilizzata per le analisi Northern è stata utilizzata in test di “tissue printing” ed ibridazione “dot-blot” per la messa a punto e la validazione di nuovi protocolli diagnostici di tipo molecolare.

In Fig. 36 sono mostrati i risultati dell’ibridazione di due membrane preparate utilizzando RNA estratto da foglie di *Aeonium*, di *N. benthamiana* infetta e *N. benthamiana* sana, utilizzando due protocolli di estrazione differenti: “silica-capture” e fenolo acido. Il risultato indica che il segnale di ibridazione è presente solo nei campioni ottenuti da tessuti infetti. Il segnale ottenuto è risultato più intenso nei campioni estratti con il metodo fenolo cloroformio.

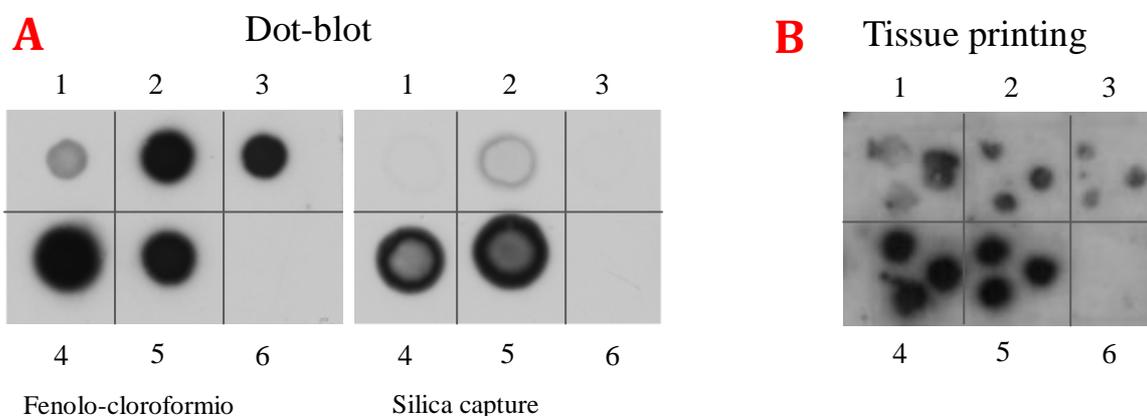


Fig. 36 – (A) “Dot-blot” e (B) “Tissue printing” di campioni ottenuti da *Aeonium* (1), *N. benthamiana* con sintomi locali (2 e 3), *N. benthamiana* con sintomi sistemici, *N. benthamiana* inoculata con tampone fosfato. Per l’analisi dot-blot i campioni di RNA sono stati ottenuti con il metodo di estrazione fenolo-cloroformio ed il metodo “silica-capture”.

I risultati del “tissue printing” (Fig. 36 B) indicano che la sensibilità e l’attendibilità del metodo è elevata anche perché è possibile rilevare il virus direttamente in *Aeonium*, pianta in cui esso è presente a più basse concentrazioni. Confrontando i risultati del “dot-blot” e del “tissue printing” si

nota che il segnale di ibridazione è meno intenso per i campioni prodotti con foglie di *Aeonium* rispetto a quelli ottenuti da *N. benthamiana*.

4.9 Indagini epidemiologiche

Utilizzando i diagnostici prodotti sono state svolte indagini epidemiologiche in tre provincie della Regione Campania (Napoli, Salerno, Caserta) per verificare la presenza del virus. A tal fine sono state saggiate piante appartenenti alle specie di seguito elencate:

<i>Aeonium sp</i>	<i>Clivia miniata</i>	<i>Pleomele reflexa</i>
<i>Crassula ovata</i>	<i>Coleus spp</i>	<i>Sansevieria trifasciata</i>
<i>Crassula sp</i>	<i>Columnnea sp</i>	<i>Yucca sp</i>
<i>Echeveria agavoides</i>	<i>Sinningia sp</i>	<i>Polyscias sp</i>
<i>Echeveria setosa</i>	<i>Dianthus L.</i>	<i>Portulaca sp</i>
<i>Kalanchoe sp</i>	<i>Dipladenia sp</i>	<i>Rhipsalis ewaldiana</i>
<i>Kalanchoe thyrsiflora</i>	<i>Dracaena sp</i>	<i>Rhipsalis sp</i>
<i>Aloe x spinosissima</i>	<i>Euphorbia loricata</i>	<i>Schlumbergera sp</i>
<i>Alstroemeria sp</i>	<i>Euphorbia milii</i>	<i>Opuntia subulata</i>
<i>Antirrhinum majus</i>	<i>Euphorbia tirucalli</i>	<i>Epiphyllum sp</i>
<i>Beaucarnea recurvata</i>	<i>Fuchsia sp</i>	<i>Rubus idaeus</i>
<i>Begonia elatior</i>	<i>Gloriosa superba</i>	<i>Scaevola spp</i>
<i>Begonia sp</i>	<i>Hibiscus moscheutos</i>	<i>Zamia furfuracea</i>
<i>Bouganvillea sp</i>	<i>Hibiscus sp</i>	<i>Zantedeschia sp</i>
<i>Calibrachoa sp</i>	<i>Pachira aquatica</i>	<i>Zinnia sp</i>
<i>Petunia surfinia</i>	<i>Impatiens sp</i>	<i>Senecio repens</i>
<i>Lobelia erinus</i>	<i>Lantana camara</i>	
<i>Campanula sp</i>	<i>Verbena sp</i>	
<i>Celosia cristata</i>	<i>Lysimachia sp</i>	
<i>Celosia spicata</i>	<i>Pelargonium zonale</i>	
<i>Celosia spp</i>	<i>Opuntia subulata</i>	

Tutte le piante sono state analizzate sia con il metodo ELISA sia con l'ibridazione molecolare. Nessun campione è risultato positivo quando analizzato con l'antisiero prodotto contro il nepovirus da *Aeonium*, mentre alcuni campioni (*Opuntia subulata*, *Ripsalis sp*, *Senecio repens*, *Epiphyllum sp*) sono risultati positivi (Fig. 37 A e B) in test di ibridazione molecolare con la sonda polivalente R3T. Le analisi effettuate hanno indicato che in nessuno dei campioni era presente il virus riscontrato in *Aeonium*.

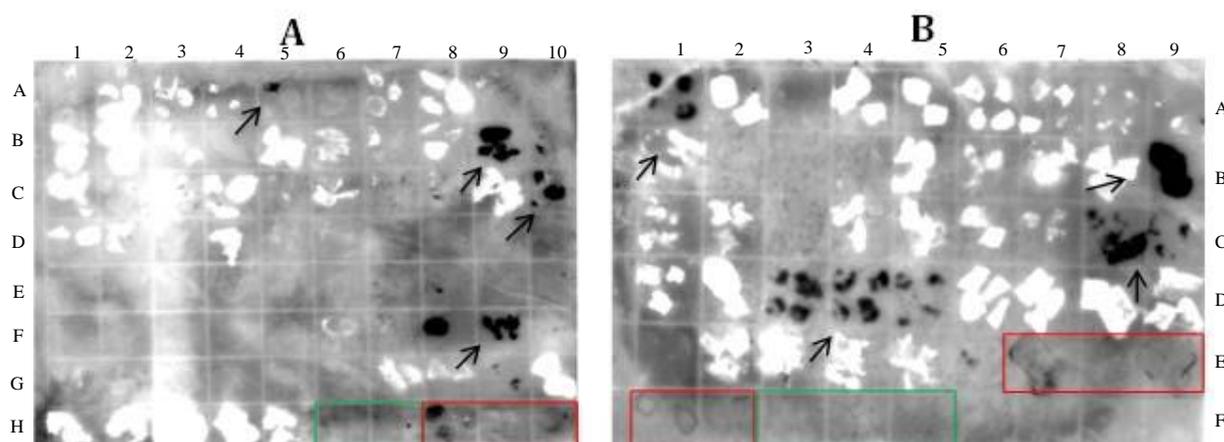


Fig. 37 – (A) "Tissue printing" di membrane preparate con le specie elencate in pag 24. L'ibridazione è stata effettuata con la sonda R3T. Le frecce nere indicano i segnali di ibridazione positivi. Nella membrana A i campioni positivi si trovano in A5, B9-10, C10, F7-8. Nella membrana B i campioni positivi si trovano in A1, B9, C8-9, D3-4-5. In entrambe le membrane i controlli negativi si trovano nelle posizioni con contorno verde, mentre i controlli positivi nelle posizioni con contorno rosso.

Discussione I

Le prime indicazioni sulla possibile infezione di un nepovirus in piante di *Aeonium* sono emerse dall'osservazione che tutte le piante test, infettate artificialmente con succo grezzo estratto da tale ospite, dopo un tempo variabile da specie a specie, reagivano alla presenza del virus manifestando sintomi (anche se di tipologia variabile secondo la specie indicatrice) ma che, nel tempo, andavano incontro a un processo di risanamento per cui le foglie emesse nei nuovi palchi fogliari non manifestavano sintomi. Questo fenomeno, più comunemente conosciuto come "*recovery*", è tipico delle specie virali appartenenti al genere nepovirus (Wingard, 1927; Cadman, 1963; Sanfacon et al., 2009). La conferma della presenza di un nepovirus in *Aeonium* si è avuta, grazie alle osservazioni al microscopio elettronico di preparati di succo grezzo estratti dalle piante "*test*" sintomatiche. In essi era evidente la presenza di particelle virali a contorno perfettamente esagonale di circa 30 nm, alcune delle quali completamente penetrate dall'acetato di uranile perché prive di acido nucleico (Francki et al., 1985).

Se da una parte l'analisi della gamma di ospiti artificiali e la tipologia di risposta ha consentito di formulare l'ipotesi della presenza di un nepovirus in *Aeonium*, non ha, tuttavia, fornito informazioni utili per l'individuazione della specie virale. La gamma di ospiti, ma soprattutto il tipo di sintomi da essi espressi, non rispecchiava in pieno il tipo di risposta riportato in letteratura per una determinata specie virale. Ad esempio, il *C. quinoa*, un ospite comunemente utilizzato per propagare i nepovirus (Cadman et al., 1960; Pinck et al., 1988), ha reagito all'inoculazione manifestando lesioni locali necrotiche, necrosi della gemma apicale e morte della pianta. Questa sintomatologia è riportata per le infezioni causate dal *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Blueberry leaf mottle virus* (BLMV), *Raspberry ringspot virus* (RpRSV) e *Grape crome mosaic virus* (GCMV) (Stace-Smith, 1962; Ramsdell e Stace-

Smith 1979; Murrant, 1970; Martelli, 1965), ma non nel caso del *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Tomato black ring virus* (TBRV), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) e *Arabis mosaic virus* (ArMV), specie virali per le quali non è stata mai riportata la morte dell'ospite (Schmelzer, 1963; Cadman, 1960; Cadman et al., 1960). L'infezione da TRSV, ad esempio, induce in *C. quinoa* lesioni locali clorotiche, dopo circa 7 giorni dall'inoculazione, cui segue la produzione di foglie asintomatiche.

Le piante di *Nicotiana*, compresa la *N. glutinosa*, hanno reagito all'infezione mostrando anelli clorotici, mosaico e schiarimento delle nervature, sintomi comunemente indotti dai nepovirus ad eccezione del TBRV, ToRSV, GFLV che normalmente non infettano *N. glutinosa* (Schmelzer, 1963; Stace-Smith, 1962; Cadman et al., 1960).

Tra le specie ortive, il pomodoro (cv. Principe Borghese) ha reagito mostrando anelli clorotici a livello locale e "oakleaf" in foglie emesse successivamente all'inoculazione. Questa specie è riportata come pianta suscettibile a infezioni da ArMV, TBRV, BLMV, ToRSV, TRSV (Cadman, 1960; Schmelzer, 1963; Childress e Ramsdell, 1986a; Stace-Smith, 1962; Harrison e Murrant, 1977; Brunt et al., 1996; Sneideris et al., 2012) ma per nessuno di questi virus sono stati mai descritti sintomi di "oakleaf". Il peperone (cv. Friariello) specie, invece, riportata come suscettibile alle infezioni da TRSV, ToRSV e TBRV (Murrant, 1970; Villalon, 1975; Conti e Masenga, 1977; Martelli e Quacquarelli, 1983), non è risultato suscettibile al virus riscontrato in *Aeonium*.

La *Vigna unguiculata* ha reagito all'infezione mostrando anelli necrotici, sia a livello locale sia sistemico, e necrosi del fusto. Tale reazione è causata da molti nepovirus quali TRSV, GCMV, ArMV, TBRV, ToRSV (Martelli et al., 1965; Schmelzer, 1962; Schmelzer, 1963; Stace-Smith 1962), ma mai registrata nel caso di BLMV (Ramsdell e Stace-Smith, 1979).

Il basilico ha reagito mostrando anelli necrotici a livello locale e mosaico su foglie emesse successivamente all'inoculazione. Tale ospite è riportato come non suscettibile alle infezioni da ArMV (Schmelzer, 1962).

Inoltre, non sono stati riscontrati né sintomi né infezione in lattuga e cicoria, specie suscettibili a infezioni da TRSV e ArMV (Wingard, 1928; Schmelzer, 1962).

Poiché dal confronto tra le risposte ottenute e i dati riportati in letteratura non è stato possibile risalire alla specie virale, si è ricorso a un'indagine molecolare. I dati preliminari ottenuti clonando e sequenziando alcuni frammenti genomici del virus in studio hanno mostrato una omologia di sequenza pari al 72% con il TRSV, specie virale peraltro mai riportata in una pianta succulenta. La possibilità della presenza di un nuovo ceppo di TRSV in piante di *Aeonium* con macule anulari è stata messa da parte nel momento in cui è stata verificata l'assenza di una relazione sierologica tra i due virus appurata mediante test ELISA e di immunodecorazione utilizzando antisieri commerciali e non contro alcuni isolati di TRSV ed impiegando, anche, un antisiero da noi prodotto contro il virus in studio.

Entrambi gli RNA genomici del virus in esame sono stati completamente sequenziati e l'analisi BLAST ha evidenziato una omologia di sequenza con il TRSV pari al 69% per l'RNA2 e al 72% per l'RNA1.

L'organizzazione genomica del virus è stata esaminata nel dettaglio (Fig. 33). Entrambi gli RNA contengono singole "griglie aperte di lettura" (ORF) codificanti per poliproteine. L'RNA di maggiori dimensioni presenta il primo codone AUG in posizione 104-106 con una adenina in posizione -3, una citosina in posizione -2 ed una guanina in posizione +4, in un contesto favorevole alla traduzione in cellule eucariotiche (Kozak, 1989). I motivi amminoacidici identificati sono stati confrontati con quelli riscontrati per altre specie del genere nepovirus. Il motivo putativo del cofattore della proteasi (F-x₂₁-W-x₁₁-L-x₂₂-L-x-T tra gli aa nelle posizioni 525-590) è leggermente

differente dalla sequenza consenso individuata per questa proteina (Rott et al., 1995); la maggiore differenza è dovuta alla sostituzione dell'ultimo amminoacido (E con T). Il motivo putativo della elicasi, indicata come proteina NTB (Gorbalenya e Koonin, 1989), si trova tra gli amminoacidi 827 e 878, in due siti: il primo (G-x₄-GKS) tra le posizioni 827 e 834 ed il secondo (DD) alle posizioni 877-878. Il motivo della proteasi virale (H-x₃₅-E-x₉₈-CG-x₈-G-x₅-G) si trova tra le posizioni 1324 e 1475; gli amminoacidi sottolineati in parentesi H, E e C costituiscono la probabile triade catalitica dell'enzima (Dessens e Lomonosof, 1991; Gorbalenya et al., 1989; Margis e Pinck, 1992). La regione C-terminale della sequenza contiene il motivo caratteristico della RNA polimerasi RNA dipendente tra le posizioni 1782 e 1936 (D-x₄-D-x₆₉-G-x₃-T-x₃-N-x₃₃-GDD-x₃₃-DK) (Argos, 1988). La sequenza consenso riportata da Mayo e Fritsch (1994) per la proteina legata al terminale 5' non è stata, invece, riscontrata.

Allineando la sequenza della proteina P1 con altre sequenze di nepovirus sono stati determinati i presunti siti di taglio riconosciuti dalla proteasi virale e, di conseguenza, le dimensioni dei prodotti maturi. Allineando le regioni N-terminale del virus in esame e quella dell' *Arabis mosaic virus* (ArMV) è stato individuato un sito di taglio, tra gli amminoacidi C⁶⁵¹/G⁶⁵², che determina il distacco dalla proteina NTB (Wetzel et al., 2008). Il peptide N-terminale, a sua volta, sarebbe scisso nelle due proteine X1 e X2 nel punto C⁴⁵⁰/S⁴⁵¹. La proteina VPg è localizzata tra l'elicasi e la proteasi; il confronto con la sequenza chimicamente determinata da Zolloua (1996) per il TRSV, indica che il primo amminoacido della sequenza della VPg è in posizione 1254, mentre non è stato individuato con certezza il sito di taglio a valle e, di conseguenza, l'ultimo amminoacido della sequenza. Il sito di taglio C¹⁴⁹⁹/S¹⁵⁰⁰ consente il rilascio della proteasi matura (circa 215 aa) e della RNA polimerasi (815 aa). Questo sito è stato individuato mediante confronto con la proteina P1 di GFLV (Ritzenthaler et al., 1991; Margis et al., 1994).

L'RNA2 presenta un codone AUG in posizione 124-126 ed è preceduto da una citosina in posizione -2 e da una guanina in +4, contesto meno favorevole alla traduzione rispetto all'RNA1 (Kozak, 1989). La poliproteina P2 contiene il motivo P, conservato tra le proteine di movimento dei nepovirus (Koonin et al., 1991; Mushegian, 1994), in posizione 442, mentre tra gli amminoacidi 1120 e 1123 è presente la sequenza FWGR che si presenta molto simile al motivo FYGR della proteina di rivestimento di *Tomato ringspot virus* (ToRSV) (Le Gall et al., 1995). La porzione N-terminale della poliproteina P2 (260 aa circa) condivide una bassa omologia di sequenza con la proteina 2A^{HP} di *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), proteina coinvolta nella replicazione dell'RNA (Margis et al., 1993; Gaire et al., 1999; Ritzenthaler et al., 2002) e che, inoltre, contiene un motivo prolinico presente anche nella porzione N-terminale di ToRSV (Carrier et al., 2001). Ciò fa supporre un coinvolgimento di tale peptide nella replicazione dell'RNA2. Il confronto tra le sequenze amminoacidiche delle proteine di rivestimento del TRSV e del virus oggetto di studio ha mostrato la presenza del sito di taglio M⁶¹⁵/A⁶¹⁶. Tale sito di taglio è insolito per i nepovirus ed è stato individuato solo per il *Melon mild mottle virus* (MMMoV) (Tomitaka et al., 2011).

L'organizzazione genomica di entrambi gli acidi nucleici è assimilabile a quella descritta per i nepovirus del sottogruppo A (Sanfacon et al., 2009).

L'RNA di dimensioni inferiori è stato sequenziato e presenta una delezione nella regione della proteina di movimento.

In definitiva il virus oggetto di studio presenta, nella pianta succulenta, tre RNA genomici ma, inoculato su piante test presenta un genoma costituito da solo due acidi nucleici. Il ruolo biologico di questo terzo RNA rimane da chiarire ma l'ipotesi più probabile è che potrebbe essere un acido nucleico difettivo interferente (DI) che, come tutti i DI, potrebbe influenzare l'accumulo del virus *helper* attenuandone i sintomi.

Tra i nepovirus, una variabilità nel genoma è stata descritta solo per due specie: per un isolato di ArMV, per il quale è stata individuata una seconda specie di RNA2 (Loudes et al., 1995; Wetzel et al., 2002), e per TBRV, per il quale è stato individuato un secondo RNA1 (Hasiów-Jaroszewska et al., 2012).

Nella UTR al terminale 5' non sono state individuate sequenze in grado di formare una struttura secondaria conservata (Wetzel et al., 2001).

Le sintomatologie espresse dagli indicatori biologici, la morfologia delle particelle, le caratteristiche citopatologiche e l'organizzazione genomica supportano la classificazione del virus isolato da *Aeonium* nel genere *Nepovirus* (famiglia *Secoviridae*, ordine *Picornavirales*; Sanfaçon et al., 2012), un taxon che comprende tre sottogruppi rispetto alla lunghezza dell'RNA2.

Poiché l'RNA2 sequenziato presenta una lunghezza di 4010 nt, il virus da noi studiato rientrerebbe nel sottogruppo A, ipotesi confermata mediante un'analisi filogenetica condotta allineando le sequenze amminoacidiche delle proteine di rivestimento di alcuni nepovirus.

I criteri di demarcazione nella famiglia *Secoviridae*, imposti dal Comitato Internazionale per la Tassonomia dei Virus (ICTV), includono l'assenza di relazioni sierologiche e percentuali di identità inferiori al 75% per le sequenze amminoacidiche della proteina di rivestimento (CP), e all'80% per la regione amminoacidica Pro-Pol compresa tra il motivo CG della proteasi e il motivo GDD della polimerasi (Sanfaçon *et al.*, 2012). Confrontando le sequenze determinate per il virus in esame con quelle di altri nepovirus è stato accertato che la percentuale di identità per la CP è ben al di sotto del valore soglia (66%), mentre per la regione Pro-Pol l'identità è leggermente superiore al limite fissato (84%). Inoltre, il confronto tra i singoli domini presenti nelle poliproteine di TRSV e del virus oggetto dello studio ha svelato una bassa identità di sequenza in tutte le regioni del genoma.

Tali dati e la mancanza di relazioni sierologiche con TRSV supportano la tesi che il virus riscontrato in *Aeonium* sia un nuovo nepovirus,

filogeneticamente vicino ma chiaramente distinto dal *Tobacco ringspot virus*. Per questo virus è stato proposto il nome di Virus della maculatura anulare dell'*Aeonium* (*Aeonium ringspot virus*, AeRSV).

Per l'AeRSV sono stati prodotti due diagnostici, un kit ELISA e una sonda molecolare, che hanno permesso di condurre indagini per verificare la presenza del patogeno in altre piante appartenenti alla famiglia delle *Crassulaceae* e in altre specie ornamentali.

Ad eccezione del ritrovamento in alcune piante di *Aeonium* di un giardino privato di Scafati, tale virus non è stato riscontrato né in altre piante di *Aeonium* né in altre specie vegetali appartenenti alle *Crassulaceae* né in nessuna altra specie ornamentale analizzata. Rimane quindi da chiarire l'intrigante aspetto delle sue origini e della sua epidemiologia.

Risultati 2

6.1 Caratterizzazione del processo infettivo in *N. benthamiana*

Il processo infettivo indotto dal nepovirus è stato caratterizzato utilizzando come ospite la *N. benthamiana*. In condizioni controllate di luce, temperatura e fotoperiodo (5000 lux, 22°C, 16/8 ore giorno/notte), l'ospite ha reagito mostrando sintomi locali e sistemici dopo 5-6 giorni, mentre l'emissione di foglie asintomatiche è cominciata dopo 10 giorni circa dalla comparsa dei sintomi. In generale, la pianta è in grado di superare la fase acuta dell'infezione nell'arco di 15-18 giorni, dall'inoculazione, alla temperatura di 22°C. Con l'evolversi della malattia è stato osservato che, nei palchi di foglie al di sopra del punto d'inoculo, il mosaico è localizzato solo in prossimità dell'apice e non sull'intero lembo fogliare. E' stata, inoltre, notata la presenza di foglie asintomatiche nei germogli secondari emessi dalle gemme localizzate all'ascella di foglie infette. Non sono stati mai riscontrati sintomi a carico del fusto e dei fiori.

Per valutare la correlazione tra la sintomatologia espressa dall'ospite e la temperatura, diverse piante di *N. benthamiana* sono state inoculate con AeRSV, ed allevate a temperature differenti.

In Fig.38A sono messi a confronto i sintomi espressi in una pianta allevata a 16/18°C notte/giorno (sinistra) ed una allevata a 27/29°C notte/giorno (destra). Le piante allevate a temperature più elevate hanno reagito, dopo 4-5 giorni, manifestando sintomi molto intensi sia a livello locale che sistemico, mentre nelle piante poste a 16/18°C il sintomo, mosaico lieve, dopo 10 giorni, era visibile solo all'apice di foglie infette sistemicamente. In entrambi i casi la reazione dell'ospite alla presenza del virus ha determinato,

dopo un certo lasso di tempo, la comparsa di foglie asintomatiche sul fusto principale e sui germogli laterali. Le piante sono state osservate per 4 settimane e, durante tale periodo, non sono stati riscontrati sintomi a carico di fusto e fiori.

L'analisi Northern (Fig. 38 B e C) ha permesso di evidenziare notevoli differenze nell'accumulo di RNA virale tra le piante allevate nelle differenti condizioni di crescita illustrate. Infatti, in piante allevate a 16/18°C l'RNA virale è stato riscontrato solo in estratti ottenuti, dopo 11 giorni dall'inoculazione, da foglia infetta sistemicamente e manifestante schiarimenti delle nervature (Fig. 38 B, riga 6). In piante allevate a temperatura superiore, l'RNA del virus è stato riscontrato in tutti gli estratti ottenuti (Fig. 38B, righe da 7 a 12) ed il maggiore accumulo di RNA virale è stato osservato, dopo una settimana, in una foglia inoculata (Fig. 12 C, riga 9). In dettaglio i risultati dell'analisi Northern (Fig. 38 B e C) sono stati ottenuti utilizzando RNA totale estratto da foglie con i seguenti sintomi: macule anulari clorotiche e mosaico (campioni 7 e 8), forte mosaico (campione 9), mosaico lieve (campione 11), foglia in "*recovery*" (campione 12), nella pianta mostrata a destra; assenza di sintomi (campioni da 1 a 5), schiarimento delle nervature (campione 6), nella pianta mostrata a sinistra.

L'analisi Northern mostra che l'accumulo di RNA virale procede lentamente in piante allevate a 16/18°C, mentre si svolge rapidamente in condizioni di temperatura elevata.

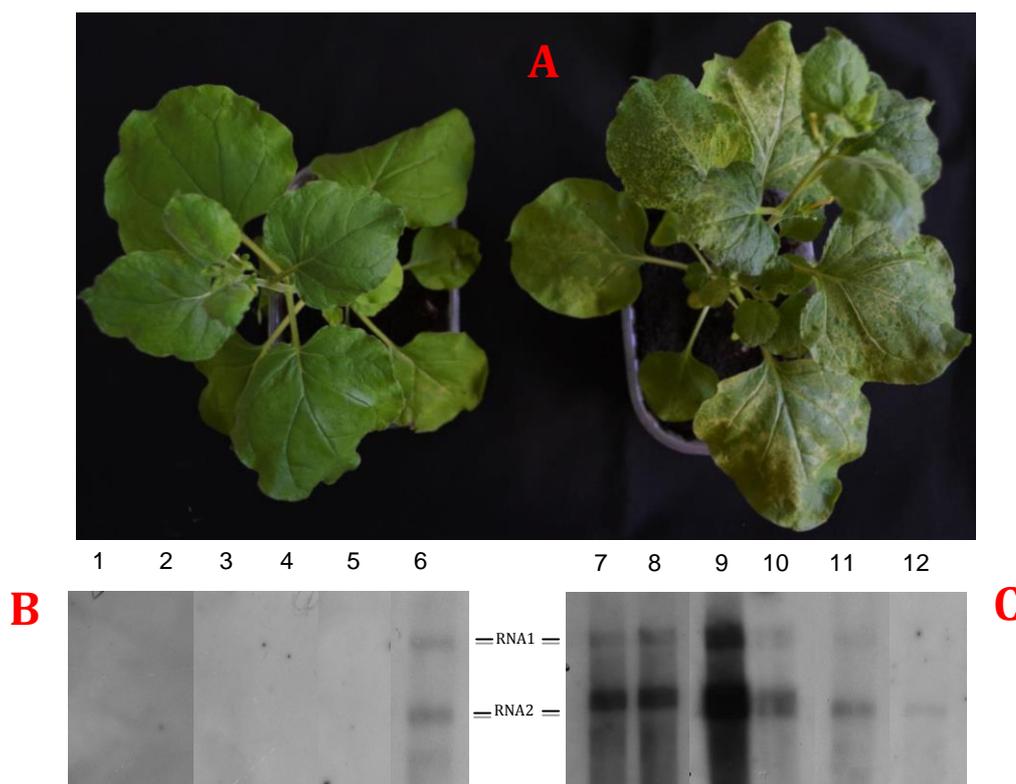


Fig. 38 – Analisi Northern di campioni prelevati da piante di *N. benthamiana* infette con AeRSV allevate a temperatura 16/18°C (1-6)22/29°C (7-12). righe 1, 7: foglie inoculate, 5 dpi; righe 2, 8: foglie sistemicamente infette, 5 dpi; righe 3, 9: foglie inoculate (stesse foglie delle righe 1, 7), 7 dpi; righe 4, 10: foglie sistemicamente infette (stesse foglie delle righe 2, 8), 7 dpi; righe 5, 11: foglie sistemicamente infette, 8 dpi; righe 6, 12: foglie sistemicamente infette, 11 dpi.

L'analisi Northern ha rivelato che anche i campioni di RNA ottenuti da foglie in “*recovery*” contengono RNA virale indicando, quindi, che il virus è presente anche in foglie prive di sintomi (Fig. 38 C, corsia 12).

La capacità della pianta di emettere foglie asintomatiche, dopo la fase acuta dell'infezione, è stata ulteriormente analizzata allevando un gruppo di piante a 22°C per una settimana per poi spostarle in camera di crescita a 15°C. Le piante hanno emesso foglie asintomatiche dopo 15 giorni dall'inoculazione. Dopo la comparsa del “*recovery*” sono state allevate a 15°C, lasciando inalterato il fotoperiodo (16/8 ore), ed osservate per tre settimane. Nessun sintomo è comparso, su foglie emesse successivamente al “*recovery*”, allevando le piante a temperatura inferiore (Fig. 39).



Fig. 39 – Piante di *N. benthamiana* allevate a 22°C (fotoperiodo 16/8 ore) per 7 giorni e poi spostate in camera di crescita a 15°C per 3 settimane. L: foglia con sintomi locali; S: foglia con sintomi sistemici; R: foglia in “recovery”.

6.2 Interazione AeRSV - Silenziamento genico dell'RNA

La caratterizzazione biologica del nepovirus riscontrato in *Aeonium* ha mostrato che nella maggior parte degli ospiti il virus è soggetto al silenziamento della pianta in quanto, dopo la fase acuta dell'infezione, si assiste all'emissione di foglie asintomatiche. E' stato, inoltre, verificato che il patogeno è in grado di persistere nei tessuti fogliari asintomatici (Fig. 38). L'ipotesi di una correlazione tra PTGS ed il "recovery" è stata valutata effettuando uno studio di interazione tra il virus ed alcuni mutanti di *N. benthamiana* ed *Arabidopsis thaliana*.

La possibilità, da parte del virus, di infettare piante di *Arabidopsis* è stata verificata mediante esperimenti di ibridazione molecolare. Tutte le piante del genotipo selvatico inoculate non hanno mostrato sintomi né locali né sistemici nell'arco di 3 settimane. Dopo 7 giorni dall'inoculo, sono state effettuate impronte di tessuto su membrana utilizzando piccioli fogliari e scapi fiorali; contemporaneamente sono state effettuate estrazioni di RNA totale per analisi Northern. Il risultato, mostrato in Fig. 40, indica che il segnale di ibridazione è presente in tutti i campioni analizzati ed è più intenso nel caso di impronte di piccioli fogliari e meno intenso nel caso di impronte ottenute dagli scapi fiorali.

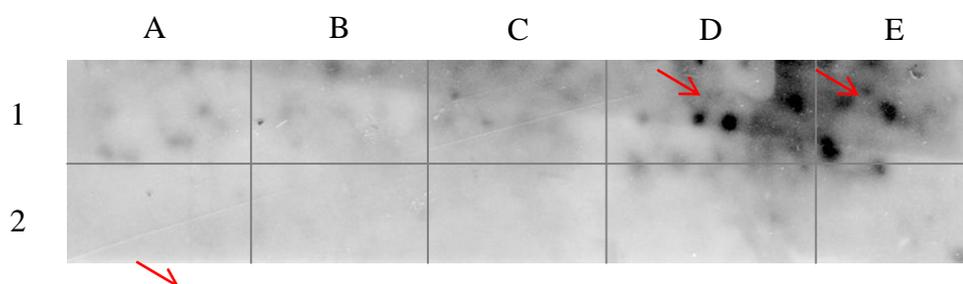


Fig. 40 – Analisi "tissue printing" di impronte prodotte con scapi fiorali (A1, B1 e C1) e piccioli fogliari (D1 ed E1) di *A. thaliana* Col-0 infetta con AeRSV. Le frecce indicano gli "spot" corrispondenti alle impronte di tessuto depositate su membrana. Da A2 ad E2 sono state effettuate impronte utilizzando piante sane.

In Fig. 41 è mostrato il risultato del Northern blot effettuato con RNA estratto da *A. thaliana* col-0 infetta con AeRSV. Sia in estratti prodotti da scapo fiorale (riga 3) che da foglia (riga 4) è presente l'RNA genomico del virus.

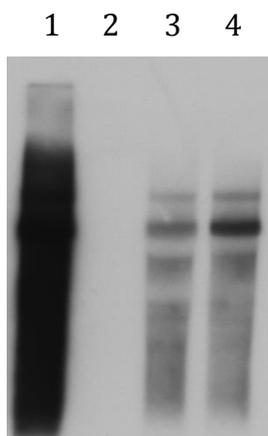


Fig. 41 – Analisi Northern blot di RNA estratto da *A. thaliana* Col-0 infetta con AeRSV. Riga 1: RNA estratto da particelle purificate riga 2: RNA estratto da *N. benthamiana* sana riga 3: RNA estratto da scapo fiorale di *A. thaliana* col-0 infetta con AeRSV riga 4: RNA estratto da foglie di *A. thaliana* col-0 infetta con AeRSV

6.2.1 Accumulo di RNA virale in mutanti di *A. thaliana*

L'inoculazione di AeRSV, nei mutanti di *A. thaliana* selezionati, non ha determinato la comparsa di alcun sintomo. In Fig. 42 sono mostrati a confronto le risposte di 5 diversi mutanti e quelle del genotipo selvatico, dopo 10 giorni dall'inoculo. La pianta alla sinistra di ogni coppia è stata inoculata con solo tampone fosfato. Non è stata riscontrata alcuna sintomatologia significativa a carico delle piante inoculate col virus. Non è stato osservato alcun ritardo della fioritura e non sono stati osservati sintomi a carico dei fiori.

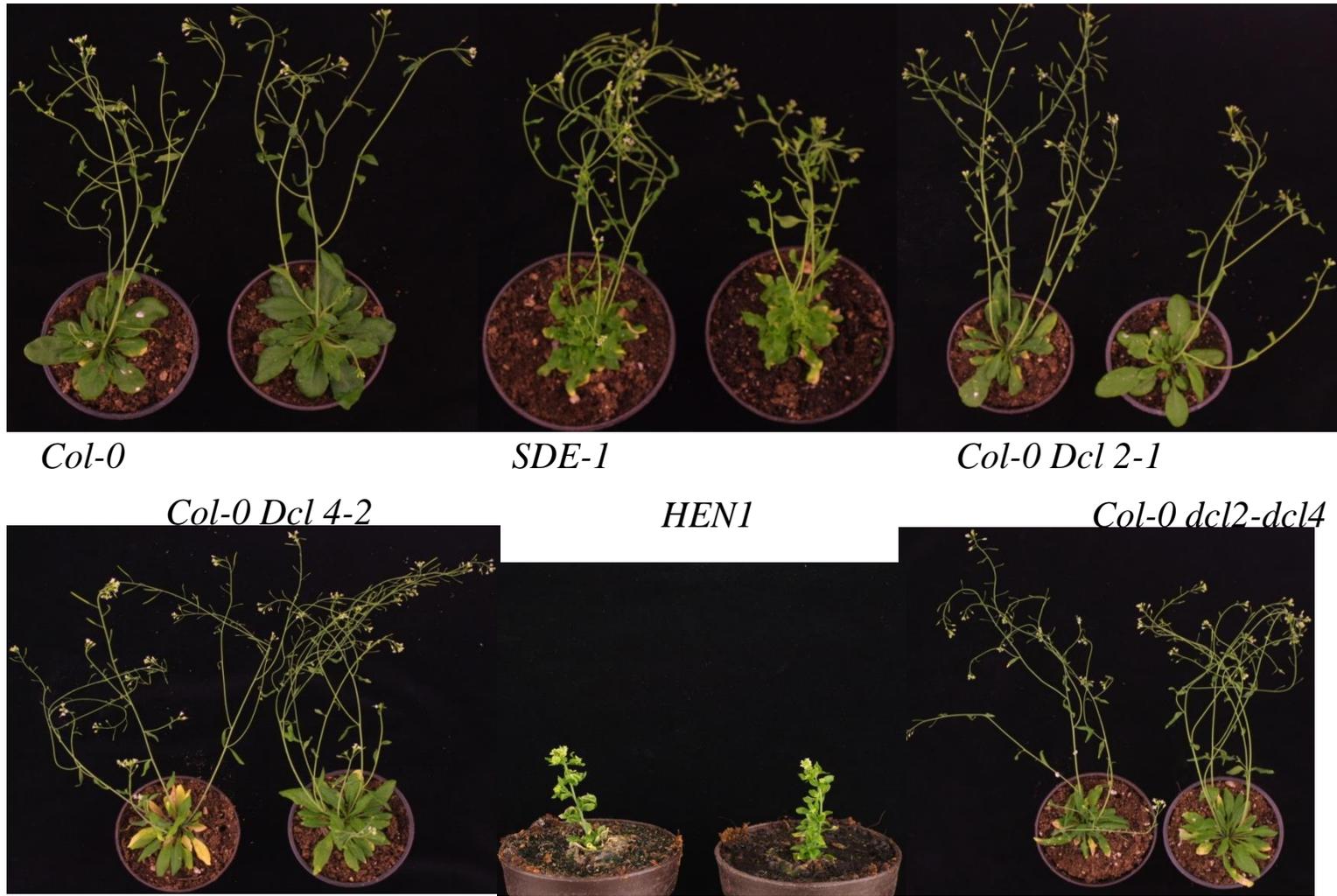


Fig. 42 – Risposta di 5 diversi mutanti di *A. thaliana* riscontrata 10 giorni dopo l'inoculazione con AeRSV. In ogni coppia la pianta di destra è stata inoculata con AeRSV mentre quella di sinistra con tampone fosfato.

In Fig. 43 è mostrato l'effetto dell'inoculazione di AeRSV in *A.thaliana* linea SUC-SUL. La pianta inoculata (a destra nella foto) presenta il tipico schiarimento delle nervature, su foglia inoculata e non, dopo 7 giorni dall'inoculazione. Tale schiarimento non regredisce in seguito all'inoculazione con AeRSV.



Fig. 43 – Genotipo SUC-SUL 10 giorni dopo l'inoculazione con AeRSV. A: pianta inoculata con tampone fosfato B: pianta inoculata con AeRSV La freccia rossa indica una foglia inoculata; la freccia gialla indica una foglia emessa successivamente all'inoculazione.

L'RNA totale è stato estratto da tutti i mutanti dopo 7 giorni dall'inoculazione meccanica. Il risultato dell'analisi Northern, mostrato in Fig. 44, indica che il segnale di ibridazione in tutti i mutanti e per la linea "reporter" SUC-SUL, è più intenso rispetto a quello del genotipo selvatico. In particolare il doppio mutante dcl2-dcl4 mostra un notevole accumulo di RNA virale nelle foglie emesse successivamente all'inoculazione.

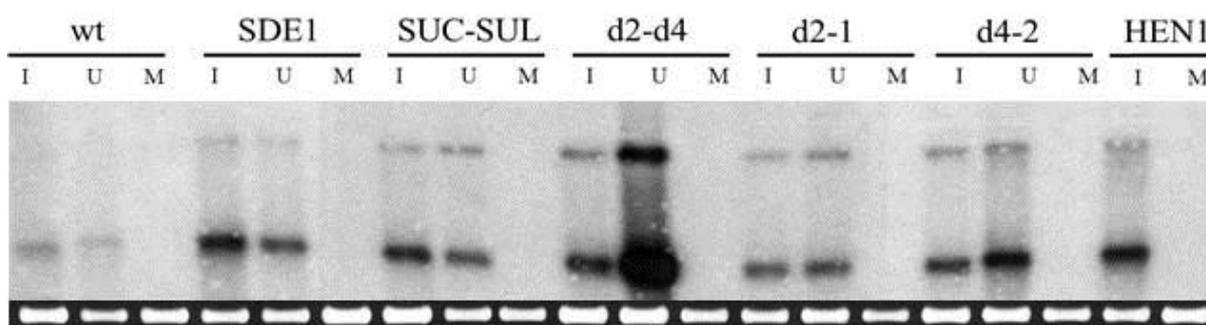


Fig. 44 – Accumulo di RNA virali in mutanti di *A. thaliana* dopo 7 giorni dall'inoculazione. I: foglia inoculata U: foglia emessa dopo l'inoculazione: M: foglia inoculata con solo tampone fosfato.

6.2.2 Accumulo di RNA virale in *N. benthamiana* RDR6

Le piante di *N. benthamiana* RDR6 inoculate con AeRSV hanno manifestato sintomi sistemici più intensi rispetto al genotipo selvatico (Fig. 45A). L'analisi Northern, infatti, mostra un accumulo di RNA virale superiore nel genotipo mutante rispetto al selvatico (Fig. 45B) sia in estratti ottenuti da foglie sistemicamente infette sia in quelli ottenuti da foglie in “recovery” (Fig. 45, righe 2,3 e 5,6).

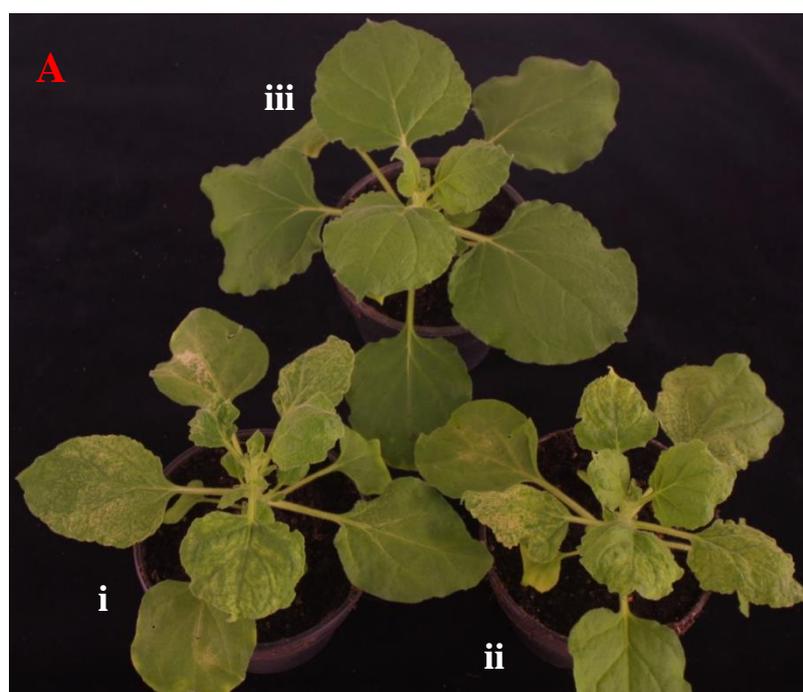
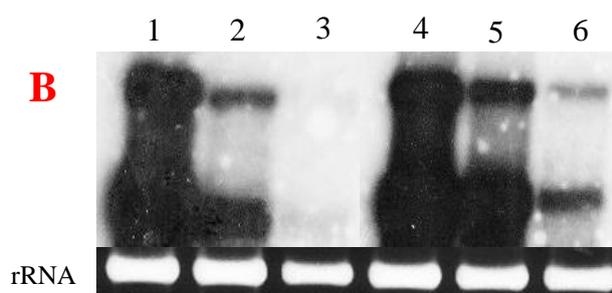


Fig. 45 –(A) Sintomi espressi da piante di *N. benthamiana* RDR6 dopo 7 giorni dall'inoculazione. i) *N. benthamiana* “wild type” inoculata con AeRSV; ii) *N. benthamiana* RDR6 inoculata con AeRSV; iii) *N. benthamiana* RDR6 inoculata con tampone fosfato; (B) Analisi Northern di campioni estratti 7 giorni dopo l'inoculazione. Le righe da 1 a 3 rappresentano RNA estratto dal genotipo selvatico; le righe da 4 a 6 RNA estratto; riga 1 e 4: foglie con sintomi locali; riga 2 e 5: foglie con sintomi sistemici; riga 3 e 6: foglie in “recovery”. Come controllo è stato utilizzato l'rRNA 28S.



6.2.3 Accumulo di piccoli RNA in *A. thaliana* e *N. benthamiana*

Sono state svolte indagini per verificare l'accumulo di piccoli RNA interferenti in tutti i mutanti utilizzati. Il protocollo applicato, prevede l'uso di una sonda a DNA prodotta contro il tratto 5' terminale dell'RNA2 (R5). In Fig. 46 sono riportati, a confronto, le prove di ibridazione svolte con sonde differenti. La membrana a sinistra è stata ibridata con la ribosonda R3T e, dopo una settimana di esposizione a -70°C , non è stato rilevato alcun segnale di ibridazione nel tratto compreso tra i 20 ed i 30 nt. La stessa membrana, lavata per rimuovere la sonda R3T e re-ibridata con la sonda R5 ha prodotto il risultato mostrato in Fig. 46 B. Nel tratto compreso tra i 20 ed i 30 nt sono visibili i vsRNA (indicati dalle frecce).

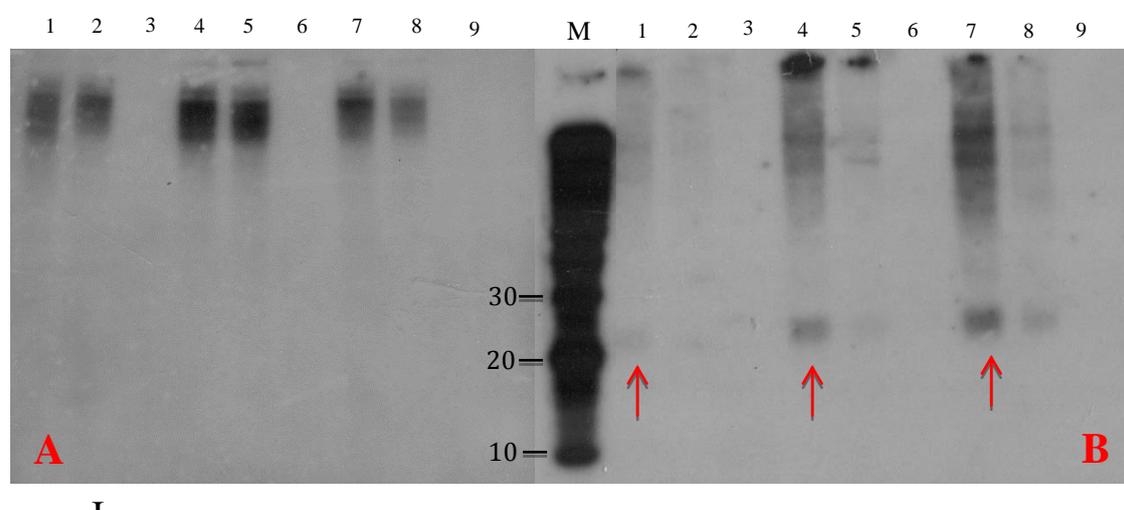


Fig. 46 – Prove di ibridazione per vsRNAs con sonde molecolari prodotte da tratti diversi del genoma. A: membrana ibridata con la sonda R3T. B: membrana lavata con EDTA 1mM+0,1%SDS e re-ibridata con la sonda R5. Le membrane sono state lasciate in esposizione a -70°C per 7 giorni. Le frecce rosse indicano i vsRNA compresi nel tratto tra 20 e 30 nt. Righe da 1 a 3: 0,6 μg di RNA totale estratto da foglia inoculata, non inoculata e sana; righe da 4 a 6: 1,5 μg di RNA totale estratto da foglia inoculata, non inoculata e sana; righe da 7 a 9: 3 μg di RNA totale estratto da foglia inoculata, non inoculata e sana.

E' stato controllato che la quantità di piccoli RNA caricati sul gel era corretta mediante ibridazione contro miRNA159(Fig. 47). Il risultato è stato ottenuto dopo un'esposizione di 24 ore.

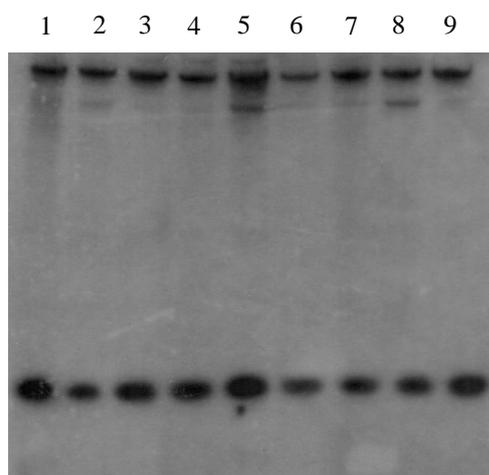


Fig. 47 – Gel di poliaccrilammide per l’analisi di piccoli RNA estratti da *N. benthamiana* infetta. Le corsie sono state caricate con 2,5 μ g di RNA totale ottenuto da *N. benthamiana* sana (da 1 a 3) e *N. benthamiana* infetta (da 4 a 9). La freccia rossa indica il segnale di ibridazione specifico per miRNA159.

In Fig. 48 è riportato il risultato completo ottenuto per RNA estratto da *N. benthamiana* infetta con AeRSV. Sono mostrati sia il controllo di caricamento per l’RNA genomico (rRNA) che per i piccoli RNA (miRNA159). Caricando nel gel una quantità di RNA totale superiore ad 1 μ g è possibile visualizzare i piccoli RNA interferenti virali.

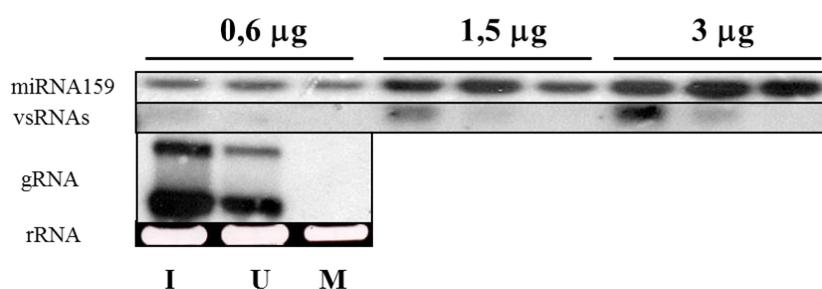


Fig. 48 – Valutazione della quantità di piccoli RNA interferenti in *N. benthamiana* (genotipo selvatico) infetta con AeRSV. Il controllo per l’RNA genomico è l’rRNA 28S. Il controllo per vsRNA è miRNA159.

In Fig. 49 è mostrato il dato relativo alla quantità di vsRNA in *N. benthamiana* RDR6 dopo 7 giorni dall'inoculazione di AeRSV. È stato riscontrato che i vsRNA sono più abbondanti nei tessuti del selvatico rispetto al mutante. Infatti, il segnale d'ibridazione più intenso corrisponde al campione ottenuto da foglia con sintomi locali nel genotipo selvatico. I vsRNA sono presenti in foglie in “recovery” in entrambi i genotipi, mentre non è presente alcuna banda nei campioni sani.

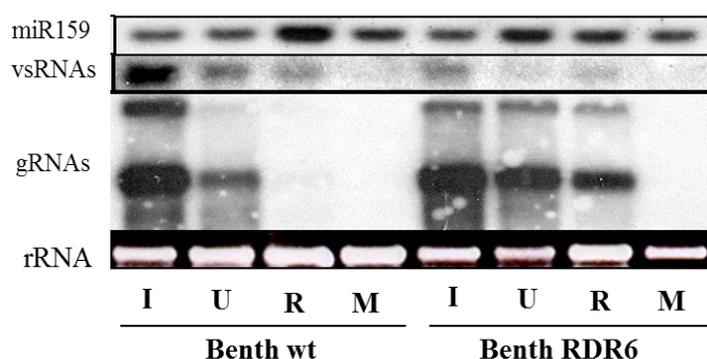


Fig. 49 – Accumulo vsRNAs in *N. benthamiana* RDR6. I campioni di RNA sono stati ottenuti 7 giorni dopo l'inoculazione. I: foglia con sintomi locali; U: foglia con sintomi sistemici; R: foglia in “recovery”; M: foglia inoculata con tampone fosfato

I risultati dell'analisi effettuati per verificare la concentrazione di vsRNAs in *Arabidopsis* sono illustrati in Fig. 50. Il genotipo selvatico e la linea reporter SUC-SUL, manifestano livelli di RNA genomico differenti, ma la quantità di vsRNA è analoga. Nei mutanti il segnale d'ibridazione per vsRNA è differente rispetto al genotipo selvatico: solo nel mutante *dcl4*, i vsRNA sono presenti in quantità elevata e questo si rileva nelle foglie emesse dopo l'inoculazione. Nei mutanti *dcl2* e *SDE1* i vsRNA presentano una ridotta concentrazione. Nel doppio mutante *dcl2-dcl4* non è stato osservato alcun accumulo di piccoli RNA interferenti virali.

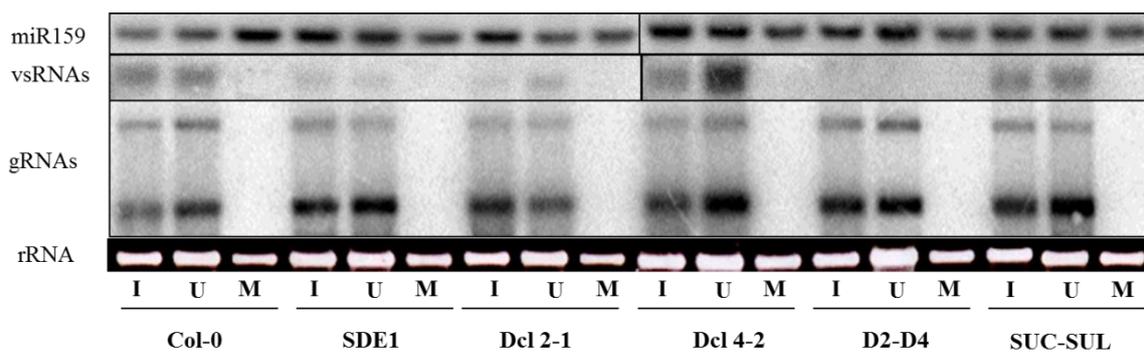


Fig. 50 – Accumulo di vsRNS in mutanti di *A. thaliana* 7 giorni dopo l'inoculazione. I: foglia inoculata con AeRSV; U: foglia emessa successivamente all'inoculo del virus; M: foglia inoculata con tampone fosfato

6.3 RNA genomico e vsRNAs in *N. benthamiana* p19

La quantità di vsRNA è stato monitorata anche in tre linee di *N. benthamiana* transgenica in grado di esprimere il soppressore del silenziamento p19 codificato dal genoma dei *Tombusvirus*.

Le piante inoculate hanno reagito all'inoculazione di AeRSV mostrando sintomi, locali e sistemici, analoghi; solo per la linea 4-10 sono stati riscontrati sintomi sistemici più gravi (Fig. 51 A e B). In tutte le linee transgeniche saggiate, il “recovery” si è manifestato contemporaneamente al genotipo selvatico.

In Fig. 52 è mostrato il risultato dell'analisi Northern di campioni di RNA totale ottenuti dopo 7 giorni dall'inoculazione. Rispetto al genotipo selvatico, nelle linee 4-12 e 4-10 è presente più RNA genomico, mentre la quantità di vsRNA è superiore in tutte le linee transgeniche.

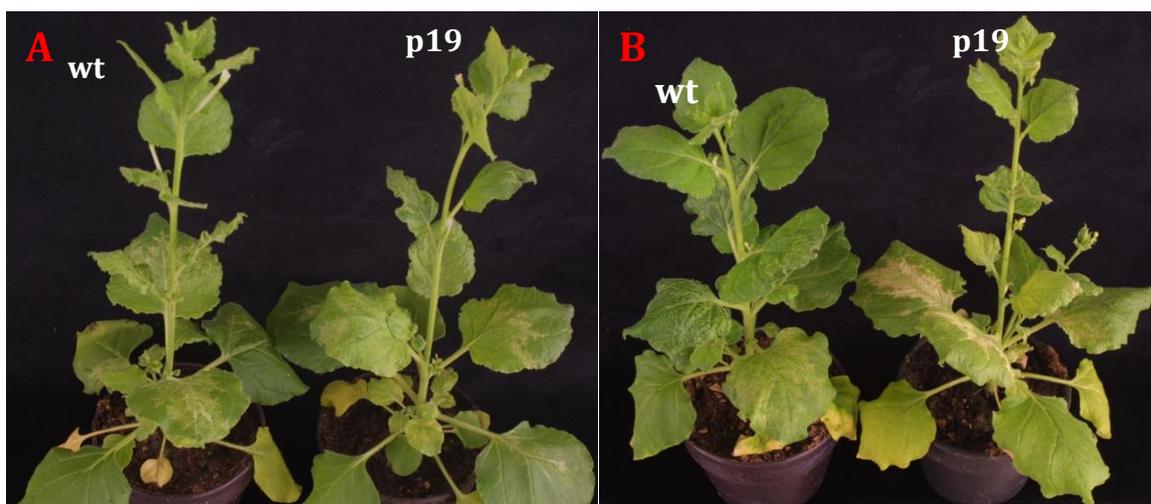


Fig. 51 – Effetto dell'inoculazione meccanica di AeRSV in linee transgeniche, per la proteina p19, di *N. benthamiana*. Confronto tra genotipo selvatico e linea p19 4-12 Confronto tra genotipo selvatico e linea p19 4-10

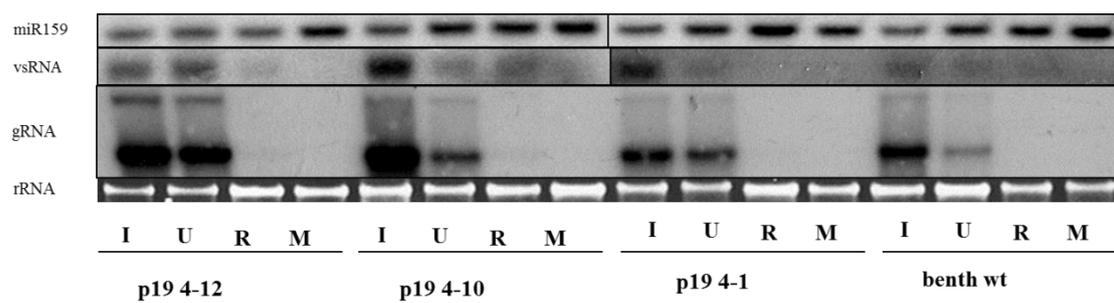


Fig. 52 – Concentrazione di vsRNA in linee transgeniche di *N. benthamiana* 7 giorni dopo l'inoculazione a confronto con il genotipo selvatico. I: foglia con sintomi locali; U: foglia con sintomi sistemici; R: foglia in "recovery"; M: foglia inoculata con tampone fosfato

Discussione 2

Il processo infettivo è stato studiato utilizzando come ospite la *N. benthamiana*, pianta frequentemente impiegata per propagare i nepovirus (Jovel et al., 2007; Seitsonen et al., 2008; Martin et al., 2012). Nelle ricerche effettuate è stato verificato che l'infezione di AeRSV in tali piante, allevate a 22°C, procede attraverso una prima fase che è definita acuta in quanto le foglie, sia inoculate sia non inoculate, manifestano gravi sintomi, e prosegue attraverso una seconda fase definita di risanamento o "*recovery*" in cui si assiste a una graduale scomparsa dei sintomi nelle nuove foglie emergenti fino all'emissione di foglie del tutto asintomatiche dopo circa due settimane.

L'analisi della concentrazione del virus effettuata allevando le piantine di *N. benthamiana* a diverse temperature ha mostrato che la minima concentrazione di acido nucleico virale si registra a 18°C mentre quella massima a 29°C. L'aumento della concentrazione dell'RNA nei tessuti, all'aumentare della temperatura, è un dato in contrasto con quanto dimostrato per il ToRSV da Jovel et al. (2007) in quanto, per tale virus, l'aumento della temperatura di allevamento induce un minor accumulo di RNA virale. Inoltre, negli studi effettuati per evidenziare la correlazione tra concentrazione del virus e gravità dei sintomi è stato accertato che nelle piantine infette allevate a 22°C, la concentrazione di AeRSV aumenta rapidamente fino a raggiungere un picco massimo dopo 8-12 giorni nelle prime foglie emesse dopo l'inoculazione. Queste stesse foglie manifestano gravi sintomi di mosaico che interessano l'intera lamina fogliare. Dopo questa fase, la concentrazione virale regredisce drasticamente e questo coincide con una remissione dei sintomi, nelle foglie dei nuovi palchi, che non solo si presentano meno intensi, ma appaiono localizzati solo nella porzione apicale delle foglie. Una stessa

correlazione tra intensità-distribuzione dei sintomi e concentrazione virale è stata riportata da Santovito (2013) in studi effettuati su AILV. Inoltre come già descritto per alcuni nepovirus quali il TRSV e il ToRSV (Wingard, 1928; Jovel et al., 2007; Siddiqui et al., 2008), anche nel caso dell'AeRSV il virus è risultato essere presente a bassissime concentrazioni nelle foglie asintomatiche. Questo comportamento non è un aspetto comune a tutti i nepovirus in quanto non è stato, ad esempio, evidenziato nel caso del TBRV (Ratcliff et al., 1997).

Le nostre ricerche sembrano, quindi, confermare che in seguito all'infezione di un nepovirus la pianta attiva un meccanismo difensivo generando un segnale sistemico mediante il quale la replicazione e il movimento del virus avvengono con maggiore difficoltà. La presenza del virus nelle foglie asintomatiche è la probabile conseguenza di un equilibrio che si instaura tra il processo replicativo del virus ed il meccanismo degradativo della pianta. Tale equilibrio consentirebbe al patogeno di compiere il proprio ciclo infettivo ed alla pianta di svolgere il suo ciclo vitale (Pfeffer et al., 2002).

I risultati illustrati nel capitolo 3 indicano che l'AeRSV è in grado di replicarsi in piante di *Arabidopsis thaliana* sia nel genotipo selvatico sia nei mutanti utilizzati anche se, in questi ultimi, il tasso di replicazione è maggiore. Il maggior livello di RNA genomico in tali mutanti deriva dall'impossibilità della pianta di inibire o degradare l'RNA virale in quanto il PTGS è meno attivo. I riscontri ottenuti, infatti, indicano che laddove il PTGS è alterato, a uno o più livelli, il virus si replica maggiormente. Tale spiegazione non si adatta alla linea *reporter* SUC-SUL in quanto questo genotipo non presenta mutazioni nel *pathway* del silenziamento. Il maggior accumulo di RNA riscontrato per tale linea potrebbe, invece, derivare da un sovraccarico di AGO1 dovuto alla produzione di piccoli RNA contro il trascritto *sulfur*. Inoltre, anche se le piante inoculate non manifestano

sintomi, è stato appurato, mediante ibridazione molecolare, che l'infezione c'è e si diffonde per via sistemica. In tutti i genotipi, selvatico e mutanti, l'accumulo maggiore di RNA virale avviene nelle foglie, ma il virus è presente anche nelle porzioni distali degli scapi fiorali.

Anche nel caso di AeRSV, come per altri nepovirus, è stato escluso l'intervento di un soppressore del silenziamento nell'interazione virus/pianta ospite (Vigne et al., 2013; Jovel et al., 2007). Infatti, utilizzando la linea “*reporter*” SUC-SUL, che in presenza di un dsRNA ripetuto ed invertito determina il silenziamento del trascritto *sulfur* che si manifesta, a livello fenotipico, in un netto schiarimento delle nervature dell'intera lamina fogliare, è stato accertato che l'inoculazione con l'AeRSV non determina il ripristino della normale pigmentazione, indicando per l'appunto che AeRSV non codifica un soppressore.

I dati ottenuti studiando la replicazione del virus in piante difettive per alcuni geni attivi nel PTGS, fanno supporre che i passaggi della difesa antivirale quali la genesi di vsRNAs, la metilazione di vsRNAs e l'amplificazione del segnale di silenziamento, non siano coinvolti nella risposta all'infezione con AeRSV in *Arabidopsis*. Infatti, nei mutanti per le proteine DICER è stato riscontrato un maggior livello di RNA virale rispetto al genotipo selvatico, livello che raggiunge un picco massimo nel doppio mutante, così come è stata riscontrata una maggiore replicazione di AeRSV nei mutanti SDE1 e HEN1. Tuttavia, è stato dimostrato che nelle infezioni da *Tobacco rattle virus* (TRV) e *Turnip crinkle virus* (TCV) l'accumulo di RNA virale non è influenzato dalla inattivazione di RDR6 (Blevins et al., 2006; Dalmay et al., 2000), nonostante svolga il ruolo primario per l'amplificazione e diffusione del segnale di silenziamento nei tessuti dell'ospite (Burgyan e Havelda, 2011). In generale, è stato ipotizzato che le piante siano in grado di modulare specificamente la risposta

antivirale modificando il normale processo di silenziamento e adattandolo ai diversi fitovirus (Csorba et al., 2009).

Il ruolo svolto da RDR6 nell'amplificazione del segnale di silenziamento è stato ulteriormente analizzato utilizzando il mutante RDR6 di *N. benthamiana*. Siccome i sintomi riscontrati nella pianta mutata sono regrediti con le stesse modalità osservate nel genotipo selvatico, è stato ipotizzato che RDR6 non abbia un ruolo fondamentale nel meccanismo difensivo dell'ospite infetto con AeRSV.

Per confermare tale ipotesi e per chiarire ulteriormente il ruolo del PTGS nell'interazione AeRSV-ospite è stato valutato l'accumulo di vsRNA nelle piante infette utilizzando la sonda R5 che ha fornito i migliori risultati probabilmente poiché l'estremità 5' terminale dell'RNA2 potrebbe possedere delle strutture secondarie che rappresentano il substrato ideale per gli enzimi DICER (Ding e Voinnet, 2007; Molnar et al., 2005).

Nei mutanti di *Arabidopsis* l'accumulo dei vsRNA riscontrato è in funzione dei geni disattivati e non sempre è emersa una chiara correlazione tra il livello di RNA genomico e l'accumulo di vsRNA. Infatti, SUC-SUL e nel genotipo selvatico le quantità di piccoli RNA sono state analoghe, pur presentando, le due linee, quantità di RNA genomico differenti. Il mutante SDE1, invece, pur presentando un maggior accumulo di RNA genomico mostra una quantità di vsRNA inferiore rispetto al selvatico. Allo stesso modo i tre mutanti DICER pur mostrando un maggiore (dcl4 e dcl2-dcl4) o simile (dcl2) accumulo di RNA genomico, rispetto al selvatico, presentano un livello di piccoli RNA inferiore (dcl2 e dcl4) o nullo (doppio mutante). La mancata produzione di vsRNA nel doppio mutante potrebbe indicare che, nell'infezione da AeRSV, dcl3 non è coinvolto nella genesi di piccoli RNA, modalità riscontrata ad esempio in infezioni da TCV, TRV e CMV (Qu et al., 2008; Deleris et al., 2006). I dati relativi ai mutanti DICER indicano, inoltre, che dcl2 è in grado di sopperire alla mancanza di dcl4, ma

a conferma di tale conclusione e per chiarire quale è l'enzima tra i due che esplica un ruolo gerarchico, sono necessari ulteriori esperimenti.

Il risultato ottenuto con il mutante RDR6 di *N. benthamiana* conferma il dato ottenuto con il mutante di *Arabidopsis* SDE1 poiché l'accumulo di vsRNA è inferiore nel mutante rispetto al selvatico nonostante il maggiore accumulo di RNA genomico. Oltre ad aver constatato un diverso accumulo di vsRNA tra *N. benthamiana* RDR6 e genotipo selvatico è stata verificata la presenza di piccoli RNA interferenti nelle foglie in *recovery* segno che il segnale di silenziamento si diffonde efficacemente in tutti i tessuti della pianta (Ratcliff, 1997; Jovel et al., 2007). In generale si può concludere che RDR6 non influisce nel meccanismo difensivo della pianta, come già dimostrato nel caso del ToRSV da Jovel et al. (2007). Tale evidenza sperimentale dovrà essere ulteriormente approfondita per chiarire se il segnale di silenziamento diffonde nella pianta più rapidamente rispetto al patogeno causando l'emissione di foglie asintomatiche. Inoltre, rimane da chiarire se tra le RNA polimerasi della pianta ve ne siano altre in grado di sopperire alla mancanza di RDR6. E' stato, infatti, dimostrato che in infezioni da *Tobamovirus*, *Tobravirus* e *Potexvirus*, anche RDR1 può svolgere un ruolo attivo nella difesa antivirale (Yang et al., 2004; Yu et al., 2003).

Un dato importante è stato ottenuto con piante transgeniche di *N. benthamiana* trasformate con il soppressore p19 dei *Tombusvirus*. La presenza di un forte soppressore del silenziamento, nelle piante infette, favorisce la replicazione di AeRSV ma non influenza né la genesi dei piccoli RNA né la diffusione sistemica del segnale di silenziamento. Le piante transgeniche inoculate con AeRSV hanno mostrato la stessa sintomatologia espressa dal genotipo selvatico ad eccezione della linea 4-10 le cui foglie infette in maniera sistemica hanno manifestato un mosaico più intenso spesso causa di totale clorosi in ampie porzioni della lamina

fogliare. L'analisi svolta confrontando l'accumulo di RNA genomico e di piccoli RNA interferenti ha indicato che in presenza del soppressore p19 il virus si replica maggiormente. Ciò implica anche una maggiore produzione di vsRNA in quanto gli enzimi DICER hanno maggior substrato a disposizione.

I dati ottenuti consentono di ipotizzare che il solo silenziamento genico dell'RNA non sia correlato alla capacità della pianta di emettere foglie asintomatiche, ma che il "recovery", manifestato dalle piante infette con AeRSV, sia dovuto, piuttosto, ad un meccanismo difensivo basato sull'interazione tra diversi "pathway" metabolici. La costante presenza di AeRSV nella pianta infetta indica che il virus è in grado di diffondersi nell'ospite (a livelli molto bassi) nonostante il PTGS sia attivo. Ad esempio, l'RNA del virus potrebbe essere un substrato poco disponibile e poco esposto all'attività della proteina AGO sia durante la replicazione, che avviene nei complessi di replicazione presenti sul sistema di membrane citoplasmatiche, sia durante il movimento intracellulare del virus che avviene in apposite strutture proteiche che avvolgono i virioni (Jovel et al., 2007). Tale ipotesi è però in contrasto con quanto dimostrato da Ratcliff et al (1997) per l'infezione da *Tomato black ring virus*, TBRV (sottogruppo B) in quanto tale virus subisce il meccanismo antivirale della pianta fino alla completa degradazione dell'RNA.

In definitiva è stato osservato che nell'infezione da AeRSV la presenza del virus nei tessuti dell'ospite non è sempre correlata con la presenza-assenza di sintomi né con l'attivazione del silenziamento dell'RNA virale.

Gli esperimenti futuri saranno mirati a comprendere:

- il ruolo del silenziamento genico nell'infezione da AeRSV;

- la possibilità di replicazione del virus nelle foglie in “*recovery*;”
- il ruolo dell’acido salicilico nella risposta antivirale della pianta all’infezione da AeRSV (Jovel et al., 2011).

Conclusioni

Il presente lavoro di tesi ha permesso di caratterizzare un nuovo nepovirus, isolato da una pianta di *Aeonium* individuata a Scafati (SA), il cui nome proposto e sottoposto al Comitato Internazionale per la Tassonomia dei Virus, è Virus della maculatura anulare dell'*Aeonium*, AeRSV. Tale virus è stato trasmesso meccanicamente ad un'ampia gamma di piante test ed è stata verificata la sua potenziale pericolosità verso colture di interesse agrario quali pomodoro, zucchino, melone, anguria, basilico, vigna. Il genoma del virus è stato completamente sequenziato e tali sequenze sono state depositate presso la banca dati "GenBank" nel "*National Center of Biothecnology Center*". Il lavoro di sequenziamento ha consentito di verificare che il virus si presenta con due RNA genomici. Nelle piante di *Aeonium* sintomatiche è stato individuato un terzo acido nucleico. Tale RNA presenta la stessa sequenza dell'RNA2 ma con dimensioni minori a causa di una delezione di 537 nt nella regione codificante la proteina di movimento.

Per valutare l'eventuale diffusione dell'AeRSV sono stati prodotti due diagnostici, un kit ELISA ed una sonda molecolare e l'indagine, svolta tra le provincie di Salerno, Napoli e Caserta ha evidenziato l'assenza del virus nelle piante saggiate comprese piante di *Aeonium* e *Crassulaceae*.

Lo studio di interazione tra AeRSV e la pianta modello *N. benthamiana* ha consentito di approfondire alcuni aspetti del processo infettivo indotto dal virus. Alla temperatura di 22°C il virus induce sintomi ben evidenti sia a livello locale che sistemico; si assiste, poi, ad un graduale "*recovery*" nelle foglie dei palchi superiori fino alla emissione di foglie del tutto asintomatiche dopo 15 giorni. In tali foglie asintomatiche è stata accertata la presenza del virus mediante ibridazione molecolare.

La capacità della pianta di bloccare la replicazione ed il movimento del virus è stata analizzata valutando l'effetto del PTGS scaturito in seguito all'infezione. Sono stati utilizzati alcuni mutanti e linee di *Arabidopsis thaliana*

e *N. benthamiana* per studiare la correlazione tra proteine coinvolte nel “*pathway*” del silenziamento genico dell’RNA e meccanismo di “*recovery*”. Il risultato di tali indagini indica che il “*recovery*” ed il PTGS sono due meccanismi non strettamente correlati. E’ probabile che la capacità, da parte della pianta, di emettere foglie asintomatiche sia dovuta ad altri fattori.

E’ stato verificato che l’AeRSV non codifica un soppressore del silenziamento, ma ulteriori studi sono necessari per approfondire questo aspetto puntando alla produzione di trascritti biologicamente infettivi.

Bibliografia

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, Herr JM Jr, Mau C, Mallory A, Pruss G, Bowman L, Vance VB., 2000. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 290(5489):142-4
- Argos, P., 1988. A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Res.* 33, 145-156.
- Burgyan, J., Havelda, Z., 2011. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science* 16(5):265-72
- Brunt A. A., Crabtree K., Dallwitz M. J., Gibbs A. J., Watson L., 1996. Arabis mosaic nepovirus; Cucumber mosaic cucumovirus; Tobacco ringspot nepovirus; Tomato black ring nepovirus; Tomato ringspot nepovirus // *Viruses of plants. Descriptions and lists from VIDE database.* – Cambridge, UK,.
- Cadman, C.H., 1960. Studies on the relationship between soil-borne viruses of the ringspot type occurring in Britain and Continental Europe *Virology London* 4: 653–664
- Cadman c. H., Dias H. F., Harrison B. D., 1960. Sap - transmissible viruses associated with diseases of grapevine in Europe and North America. *Nature* 187:577-579
- Cadman, C. H., 1963. Biology of Soil-Borne Viruses. *Annual review of Phytopathology* 1: 143-172
- Carrier, K., Xiang, Y., Sanfaçon, H., 2001. Genomic organization of RNA2 of Tomato ringspt virus: processing at a third cleavage site in the N-terminal region of the polyprotein in vitro. *Journal of General Virology* 82, 1785-1790.
- Chapman E.J, Prokhnevsky A.I., Gopinath K., Dolja V.V., Carrington J.C., 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes and Development* , 18(12):1510.
- Childress, AM. and Ramsdell, D.C., 1986a. Lack of evidence for a nematode vector of blueberry leaf mottle virus (BBLMV). *Acta Horticulture* 186: 87
- Chu P. G. W., 1984. Tobacco ringspot nepovirus. In: *Viruses of plants: descriptions and lists from the VIDE Database* (eds Brunt AA, Crabtree K,

- Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L & Zurcher EJ), pp. 1267-1270. CAB International, Wallingford (GB).
- Conti, M., Masenga, V., 1977. Identification and prevalence of pepper viruses in Northwest Italy. *Journal of Phytopathology*. 90:212-222.
 - Csorba, T., Pantaleo, V., Burgyán, J., 2009. RNA silencing: an antiviral mechanism. *Advances in Virus Research* 75, 35–71.
 - Dalmay, T., Rubino, L., Burgyan, J., Kollar, A., Russo, M., 1993. Functional analysis of cymbidium ringspot virus genome. *Virology* 164, 697-704
 - Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O., 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313(5783):68-71
 - Dessens, J.T, Lomonosoff, G.P., 1991. Mutational analysis of the putative catalytic triad of the cowpea mosaic virus 23K protease. *Virology* 184, 738-746.
 - Ding SW, Voinnet O., 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130(3):413-26
 - Dunoyer et al., 2004. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *The Plant Cell* 16(5): 1235–1250.
 - Eamens A., Wang M. B., Smith N. A., Waterhouse P.M., 2008. RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiology* 147(2):456-68
 - Francki, R. I. B., Milne R.G., Hatta, T., 1985b. *Atlas of Plant Viruses*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
 - Fromm F. D., Wingard S. A., Priode C. N., 1927. Ringspot of Tobacco: an infectious disease of unknown cause. *Phytopathology* 17: (5) 321-328.
 - Gaire, F., Schmitt, C., Stussi-Garaud, Pinck, L., Ritzenthaler, C., 1999. Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology* 264, 25-36.
 - Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., 1989. Viral proteins containing NTP-binding sequence pattern. *Nucleic Acids Res.* 17, 8413-8440.
 - Gorbalenya, A. E., Donchenko, A. P., Blinov, V. M., Koonin, E.V., 1989. Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. *FEBS Lett.* 243, 103-114.
 - Guo, H. S., and Ding, S.W., 2002. Aviral protein inhibits the long range signalling activity of the gene silencing signal. *Embo Journal* 21:398–407.

- Hammond S. M., 2005. Dicing and slicing The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS letters*, 579
- Harrison, B. D., Murant, F., 1977. Nematode transmissibility of pseudo-recombinant isolates of tomato black ring virus *Annual applied Biology* 86: 209.
- Hasiów-Jaroszewska, B., Borodynko, N., Figlerowicz M., Pospieszny, H., 2012. Two types of defective RNAs arising from the tomato black ring virus genome. *Archives of Virology* 157, 569-572.
- Heyne B., 1814. In *Transaction of the Linnean Society* 213-15
- Hull, R., 2002. *Matthews' Plant Virology*. Fourth edn. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Hull, R., 2009. *Comparative plant virology* Elsevier Academic Press *Virus plant interaction*
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A., and Carrington, J. C., 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA unction. *Development Cell* 4:205–217.
- Koonin, E.V., Mushegian, A.R., Ryabov, E.V., Dolja, V.V., 1991. Diverse groups of plant RNA and DNA viruses share related movement proteins that may possess chaperone-like activity. *Journal of General Virology* 72, 2895-2903.
- Kozak, M., 2005. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 361, 13-37.
- Kurstak, E., 1981 *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis* Elsevier – North Holland Biomedical Press, New York.
- Laemmli. U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lakatos L., Szittyá G, Silhavy D, Burgyán J., 2004. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO Journal*, 23(4):876-84.
- Le Gall, O., Candresse, T., Dunez, J., 1995. A multiple alignment of the capsid protein sequences of nepoviruses and comoviruses suggests a common structure. *Archives of Virology* 140, 2041-2053.
- Le Gall O., Christian P., Fauquet C.M., King A.M., Knowles N.J., Nakashima N., Stanway G., Gorbalenya A. E., 2008. Picornavirales, a proposed order of

- positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T=3 virion architecture. *Archives of Virology* 153(4):715-27
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting W. M., Dougherty W. G., 1993 Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *Plant Cell* 5(12):1749-1759
 - Loudes, A.M., Ritzenthaler, C., Pinck, M., Serghini, M.A., Pinck, L., 1995. The 119 kDa and 124 kDa polyproteins of arabis mosaic nepovirus (isolate S) are encoded by two distinct RNA2 species. *Journal of General Virology* 76, 899-906.
 - Marck, C., 1988. DNA Strider: a "C" programme for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family computers. *Nucleic Acids Research* 16, 1829-1836
 - Margis, R., Pinck, L., 1992. Effects of site-directed mutagenesis on the presumed catalytic triad and substrate-binding pocket of Grapevine fanleaf nepovirus 24-kDa proteinase. *Virology* 190, 884-888.
 - Margis, R., Ritzenthaler, C., Reinbolt, J., Pinck, M., Pinck, L., 1993. Genome organization of fanleaf nepovirus RNA2 deduced from the 122K polyprotein P2 in vitro cleavage products. *Journal of General Virology* 74, 1919-1926.
 - Margis, R., Viry, M., Pinck, M., Bardonnet, N., Pinck, L., 1994. Differential proteolytic activities of precursor and mature forms of the 24K proteinase of grapevine fanleaf nepovirus. *Virology* 200, 79-86.
 - Martelli, G. P., and Quacquarelli, A., 1983. The present status of tomato and pepper viruses. *Acta Horticulture* 127:39-64.
 - Martelli, G.P., Russo, M., 1984. Use of thin sectioning for the visualization and identification of plant viruses. In: Maramorosch, K., Koprowski, H. (eds.). *Methods in Virology* 8, 143- 224. Academic Press, New York, USA.
 - Mayo, M.A., Fritsch, C., 1994. A possible consensus sequence for VPg of viruses in the family Comoviridae. *FEBS Lett.* 354, 129-130.
 - Murrant, A. F., 1970. In: *Virus Diseases of Small Fruits and Grapevines*, pp. 132-148; ed. N.W. Frazier, University of California, Berkeley, California, U.S.A.
 - Murrant AF, Jones AT, Martelli GP, and Stace-Smith R., 1996. Nepoviruses: General properties, diseases and virus identification. In: Harrison BD and

- Murant AF (eds.) *The Plant Viruses, Vol. 5: Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genomes*, pp. 99–137. New York: Plenum.
- Mushegian, A.R.. 1994. The putative movement domain encoded by nepovirus RNA-2 is conserved in all sequenced nepoviruses. *Archives of Virology* 135, 437-441.
 - Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen R., 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2(4): 279-289
 - Noueiry A.O., Ahlquist P., 2003. Brome mosaic virus RNA replication: revealing the role of the host in RNA virus replication. *Annual Review of Phytopathology*, 41:77-98
 - Page, R.D., 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers, *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357-358.
 - Pantaleo V., 2011. Plant RNA silencing in Viral Defense. In: *RNA Infrastructures and Networks*, Collins L. J., Springer
 - Pinck, L., Fuchs, M., Pinck, M., Ravelonandro, M., Walter, B., 1988. A satellite RNA in grapevine fanleaf virus strain F13. *J. Gen. Virol.* 69, 233-239.
 - Ramsdell, D.C. and Stace-Smith, R., 1979. Blueberry leaf mottle, a new disease of highbush blueberry. *Acta Horticulture.* 95: 37
 - Ritzenthaler, C., Viry, M., Pinck, M., Margis, R., Fuchs, M., Pinck, L., 1991. Complete nucleotide sequence and genetic organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. *Journal of General Virology* 72, 2357-2365.
 - Ritzenthaler, C., Laporte, C., Gaire, F., Dunoyer, P., Schmitt, C., Duval, S., Piéquet, A., Loudes, A.M., Rohfritsch, O., Stussi-Garaud, C., Pfeiffer, P., 2002. Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. *Journal of Virology* 76, 8808- 8819.
 - Rott, M.E., Gilchrist, A., Lee, L., Rochon, D.M., 1995. Nucleotide sequence of tomato ringspot virus RNA 1. *Journal of General Virology* 76, 465-473.
 - Rowely, G. *Piante Grasse* (1978) ed. Zanichelli

- Sanfaçon, H., Wellink, J., Le Gall, O., Karasev, A., van der Vlugt, R., Wetzel, T., 2009. Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. *Archives of Virology*, 154(5):899-9
- Sanfaçon, H., Gorbalenya, A.R., Knowles, N.J., Chen, J.P., 2012. Order Picornavirales. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (eds.). *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Inc., pp. 835-839.
- Siddiqui S.A., Sarmiento C., Kiisma M., Koivumäki S., Lemmetty A., Truve E., Lehto K., 2008. Effects of viral silencing suppressors on tobacco ringspot virus infection in two *Nicotiana* species. *Journal of General Virology* 89:1502-8
- Silhavi D., Molnár A., Lucioli A., Szittyá G., Hornyik C., Tavazza M., Burgyán J., 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO Journal* 21(12):3070-80
- Schmelzer, K.M., 1963. Untersuchungen an Viren der Zier- und Wildgehölze *Phytopath. Z.* 46: 235
- Šneideris, D., Žitikaitė, I., Zižytė, M., Brigaliūnaitė, B., Staniulis, J., 2012. Identification of nepoviruses in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Žemdirbystė=Agriculture*, 99, 2: 173–178
- Stace-Smith, R., 1962. Studies on rubus virus diseases in british columbia: IX Ringspot disease of red raspberry. *Canadian Journal of Botany.* 40: 905
- Stace-Smith, R., 1985. Tobacco ringspot virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* No. 309 (No. 17 revised). Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK.
- Tomitaka, Y., Usugi, T., Yasuda, F., Okayama, H., Tsuda, S., 2011. A novel member of the genus *Nepovirus* isolated from *Cucumis melo* in Japan. *Phytopathology* 101, 316-322.
- Várallyay É, Oláh E, Havelda Z., 2013. Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity. *Nucleic Acid Research* 42(1):599-608

- van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR., 1990. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2(4):291-9
- Vaucheret H., 2006. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes and Development* 20(7):759-71.
- Villalon, B., 1975. Virus disease of bell peppers in south Texas. *Plant Disease Report*. 59:858-862.
- Wang A. e Sanfaçon H., 2000. Proteolytic processing at a novel cleavage site in the N-terminal region of the tomato ringspot nepovirus RNA-1-encoded polyprotein in vitro. *Journal of General Virology*, 81:2771-81
- Wetzel, T., Meunier, L., Jaeger, U., Reustle, G.M., Krczal, G., 2001. Complete nucleotide sequences of the RNAs 2 of German isolates grapevine fanleaf and Arabis mosaic nepoviruses. *Virus Research* 75, 139-145.
- Wetzel, T., Fuchs, M., Bobko, M., Krczal, G., 2002. Size and sequence variability of the Arabis mosaic virus protein 2A. *Arch. Virology* 147, 1643-1653.
- Wetzel, T., Chislom, J., Bassler, A. Sanfaçon, H., 2008. Characterization of proteinase cleavage sites in the N-terminal region of the RNA1- encoded polyprotein from Arabis mosaic virus (subgroup A nepovirus). *Virology* 375, 159-169.
- Wingard S.A., 1928. Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. *Journal of Agricultural Research* 37: 127.
- Zhang, X., Yuan, Y. R., Pei, Y., Lin, S. S., Tuschl, T., Patel, D. J., and Chua, N. H., 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes and Development* 20:3255–3268.
- Zalloua, P.A., Buzayan, J.M., Bruening, G., 1996. Chemical cleavage of 5'-linked protein from tobacco ringspot virus genomic RNAs and characterization of the protein-RNA linkage. *Virology* 219, 1-8.