



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOCHIMICA BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE
XXII CICLO**

TESI DOTTORATO, 2009

***LA MACULATURA CLOROTICO RUGGINOSA DEL
CILIEGIO: STUDI SU FUNGHI E MICOVIRUS COME
POSSIBILI AGENTI EZIOLOGICI.
EVIDENZA DI ENDOFITOSI TRA CILIEGIO E
TAPHRINA WIESNERI***



**Dottoranda: Ida D'Elia
Relatori: Giuseppe Geraci
Rosanna del Gaudio**



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOCHIMICA BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE**

XXII CICLO

***LA MACULATURA CLOROTICO RUGGINOSA DEL
CILIEGIO: STUDI SU FUNGHI E MICOVIRUS COME
POSSIBILI AGENTI EZIOLOGICI.
EVIDENZA DI ENDOFITOSI TRA CILIEGIO E
TAPHRINA WIESNERI***

**Dottoranda:
Ida D'Elia**

**Relatori:
Prof. Giuseppe Geraci
Prof.ssa Rosanna del Gaudio**

**Coordinatore:
Prof. Giuseppe D'Alessio**

Anno accademico 2006-2009

*Ai miei genitori,
ad Alino,
a me*

Per aspera ad astra

Ringraziamenti

Giunta ormai alla fine di questo meraviglioso percorso, che mi sembra d'aver cominciato solo ieri e che si è snodato attraverso un cammino laborioso in cui non sono mancate le difficoltà così come le soddisfazioni, voglio ringraziare le persone che hanno contribuito a portare a compimento questa esperienza.

Desidero innanzitutto ringraziare il professore Giuseppe Geraci, mio mentore, esempio di quanto in alto ci si possa spingere con l'impegno e la capacità, modello cui aspirare, magnifica guida scientifica e di vita, grande interprete di questo lavoro, che mi ha costantemente seguita e incoraggiata con gioia fino alla fine di questo percorso, che ha saputo trasmettermi metodo e abnegazione, spingendomi verso l'eccellenza, e trovando sempre il modo migliore di farlo. Voglio ringraziarlo, inoltre, per i preziosi e acuti consigli, per la continua disponibilità, la pazienza, gli insegnamenti sia teorici che pratici, e anche per i rimproveri fattimi, tutto ciò ha contribuito in maniera determinante alla mia crescita non solo scientifica e professionale ma anche umana.

La professoressa Rosanna del Gaudio "madrina" della mia vita sperimentale, che ha seguito il mio percorso formativo fin dai "primi passi", in quanto relatore anche della mia tesi di laurea, fulgido esempio di ricercatore in grado di inculcare passione e devozione alla ricerca scientifica, che ha saputo, attraverso la sua estrema dolcezza e disponibilità seguirmi in questo cammino con i suoi preziosissimi aiuti ed insegnamenti, ma soprattutto con il sostegno offertomi anche nell'affrontare le avversità della vita quotidiana.

Inoltre vorrei ringraziare la prof.ssa Rossella Di Giaimo, con la quale è nata una collaborazione ad un progetto di ricerca non presentato in questa tesi, che ha saputo con la sua gioia, il suo ottimismo, e i suoi utili suggerimenti, alleviare le fatiche delle lunghe e solitarie ore di laboratorio che questo lavoro ha richiesto. Il prof. Francesco Aniello per i suoi suggerimenti sempre opportuni, per la disponibilità e l'ospitalità nel suo laboratorio accordatami per alcuni esperimenti.

Un ringraziamento va ancora al coordinatore Giuseppe D'Alessio per aver organizzato dei corsi estremamente validi e al prof. Vincenzo De Simone controrelatore della mia tesi, al prof. Antonio Ragazzino e la prof.ssa Daniela Alioto.

Inoltre, vorrei esprimere la mia più sincera gratitudine a tutti i membri della sezione di genetica e biologia molecolare del dipartimento delle Scienze Biologiche, in particolare ai professori e ai ricercatori sempre disponibili al dialogo e a confrontarsi con le idee altrui, ai dottorandi e agli studenti che hanno rallegrato le lunghe ore di laboratorio condividendo sia gioie che dolori e che mi hanno aiutato e sostenuto. In particolare vorrei ringraziare Simona Capuozzo solido sostegno nei momenti più difficili, ma anche compagna di avventure nei momenti più piacevoli, Carmen Cantone per la simpatia e l'amicizia offertami, e in ordine sparso: Raffaele Carrieri, Leopoldo Staiano, Roberto Limongello, Samantha Trocchia, Agostino Strangi, Manuela e Roberta, la sig.ra Sandra Parrella, segretaria del dottorato, sempre gentile e paziente, tutti i colleghi del dottorato e tutte quelle persone che hanno incrociato il mio cammino.

Infine, ho desiderio di ringraziare con affetto i miei genitori, Luigi e Rosa per essermi stati vicino in ogni momento sopportando i disagi della mia vita sregolata e per aver creduto in me, mia sorella Luisa e il fidanzato Amato, nonna Luisa e tutti i miei amici ed amiche.

In modo molto speciale voglio ringraziare il mio fidanzato Alino, che più di ogni altro ha vissuto con me l'impegno e i sacrifici che questo lavoro ha richiesto, sostenendomi e "sopportandomi" con amore e pazienza, asciugandomi lacrime e strappandomi sorrisi, in lui ho trovato comprensione ed aiuto perenne, non avrei potuto trovare compagno migliore...

Sommario

Il lavoro di questa tesi è parte di un progetto di ricerca finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole per lo studio della recente malattia delle macchie clorotico-rugginose del ciliegio (CCRS). Una patologia che si propaga rapidamente tra i ciliegi di uno stesso frutteto con effetti letali. Studi precedenti indicavano il coinvolgimento nella patologia sia di un fungo sia di micovirus.

I risultati della mia tesi mostrano che il micovirus del genere *Chrysovirus* si rivela geneticamente solo nelle aree sintomatiche della foglia e non nelle aree asintomatiche circostanti né nelle nervature. Il virus si osserva ad alta concentrazione già in aree con sintomi molto precoci sia come genoma sia come proteina capsidica identificata per analisi di immunorivelazione mediante anticorpi prodotti con un costrutto genetico di antigeni da me progettato. Si è così accertato che la presenza del micovirus è un evento molto precoce e che l'effetto letale non è probabilmente dovuto a propagazione sistemica. Gli studi per identificare un fungo ospite del micovirus, responsabile della CCRS, non hanno portato a risultati conclusivi. Inaspettatamente però le indagini hanno rivelato, per analisi di rDNA e dei geni EF1- α e RBP1, la costante presenza del noto patogeno del ciliegio *Taphrina wiesneri* in tutti i campioni di foglie e di gemme analizzati, prelevati da ciliegi di varie aree della Campania e della Toscana, in ambienti diversi, seguiti in varie stagioni per 3 anni. Il fungo *Taphrina* risulta molto numeroso nelle gemme di ciliegio e perfino nelle strutture embrionali di teche polliniche. L'ibridazione *in situ* su sezioni di gemme di vari ciliegi e le colorazioni specifiche rivelano strutture fungine in posizioni non casuali. La numerosa ed organizzata presenza del fungo patogeno nelle strutture embrionali delle gemme e l'assenza di malattia, suggeriscono una forma di endofitosi, la prima riportata in alberi da frutto. Su una possibile endofitosi tra *T. wiesneri* e il ciliegio è in via di pubblicazione un lavoro accettato dal J. of Plant Pathology.

In parallelo, negli ultimi due anni di dottorato, ho lavorato anche ad un progetto riguardante la eterogeneità genetica nei tessuti di un tumore primario del colon e di un tumore recidivo del colon-retto, di due pazienti. Di questa parte del lavoro non presento relazione. I risultati sono oggetto di un manoscritto (G. Geraci, I. D'Elia, R. del Gaudio and R. Di Giamo) inviato per la pubblicazione a PlosOne, che ha richiesto ulteriori dati che sono attualmente in elaborazione.

Summary

My PhD work is part of a research project, supported by the Italian Ministero delle Politiche Agricole, aimed at the study of the recently appeared cherry chlorotic rusty spot disease (CCRS) that spreads through cherry orchards also with lethal effects. Previous studies suggested the involvement of a fungus and of mycoviruses in the aetiology of this disease. The results of my work show that the mycovirus of the genus *Chrysovirus* is genetically detected only in the symptomatic areas of the affected leaves and not in the nearby areas, in the leaf stalk and in vascular tissues. The virus is revealed at high concentration in areas showing initial symptoms both as genome and as coat protein. This latter immunodetected using antibodies produced with an original antigenic genetic construct designed by me. These data show that mycovirus replication is a very early step in the infection and that lethal effects do not appear to depend on a systemic propagation.

Studies to identify a fungus, possible host of mycoviruses, responsible for CCRS, provided no conclusive results. Unexpectedly, however, rDNA and EF1- α and RBP1 analyses on CCRS affected and healthy cherry trees revealed the constant presence of the well known pathogen of cherries *Taphrina wiesneri* in all samples of leaves and buds of trees of various areas of Campania and Tuscany Italian regions, monitored in a period of 3 years. *Taphrina* is present at a high number even in embryonic structures of micro and mega-sporophylls inside closed buds. *In situ* hybridization studies on sections of buds collected from various cherry trees reveal fungal structures in non random positions. The presence of the pathogen in quasi-organized structures inside embryonic bud structures and the absence of any symptom of disease suggest that *T. wiesneri* may have established an endophyte relation with the cherry tree. This seems to be the first case of fungal endophytism in a fruit tree but endophytism is already reported to occur in some graminaceous plants. A manuscript about the hypothesis of a possible endophytism between *T.wiesneri* and cherry tree has been accepted for publication by the J. of Plant Pathology.

In addition to the work on CCRS, I participated in a study on the genetic heterogeneity in the tissues of a colorectal carcinoma relapse and of a primary colosigmoid carcinoma of two patients. The results of this work, not reported here, are in a manuscript (G. Geraci, I. D'Elia, R. del Gaudio and R. Di Giamo) submitted to PlosOne, that has requested supplementary data now in progress.

Indice

Capitolo 1 Introduzione

| | Pag. | |
|-------|------------------------------------------------------------------------|---|
| 1.1 | La malattia delle macchie clorotico rugginose del ciliegio (CCRS) | 1 |
| 1.2 | Caratteristiche dei micovirus | 5 |
| 1.2.1 | I dsRNA e cscRNA di <i>Chrysovirus</i> considerati associati alla CCRS | 7 |
| 1.3 | Obiettivo del lavoro | 9 |

Capitolo 2 Materiali e Metodi

| | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 | Identificazione genetica del micovirus <i>Chrysovirus</i> | 10 |
| 2.1.1 | Estrazione di acidi nucleici totali (metodo silica-capture) | 10 |
| 2.1.2 | Rivelazione dei componenti genomici del micovirus mediante RT-PCR | 11 |
| 2.1.3 | Clonaggio dei frammenti amplificati per PCR | 12 |
| 2.1.4 | Determinazione della sequenza nucleotidica e analisi delle sequenze ottenute | 13 |
| 2.2 | Identificazione del micovirus <i>Chrysovirus</i> mediante rivelazione di epitopi virali | 13 |
| 2.2.1 | Progettazione del costrutto genico da utilizzare come antigene | 13 |
| 2.2.2 | Strategia 1: Espressione del costrutto genico in procarioti | 16 |
| 2.2.3 | Purificazione della proteina MBP-ricombinante | 16 |
| 2.2.4 | Analisi mediante SDS-PAGE | 17 |
| 2.2.5 | Produzione degli anticorpi policlonali in coniglio | 18 |
| 2.2.6 | Strategia 2: Progettazione del costrutto genico per l'espressione in eucarioti | 19 |
| 2.2.7 | Produzioni di anticorpi in coniglio mediante immunizzazione con DNA | 19 |
| 2.2.8 | Identificazione degli anticorpi mediante il Saggio di Outcherlony | 20 |
| 2.2.9 | Purificazione degli anticorpi policlonali dal siero dei conigli immunizzati | 20 |
| 2.2.10 | Estrazione di proteine da foglie di <i>Prunus avium</i> | 21 |
| 2.2.11 | Analisi mediante Western blot | 22 |
| 2.3 | Identificazione mediante analisi molecolari di un fungo, putativo ospite del <i>Chrysovirus</i> , potenzialmente coinvolto nella malattia | 23 |
| 2.3.1 | Estrazione di DNA genomico da tessuto vegetale | 24 |
| 2.3.2 | Amplificazione mediante PCR dei geni ribosomali | 25 |
| 2.4 | Identificazione molecolare del fungo <i>Taphrina</i> | 26 |
| 2.4.1 | Progettazione di primers specifici per il fungo del genere <i>Taphrina</i> | 26 |
| 2.4.2 | Copy number di <i>T. wiesneri</i> in <i>P. avium</i> | 27 |
| 2.4.3 | Estrazione di RNA da tessuti vegetali di <i>Prunus avium</i> e studi di RT-PCR | 27 |
| 2.5 | Localizzazione del fungo <i>Taphrina</i> mediante immunoistochimica | 28 |
| 2.5.1 | Inclusioni di gemme di ciliegio dolce in paraffina | 28 |
| 2.5.2 | Colorazione con Safranina e verde luce delle sezioni di gemme di ciliegio | 29 |
| 2.5.3 | Produzione per PCR della sonda a DNA marcata con digossigenina | 29 |
| 2.5.4 | Ibridazione "in situ" | 29 |

| | | |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5.5 | Colorazioni con coloranti specifici per funghi: Trypan blu, Sudan III e Blu di Lattofenolo | 31 |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|

Capitolo 3 Risultati e discussione

| | | |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 | Identificazione dei micovirus mediante rivelazione delle sue unità genetiche | 32 |
| 3.2 | Identificazione del micovirus <i>Chrysovirus</i> mediante rivelazione della putativa proteina capsidica | 35 |
| 3.2.1 | Progettazione del costrutto genico | 35 |
| 3.2.2 | Strategia 1: Espressione del costrutto genico in procarioti e purificazione dell'MBP-ricombinante | 36 |
| 3.2.3 | Produzione degli anticorpi policlonali in coniglio | 37 |
| 3.2.4 | Strategia 2: Progettazione del costrutto genico per l'espressione in eucarioti e produzioni di anticorpi in coniglio | 38 |
| 3.2.5 | Rivelazione della proteina capsidica del <i>Chrysovirus</i> con gli anticorpi prodotti | 39 |
| 3.3 | Identificazione di un fungo, putativo ospite del <i>Chrysovirus</i> | 40 |
| 3.3.1 | Identificazione della specie di <i>Taphrina</i> | 45 |
| 3.3.2 | Numerosità della presenza di <i>Taphrina</i> in gemme di ciliegio | 49 |
| 3.3.3 | Localizzazione del fungo <i>Taphrina</i> mediante immunostochimica | 50 |
| 3.3.4 | Studi di RT-PCR da <i>Prunus avium</i> per la rivelazione di trascritti di <i>T.wiesneri</i> | 52 |
| | | 54 |

Capitolo 4 Conclusioni

| | |
|----------------------------|----|
| <u>Bibliografia</u> | 57 |
|----------------------------|----|

Indice delle figure e delle tabelle

Capitolo 1 Introduzione

| | Pag. | |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| Figura 1 | Fotografie di foglie e frutti di ciliegio affetti da CCRS | 2 |
| Figura 2 | Fotografia al MO in fluorescenza e al TEM di una sezione sottile e ultrasottile di una foglia sintomatica di ciliegio | 4 |
| Figura 3 | I dsRNA del <i>Chrysovirus</i> e del <i>Partitivirus</i> associati alla CCRS | 8 |

Capitolo 2 Materiali e Metodi

| | | |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4 | Schema esemplificativo del profilo di reazione di PCR | 11 |
| Tabella 1 | Caratteristiche dei primers utilizzati per l'amplificazione dei 4 dsRNA del micovirus <i>Chrysovirus</i> | 27 |
| Figura 5 | Schema della sequenza AA del costrutto genico (antigene) per l'espressione in eterologo per la produzione di anticorpi | 14 |
| Figura 6 | Sequenza nucleotidica del costrutto genico (antigene) | 14 |
| Figura 7 | Rappresentazione schematica dell'ibridazione dei filamenti forward e reverse per la realizzazione del costrutto genico a doppio filamento | 15 |
| Figura 8 | Profilo di reazione utilizzato per la sintesi del costrutto genico (antigene) | 15 |
| Figura 9 | Struttura del cluster dei geni degli rRNA di vegetali e di funghi con la posizione dei primers utilizzati | 25 |
| Tabella 2 | Caratteristiche dei primers utilizzati per l'amplificazione dell'rDNA | 26 |
| Tabella 3 | Caratteristiche dei primers utilizzati per la tipizzazione di <i>Taphrina</i> | 27 |
| Figura 10 | Foglia di ciliegio con i sintomi della CCRS | 32 |

Capitolo 3 Risultati e discussione

| | | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 11 | AGE/EBS dei prodotti di RT-PCR dei 4 componenti genomici del <i>Chrysovirus</i> | 33 |
| Figura 12 | Risultati che dimostrano la presenza del dsRNA2 negli acidi nucleici totali estratti da foglie sintomatiche | 34 |
| Figura 13: | SDS-PAGE della cinetica di espressione dell'MBP-ricombinante in <i>E. coli</i> . | 36 |
| Figura 14 | SDS-PAGE dei passi di purificazione dell'MBP-Ricombinante | 37 |
| Figura 15 | Saggio di Outcherlony | 38 |
| Figura 16 | SDS-PAGE di estratti proteici di foglie di <i>P. avium</i> e Western-blot della proteina capsidica | 40 |
| Figura 17 | AGE/EBS dell'rDNA di <i>P. avium</i> e di funghi amplificato mediante PCR da DNA di gemme | 42 |
| Figura 18 | AGE/EBS del 18S rDNA specifico del genere <i>Taphrina</i> amplificato mediante PCR dal DNA di gemme | 43 |
| Figura 19 | Foto digitale di gemme di ciliegio dissezionate e non utilizzate per le | |

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| | analisi di PCR | 44 |
| Figura 20 | AGE/EBS del 18S rDNA specifico del genere <i>Taphrina</i> amplificato dal DNA estratto dalle strutture embrionali di una gemma | 45 |
| Figura 21 | AGE/EBS delle ITS dell'rDNA di <i>Taphrina</i> amplificato mediante PCR dal DNA di gemme | 45 |
| Figura 22 | Risultato BLASTn con la sequenza delle ITS dell'rDNA ottenuta | 46 |
| Figura 23 | AGE/EBS dei geni di EF1- α e di RBP1 di <i>Taphrina</i> amplificati mediante PCR dal DNA di gemme | 47 |
| Figura 24 | Risultato BLASTn con la sequenza del RBP1 ottenuta. | 47 |
| Figura 25 | Albero filogenetico senza radice delle sequenze ITS determinate in questa tesi. | 48 |
| Figura 26 | AGE/EBS per la determinazione del numero di copie di genoma di <i>Taphrina</i> rispetto a quello del ciliegio | 49 |
| Figura27 | Fotografie di sezioni di gemma di ciliegio analizzate per immunostochimica e colorazione per la rivelazione di <i>Taphrina</i> | 51 |
| Figura 28 | AGE/EBS dell'rRNA estratto da foglie e gemme di ciliegio e dell'RT-PCR di EF1- α di <i>T. wiesneri</i> | 52 |
| Figura 29 | Rappresentazione schematica della struttura del gene (parziale) EF1- α di <i>T. wiesneri</i> | 53 |

AGE/EBS: Agarose Gel Electrophoresis with Ethidium Bromide Staining

Introduzione

1.1 La malattia delle macchie clorotico rugginose del ciliegio (CCRS)

La malattia delle macchie clorotiche rugginose del ciliegio (*Cherry Chlorotic Rusty Spot, CCRS*) è una fitopatologia di recente comparsa ad eziologia complessa osservata per la prima volta nei ciliegi campani della provincia di Ariano Irpino nel 1996 (Di Serio et al., 1996). Tale patologia è simile a quella dell'Amasya (*Amasya cherry disease, ACD*) manifestatasi in Turchia nel 1970 (Blodgett et. al., 1970; Citir, 1987), colpisce sia foglie che frutti e si propaga rapidamente tra i ciliegi di uno stesso frutteto con effetti letali. I sintomi si manifestano sulle foglie come macchie circolari giallastre, dal diametro di 1-2 cm, che diventano rossastre e necrotiche. Col tempo tali macule possono confluire, invadendo l'intera superficie delle foglie, che cadono con conseguente deperimento vegetativo delle piante. I frutti risultano deformati ed appiattiti. La maggior parte di essi (80%) non giunge a maturazione in quanto cascola precocemente, mentre quelli che maturano presentano alterazioni cromatiche dell'esocarpo caratterizzate dalla comparsa di linee ed anelli irregolari di colore rossastro (Fig.1).

Dalla semplice comparazione sintomatologica con altre malattie descritte per le drupacee inizialmente si pensò che l'agente eziologico della CCRS andasse ricercato in entità infettive di natura virale o simil-virale mai descritte per questa drupacea. In base a tale ipotesi furono effettuate sia prove di trasmissione per innesto su franchi di ciliegio e su pesco GF-305, usato come indicatore per la maggior parte dei virus delle drupacee, sia test

sierologici (DAS-ELISA) diretti contro virus responsabili di malattie simili alla CCRS.

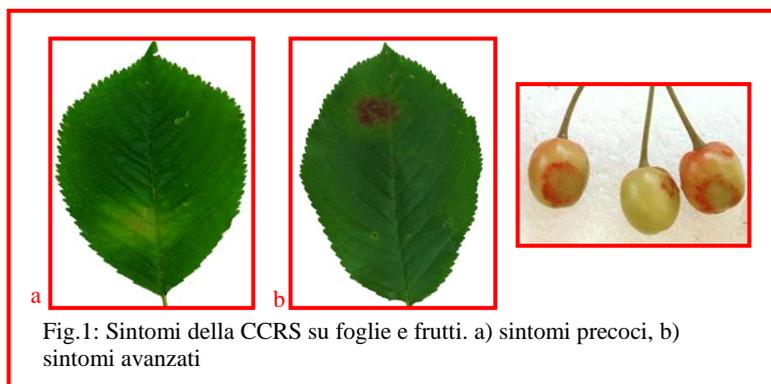
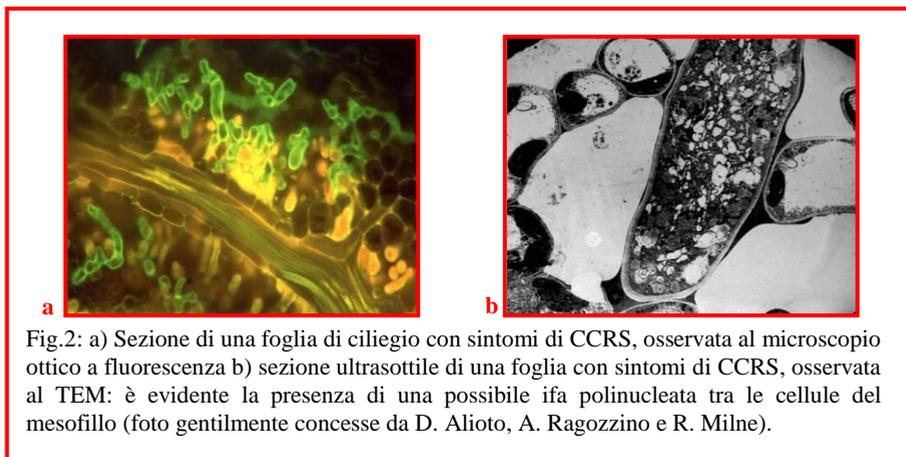


Fig.1: Sintomi della CCRS su foglie e frutti. a) sintomi precoci, b) sintomi avanzati

Poiché sia test sierologici (Di Serio et al., 1996) sia i tentativi di trasmissione per innesto diedero esiti negativi, furono effettuate delle indagini basate sull'analisi degli acidi nucleici e, in particolare, alla individuazione di RNA a doppio filamento (double-stranded RNA, dsRNA) e di RNA circolari (small-circular RNA, scRNA) di tipo viroide nei tessuti sintomatici. Infatti considerando che le piante sane, normalmente, non contengono RNA a doppio filamento ad elevato peso molecolare né RNA di tipo circolare l'isolamento e l'analisi di dsRNA e di scRNA rappresenta un metodo abbastanza indicativo per verificare se una pianta (o un fungo) è infetta da un fitovirus con genoma a RNA e/o da un viroide, o se presenta degli RNA di tipo satellitare. Questi metodi sono validi soprattutto quando quelli tradizionali non sono adeguati a causa della bassissima concentrazione delle particelle virali presenti nei tessuti infetti e/o alla loro scarsa trasmissibilità mediante inoculazione meccanica. La maggioranza dei virus vegetali è costituita da un genoma a RNA a singolo filamento (single-

stranded RNA, ssRNA) che durante la replicazione dà origine a forme replicative intermedie a doppio filamento. Queste indagini rivelarono il costante ritrovamento di 12 dsRNA, di cui 10 definiti large dsRNA (L-dsRNA) e due, per le dimensioni ridotte, small dsRNA, (S-dsRNA), e di due cscRNA (cherry small-circular RNA) nei tessuti di foglie e frutti sintomatici di piante malate (Di Serio et al., 1996) ma non in tessuti di piante di ciliegio asintomatiche. Il costante ritrovamento di tali RNA sembrava supportare l'ipotesi della natura virale o viroide della CCRS, sebbene numerose evidenze diagnostiche la escludessero, come l'impossibilità di ottenere trasmissione meccanica di un eventuale virus e/o viroide (Alioto et al., 2003), l'impossibilità di trasmissione per innesto, l'assenza di sintomi alla ripresa vegetativa in piante di ciliegio portate in località differenti dall'origine.

Scartata l'ipotesi della natura virale e/o viroide della malattia, furono eseguite osservazioni su foglie e su frutti malati, in fasi fenologiche diverse, sia con microscopio ottico a fluorescenza che con microscopi elettronici a trasmissione (TEM) e a scansione (SEM). Queste osservazioni misero in risalto la presenza, nelle sole aree sintomatiche, di strutture plurinucleate, filamentose e tendenzialmente tortuose che potevano somigliare a ife di un fungo, e che crescevano tra l'epidermide inferiore e le cellule a palizzata e spugnose del mesofillo (Alioto et al., 2003) (Fig.2). Tali strutture erano assenti nelle regioni asintomatiche e nei tessuti vascolari delle stesse foglie, e in campioni prelevati da piante apparentemente sane. L'individuazione di strutture fungine nei tessuti di foglie malate lasciò supporre che l'agente eziologico della CCRS fosse un fungo, anche se andava comunque giustificata la presenza dei dsRNA e dei cscRNA nei tessuti sintomatici.



Poiché il quadro sintomatologico non era minimamente comparabile con nessuno di quelli attribuibili ai noti patogeni fungini del ciliegio ad esempio *Taphrina wiesneri* o *cerasi*, *Cercospora circumscissa*, *Stigmina carpophila*, *Coccomices hjemalis*) (Goidanich, Manuale di Patologia Vegetale, 1964) furono iniziati una serie di esperimenti volti all'isolamento del probabile fungo patogeno, su substrati nutritivi classici, che però non diedero esiti positivi. Solo in alcuni casi erano state osservate colonie di *Alternaria alternata* o *Cladosporium* spp che non erano considerate possibili come agenti della malattia. Tuttavia sulla base dei risultati ottenuti dalle osservazioni al microscopio e il costante ritrovamento di 12 dsRNA e di 2 cscRNA nei tessuti di foglie e frutti sintomatici di piante malate fu formulata l'ipotesi che i virus fossero ospitati da un fungo agente eziologico della CCRS. I dsRNA potrebbero essere componenti di uno o più micovirus con genoma ad RNA a doppia elica forse multipartito (Ghabrial, 1998; Zhang et al., 1994), o di vari micovirus aventi come genoma un dsRNA monopartito, e che i cscRNA fossero i satelliti del micovirus stesso. Infatti

la presenza di micovirus è comune a tutti i tipi di funghi (Pearson MN et al., 2009), come segnalato, ad esempio, in *Cryphonectria parasitica*, che infetta il castagno (Choi e Nuss, 1992; Hillman et. al., 2004), in *Ophiostoma novo-ulmi*, che infetta l'olmo olandese (Hong et al., 1998), in *Helminthosporium victoriae*, che infetta l'avena (Ghabrial et al., 2002).

Poiché i tentativi di isolare il probabile fungo patogeno su substrati nutritivi classici non avevano dato esiti positivi si provò ad individuare funghi potenzialmente collegabili alla malattia mediante indagini bio-molecolari.

1.2 Caratteristiche dei micovirus

I micovirus sono i virus che infettano i funghi. Sebbene le prime informazioni dell'esistenza di micovirus risalgono a più di 40 anni fa (Hollings, 1962), la loro conoscenza e comprensione è ancora a uno stato iniziale. Nonostante la loro tardiva scoperta, sono stati trovati in tutti i maggiori *taxa* di funghi suggerendo una coevoluzione. In genere i micovirus sono associati ad infezioni latenti dei loro ospiti e attualmente non si conosce un vettore naturale implicato nella loro diffusione. Non hanno una fase extracellulare nel loro ciclo vitale e quindi si trasmettono intracellularmente durante la divisione cellulare, la sporogenesi e la fusione cellulare (Anagnostakis, 1982). I micovirus sono descritti come virus non infettivi, endogeni ed ereditabili (Ghabrial S.A. 1998). Tale terminologia è usata a causa della loro incapacità di infettare l'ospite come particelle libere mentre hanno l'abilità di integrare nel DNA dell'ospite una copia del loro acido nucleico. Poiché si trasmettono intracellularmente, la gamma di ospiti naturali dei micovirus è limitata a singoli individui o a gruppi strettamente correlati con compatibilità vegetativa. Infezioni miste con due o più virus

indipendenti sono comuni, probabilmente come conseguenza della modalità attraverso cui i micovirus sono trasmessi in natura. Apparentemente non vi è interazione strutturale tra questi virus poiché incapsulazioni eterologhe non sono riportate in infezioni miste. L'accumulo di dsRNA difettivi e/o satelliti è una caratteristica frequente delle infezioni di micovirus e la complessità del pattern elettroforetico che deriva dagli acidi nucleici associati alle infezioni, spesso determina confusione nel determinare la natura e l'organizzazione del genoma. In questi casi è necessaria la caratterizzazione molecolare del micovirus per vedere se il suo genoma è in segmenti o no, se si tratta di dsRNA difettivi e/o satelliti o semplicemente si tratta di infezioni multiple (Ghabrial S.A. 1998). Di norma le infezioni dovute a micovirus sono sia latenti che persistenti; in assenza di infettività l'ospite trae beneficio dalla latenza per sopravvivere mentre dalla persistenza trae beneficio il virus (modalità di trasmissione extracellulare) in accordo con l'ipotesi che i micovirus si siano coevoluti con i loro ospiti conferendo vantaggi selettivi. Ciò nonostante i micovirus persistono e si diffondono anche senza apportare vantaggi selettivi a causa dei loro efficienti mezzi di trasmissione intracellulare. Sebbene un gran numero di virus che infettano funghi fitopatogeni siano ritenuti avirulenti, sta diventando sempre più chiaro che gli effetti sul fenotipo dell'ospite, attribuibili alla presenza di micovirus o di molecole di dsRNA, possono essere molto diversi, attivando o inibendo la capacità patogena del fungo. Pertanto la capacità che hanno alcuni micovirus di aumentare o attenuare la virulenza nei funghi fitopatogeni fornisce eccellenti opportunità per studi rivolti alla ricerca di nuove misure di controllo biologico. Il fenotipo ipovirulento nel fungo *Cryphonectria parasitica* rappresenta un esempio ipovirulenza

potenzialmente utile per il controllo biologico della malattia del cancro della corteccia del castagno indotta dalla forma ipervirulenta del fungo non infetto dal virus *Cryphonectria hypovirus-1* (Anagnostakis et al. 1998). Interessante è il caso del virus che rende il fungo *Curvularia protuberata* capace di trasmettere alla pianta *Dichanthelium lanuginosum*, la capacità di crescere ad alte temperature del suolo nel parco Nazionale Yellowstone (Màrquez et al., 2007).

Tipicamente i micovirus sono particelle isometriche di 25-50 nm di diametro ed hanno un genoma, in alcuni casi multipartito, che può essere costituito da diversi tipi di acidi nucleici, ma la maggior parte ha come genoma un RNA a doppio filamento. I micovirus con genoma a dsRNA sono classificati in cinque famiglie: *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Chrysoviridae*, *Reoviridae* e *Hypoviridae* (Sasaki et al., 2006). La distinzione è basata sul numero dei segmenti genomici, sulla struttura del capsido e delle sequenze nucleotidiche.

1.2.1 I dsRNA e i cscRNA di Chrysovirus considerati associati alla CCRS

I dsRNA e i cscRNA sono stati isolati solo dalle foglie sintomatiche (40-60g) sia di piante affette da CCRS che di piante colpite da ACD (Di Serio et al., 1997, 1998). I risultati delle analisi di sequenza hanno rivelato la presenza di componenti di più micovirus aventi un genoma multipartito ad RNA a doppia elica. Infatti 4 di questi sono risultati componenti genomici di una nuova specie di *Chrysovirus* (Covelli et al., 2004), due di una nuova specie di *Partitivirus* (Coutts et al., 2004) (Fig.3) e gli altri 4 di una nuova specie di *Totivirus* sulla base delle omologie di sequenza (Kozlakidis et al., 2006).

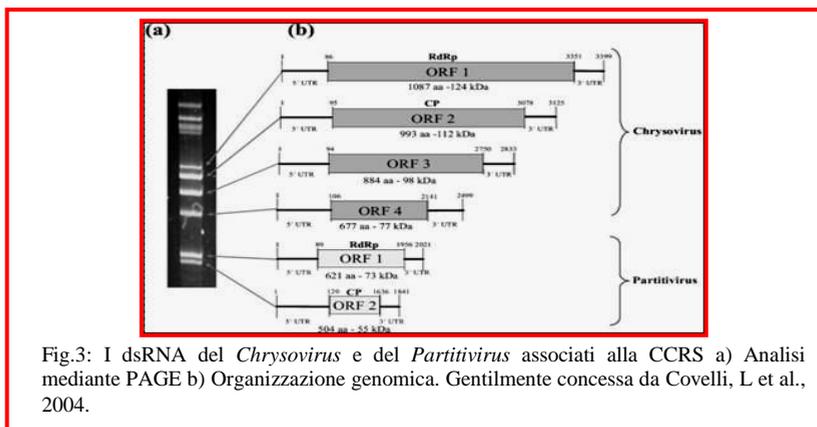


Fig.3: I dsRNA del *Chrysovirus* e del *Partitivirus* associati alla CCRS a) Analisi mediante PAGE b) Organizzazione genomica. Gentilmente concessa da Covelli, L et al., 2004.

I *Chrysovirus*. Il più grande dei 4 componenti, denominato chrys-dsRNA-1, è lungo 3399bp. Le regioni non tradotte situate alle 5'- e 3'- UTR, rispettivamente di 86 e 49bp, fiancheggiano una singola ORF di 1087aa. Il chrys-dsRNA-2 è lungo 3125bp, le regioni 5'- e 3'- UTR, rispettivamente di 95 e 48bp, fiancheggiano una ORF che potenzialmente codifica per una proteina di 993 aa molto simile, per sequenza, alla “coat protein” (CP) tipica dei *Chrysovirus*. Il chrys-dsRNA-3 (2833pb) codifica per una proteina di 884aa, probabilmente una proteasi, in quanto contiene tre motivi tipici di una superfamiglia di proteasi chiamata *OTU-like protease (ovarian tumor gene-like protease)*, formata da un gruppo di cisteine-proteasi, omologhe a quella codificata dal gene del tumore ovarico (*ovarian tumor gene, OTU*) in *Drosophila* (Balakirev et al., 2003). Il chrys-dsRNA-4 (2499bp) codifica potenzialmente per una proteina, di 677aa, dalla funzione sconosciuta. E' da notare che i 12 dsRNA associati all'ACD (Açikgöz et al., 1994) sono molto simili oltre che per lunghezza anche per sequenza a quelli della maculatura clorotico-rugginosa del ciliegio (Covelli et al., 2004; Coutts et

al., 2004). Poiché le due malattie erano molto simili anche dal punto di vista sintomatologico, fu ipotizzato un comune agente eziologico.

1.3 Obiettivo del lavoro

Il mio lavoro ha avuto l'obiettivo di localizzare il micovirus del genere *Chrysovirus* nelle foglie sintomatiche e nei tessuti vascolari di foglie malate mediante sia la rivelazione dei suoi componenti genomici sia, possibilmente, mediante rivelazione della putativa proteina capsidica. In parallelo, per identificare molecolarmente il fungo, putativo ospite dei micovirus, potenzialmente coinvolto nella malattia, ho eseguite analisi genetiche comparative delle sequenze amplificate per PCR di parte del cluster dei geni ribosomali (18S-ITS1-5,8S-ITS2-28S) dei funghi associati sia da campioni provenienti da ciliegi affetti da CCRS sia da ciliegi senza sintomi di alcuna malattia, analizzati periodicamente nei 3 anni di osservazione e studio.

2 Materiali e Metodi

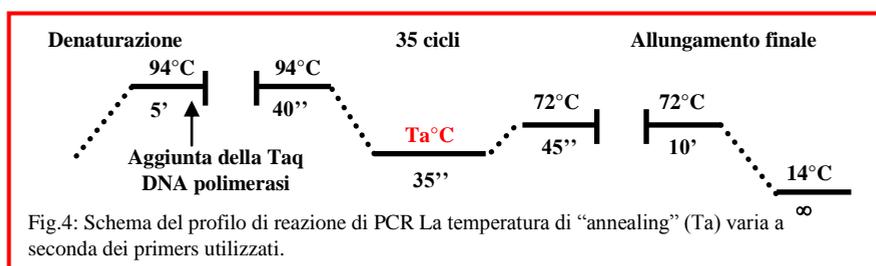
2.1 Identificazione genetica del micovirus Chrysovirus

2.1.1 Estrazione di acidi nucleici totali (metodo silica-capture)

200-500mg di materiale vegetale (gemme, foglie o petali) sono stati pestati nel mortaio con il tampone d'estrazione (PBS 1x, 0.05% Tween-20, 20mM DIECA, 2% PVP) secondo un rapporto peso/volume di 1:5, trasferiti in un eppendorf e centrifugati a 13000rpm per 10min a 4°C. E' stato prelevato un volume di 200µl di surnatante a cui è stato aggiunto SDS 1% finale, il campione è stato quindi incubato a 55°C per 15min. Dopo aver aggiunto 100µl di potassio acetato 3M e aver agitato delicatamente, il campione è stato centrifugato per 5min a 13000rpm a 4°C. Al surnatante, trasferito in un tubo eppendorf, sono stati aggiunti 700µl di soluzione A (6M NaI e 15mM Na₂SO₃) e 8µl di silice ed è stato incubato per 10min a T ambiente, poi centrifugato a 5000rpm per 5sec. Il precipitato è stato risospeso in soluzione di lavaggio (20mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 100mM NaCl, 50% etanolo) e nuovamente centrifugato a 5000rpm per 5sec. Dopo aver ripetuto il lavaggio, il precipitato è stato asciugato all'aria per qualche minuto, e poi risospeso in 400µl di acqua trattata con 0.1% DEPC (diethylpyrocarbonato). Il campione è stato incubato a 55°C per 5min e centrifugato a 13000rpm per 2min. Il surnatante è stato trasferito in una provetta e conservato a -20°C.

2.1.2 Rivelazione dei componenti genomici del micovirus mediante RT-PCR

Per rivelare i 4 dsRNA (componenti genomici) del micovirus del genere *Chrysovirus* è stata allestita una reazione di retrotrascrizione utilizzando come stampo gli acidi nucleici totali. Per stabilire le condizioni ottimali di reazione, sono state utilizzate quantità diverse (0.2-1-2-4 μ l e 10 μ l) di acidi nucleici totali. L'aliquota è stata denaturata a 98°C per 10min, poi incubata in ghiaccio per 5min prima dell'aggiunta di: 0.2pmol oligo reverse, 0.5mM dNTPs, H₂O sterile fino ad un volume di 11 μ l. La miscela è stata incubata a 98°C per 5min, poi in ghiaccio per 2min. Quindi sono stati aggiunti: First strand buffer 1X, 5mM DTT, 2U RNase OUT (Invitrogen), 10% DMSO, 20U di Superscript III RT (Invitrogen). La miscela di reazione è stata incubata per 1h a varie temperature (0-14-55°C), per stabilire quale fosse quella ottimale; infine la reazione è stata bloccata a 70°C per 15min. Un parte della miscela di RT è stata utilizzata per la reazione di PCR, che è stata eseguita nelle seguenti condizioni: Buffer 1x, 2mM MgCl₂, dNTPs 0.24mM, 1pmol primer forward, 1pmol primer reverse, 2.5 U Taq-polimerasi (Sigma), H₂O sterile fino a volume finale di 50 μ l. Il profilo di reazione è mostrato in Fig.4 e le coppie di oligo utilizzate e le relative Temperature di "annealing" sono riportate in tabella 1.



| Primer | Sequenza nucleotidica 5'-3' | Ta°C | Lunghezza attesa |
|----------------|-----------------------------------|------|------------------|
| dsRNA1 forward | GCTACCTATACTGGCAATCACTATGG | 64 | 248bp |
| dsRNA1 reverse | TCTCACCCCTTCATCACCCAATCTGGC | | |
| dsRNA2 forward | CCATTGCCAGTTATGCTGAGTAGGCC | 65 | 229bp |
| dsRNA2 reverse | CCTTCTCCACAGCGCTCTCTTTGCC | | |
| dsRNA3 forward | TTGCAACAAGTATCGGTATAGTAGC | 60 | 189bp |
| dsRNA3 reverse | CATTCAATGACGGATCATCCATCCC | | |
| RF270 forward | TGGTGGGACATGGTGGTAGAAC | 68 | 182bp |
| RF105 reverse | GTTTGGAGCCATGTACTCGGGCAGTT TCT | | |

Tabella1: Caratteristiche dei primers utilizzati per l'amplificazione dei 4 dsRNA del micovirus del genere *Chrysovirus*. (Ta = temperatura di "annealing" relativa a ciascuna coppia di primers).

2.1.3 Clonaggio dei frammenti amplificati per PCR

Al termine della reazione di PCR i campioni sono stati analizzati su gel di agarosio (1%) con bromuro di etidio 1µg/ml in tampone TBE 1x a 100V. Ultimata la corsa elettroforetica i frammenti di DNA amplificati sono stati purificati dal gel mediante il kit NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel) seguendo le istruzioni del fornitore e sono stati clonati nel vettore di clonaggio pDrive che permette lo screening blu/bianco. La reazione di ligazione è stata condotta seguendo il protocollo fornito dal kit di clonaggio PCR cloning (Qiagen). Il prodotto di ligazione ottenuto è stato utilizzato per trasformare (mediante shock termico) batteri di *E. coli* TG1 resi competenti mediante trattamento con cloruro di calcio. Il prodotto della trasformazione è stato piastrato su terreno solido LB-AGAR 1.4% contenente ampicillina 100µg/ml, sul quale sono stati precedentemente spatolati 40µl di X-Gal 20mg/ml e 10µl di IPTG 100mM, per lo screening blu-bianco delle colonie. Alcune delle colonie bianche cresciute sulle piastre sono state inoculate singolarmente in 5ml di LB liquido, contenente 100µg/ml di ampicillina. Da ogni inoculo sono stati prelevati 1.5ml per l'estrazione del DNA plasmidico

(Plasmid miniprep kit Sigma). Circa 1µg di DNA plasmidico di ciascun campione è stato idrolizzato con enzimi di restrizione nelle condizioni specificate dal produttore.

2.1.4 Determinazione della sequenza nucleotidica e analisi delle sequenze ottenute

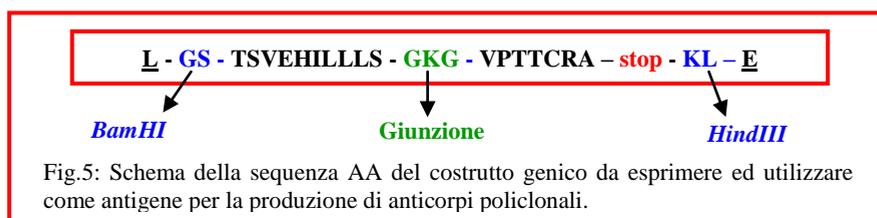
Le sequenze nucleotidiche dei prodotti di PCR sono state ottenute inviando un'aliquota dei campioni di DNA plasmidico purificati dalle colonie positive all'Eurofins MWG Operon (Germania). Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle presenti in banca dati all'indirizzo internet <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Analisi comparative tra le varie sequenze ottenute sono state effettuate mediante il programma CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

2.2 Identificazione del micovirus Chrysovirus mediante rivelazione di epitopi virali

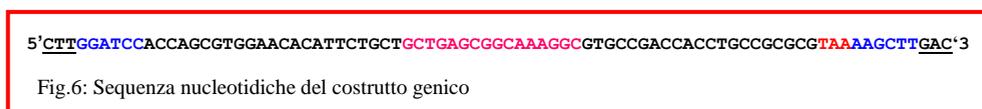
2.2.1 Progettazione del costrutto genico da utilizzare come antigene

Per la ricerca delle proteine virali è stato selezionato il gene della proteina capsidica perché è la più abbondante e la più stabilmente presente. La sequenza amminoacidica della putativa proteina capsidica del *Chrysovirus* (A.N. AJ781398) è stata analizzata per identificare gli epitopi di maggiore stimolazione immunogena mediante il programma PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES che prevede la selezione di peptidi antigenici secondo il metodo di Kolaskar and Tongaonkar (1990). Sono stati scelti i due epitopi, risultati potenzialmente più immunogeni: uno di 10 aa (TSVEHILLLS) e l'altro di 7 (VPTTCRA) i quali sono stati uniti mediante

una giunzione flessibile (GKG). A monte e a valle dei due epitopi sono stati collocati i siti di restrizione rispettivamente dell'enzima *BamHI* e *HindIII*, e per ciascun sito di restrizione sono state aggiunte tre basi d'appoggio per facilitarne il riconoscimento da parte dell'enzima. In Fig.5 è riportata una rappresentazione schematica della sequenza amminoacidica del costrutto.

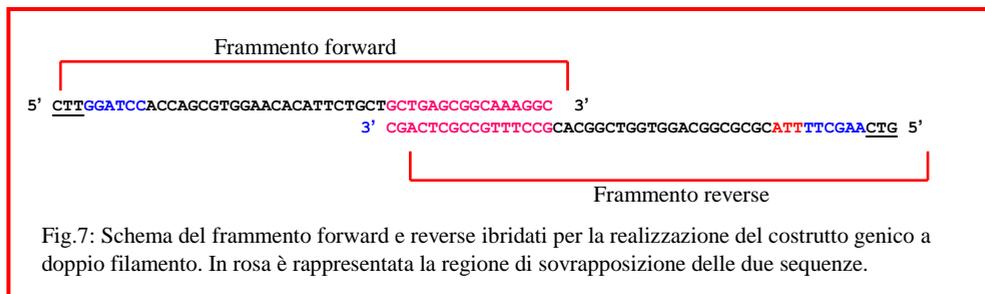


Una volta progettato, la sequenza del costrutto è stata convertito in sequenza nucleotidica secondo il Codon Usage di *E. coli K12* ottenendo una sequenza di 81bp (Fig.6).

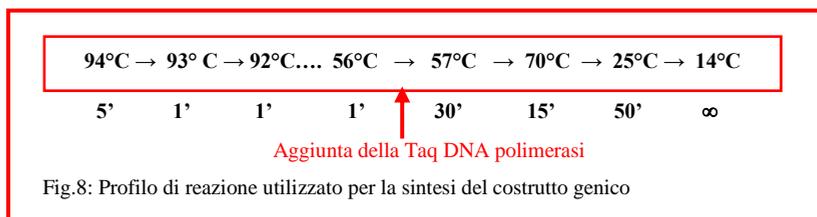


Non potendo far sintetizzare l'intero segmento di DNA dalla MWG in quanto troppo lungo per esserne garantita la sequenza è stata attuata una strategia che prevedeva la sintesi di un frammento forward e di uno reverse circa della medesima lunghezza con una sequenza di 16 nucleotidi complementare tra loro ai rispettivi 3'(Fig.7). La regione di sovrapposizione ha lo scopo di far ibridare i due frammenti per allungarne le sequenze al 3' ad opera della Taq-DNA polimerasi. Circa 10µg del frammento forward e

10µg del frammento reverse sono stati utilizzati in una reazione costituita da: Buffer 1x, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 2.5U Taq-DNA polimerasi (Sigma), H₂O fino a volume finale di 50µl.



La miscela è stata incubata in un termociclatore e il profilo di reazione è mostrato in Fig.8. La Taq-DNA polimerasi è stata aggiunta quando la miscela ha raggiunto la temperatura di 57°C.



Al termine della reazione il campione è stato caricato su gel di agarosio (2%) e il frammento della lunghezza attesa ottenuto è stato purificato dal gel e clonato prima nel vettore pDrive per determinarne la sequenza nucleotidica e poi trasferito sia nel vettore di espressione pMAL-c2E per l'espressione in procarioti (strategia 1) sia nel vettore p3XFLAG-CMV-10 per l'espressione in eucarioti (strategia 2).

2.2.2 Strategia 1: Espressione del costrutto genico in procarioti

Per poter esprimere il peptide si è utilizzato un sistema di espressione eterologo in *E. coli* che offre il vantaggio di produrre proteine ricombinanti ad alti livelli e a costi ridotti. Per evitare che la proteina ricombinante fosse riconosciuta come esogena dall'ospite e quindi degradata, il costrutto genico codificante il peptide è stato clonato nel vettore di espressione pMAL-c2E a valle del gene *malE* che codifica per la maltose binding protein (MBP), allo scopo di ottenere una proteina ricombinante con la regione N-terminale rappresentata dalla MBP e la regione C-terminale rappresentata dal peptide codificato dal costrutto. Il gene *malE* è sotto il controllo del promotore inducibile P_{taq} . Per stabilire dopo quanto tempo dall'aggiunta dell'IPTG si avesse la concentrazione maggiore di MBP-ricombinante solubile è stata effettuata una cinetica di induzione prelevando 1ml di coltura batterica ogni 30min e analizzandone parte dei pellet risultanti per SDS-PAGE.

2.2.3 Purificazione della proteina MBP-ricombinante

L' MBP-ricombinante è stata purificata mediante cromatografia di affinità su resina di amilosio a cui si lega l' MBP. L'eluizione della proteina è stata effettuata utilizzando come competitore una soluzione 10mM di maltosio. La pasta cellulare, ottenuta dall'induzione di 100ml di coltura, è stata risospesa in tampone di lavaggio β (20mM TrisHCl pH 7.5, 1mM EDTA, 200mM NaCl) (1ml/10 O.D.) e incubata in ghiaccio per 20min, previa aggiunta di lisozima (50 μ g/ml). Quindi la sospensione batterica è stata sottoposta a tre cicli di sonicazione (15min ciascuno una potenza di 70w e un impulso di 8sec) e poi centrifugata a 10000rpm per 30min a 4°C per

rimuovere le membrane e i detriti cellulari. Il surnatante è stato fatto interagire con 2ml di resina di amilosio per 3h in lenta agitazione. Quindi la resina è stata caricata su una colonnina, lavata per 3 volte con tampone di lavaggio β . I lavaggi sono stati raccolti e la presenza delle proteine è stata accertata misurando i valori di assorbanza a 280nm. Dopodichè sono stati aggiunti 2ml di soluzione di eluizione (50% maltosio, 50% tampone di lavaggio β). La raccolta dell'eluato è stata effettuata dopo 15min dal caricamento del tampone di eluizione. La purezza delle proteine nell'eluato è stata verificata mediante SDS-PAGE.

2.2.4 Analisi mediante SDS-PAGE

Per un'ottimale separazione dei polipeptidi per l'elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS sono state usate per il separating gel concentrazioni di acrilammide differenti.

| Separating gel | 7.5% | 10% | 12.5% |
|-----------------------------------------|-------------|-------------|--------------|
| Acrilammide 40%/bisacrilammide 1% (40%) | 1.875ml | 2.5ml | 3.125ml |
| ddH ₂ O | 4.22ml | 3.6ml | 2.967 |
| Tris HCl 1M pH 8.8 | 3.75ml | 3.75ml | 3.75ml |
| SDS 20% | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l |
| APS 10% | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l |
| TEMED | 7.5 μ l | 7.5 μ l | 7.5 μ l |

| Stacking gel | 5% |
|----------------------------------------|-------------|
| Acrilammide 40%/bisacrilammide 1%(40%) | 625 μ l |
| ddH ₂ O | 3.6 ml |
| Tris HCl 1M pH 6.8 | 625 μ l |
| SDS 20% | 25 μ l |
| APS 10% | 25 μ l |
| TEMED | 5 μ l |

I campioni da analizzare sono stati preparati aggiungendo il Sample buffer per SDS-PAGE e bolliti per 5min prima del caricamento nel gel. La corsa è stata condotta a voltaggio costante (150V) in tampone di corsa Tris-glicina-SDS (10% Tris-glicina, 20% SDS) per circa 1h e 30min. Al termine della corsa il gel è stato fissato con una soluzione di metanolo/ acidoacetico /acqua (45% : 10% : 45%) per 30min e colorato con 0.1% Coomassie brilliant blue per 30min. Successivamente il gel è stato decolorato con una soluzione di metanolo/ acidoacetico /acqua (40% : 15% : 45%).

2.2.5 Produzione degli anticorpi policlonali in coniglio

La proteina MBP-ricombinante purificata è stata utilizzata come antigene per la produzione di anticorpi policlonali in coniglio. Gli animali utilizzati per la produzione di anticorpi sono stati un coniglio maschio e una femmina di un mese di età. In ciascun coniglio è stata iniettata un'emulsione costituita da: 1ml di soluzione proteica (MBP-ricombinante circa 1mg in una soluzione 20mM Tris-HCl pH 7.4, 200mM NaCl, 1mM EDTA e 10mM maltosio) e 1ml di adiuvante completo di Freund. L'adiuvante di Freund è una miscela di olio minerale, un agente emulsionante e una sospensione di *Mycobacterium tuberculosis* inattivato al calore. L'olio minerale aumenta la vita media delle molecole iniettate perché provoca un rilascio lento dell'antigene dall'emulsione, il micobatterio attiva il sistema immunitario generando un'inflammation sterile con formazione di un granuloma che attira linfociti e aumenta ulteriormente la risposta immunitaria all'antigene, aumentando di conseguenza la probabilità di produrre anticorpi. L'emulsione è stata iniettata in parte nello spazio interdigitale delle zampe posteriori e in parte nei glutei. Prima delle iniezioni è stato prelevato 1ml di

sangue dalla vena marginale posteriore di un orecchio per ottenerne il siero privo degli anticorpi diretti contro l'antigene, da considerare come controllo negativo. Per migliorare l'efficienza della risposta anticorpale dei conigli sono stati effettuati 3 richiami a distanza di 15 giorni ciascuno iniettando l'antigene emulsionato all'adiuvante incompleto di Freund in altre parti del corpo (addome, sottocute della nuca, petto) in maniera tale da aumentare i distretti linfonodali attivati per amplificare la risposta linfocitaria a tutto l'organismo. Prima di effettuare le iniezioni di richiamo, dai conigli è stato prelevato 1ml di sangue dalla vena marginale posteriore dell'orecchio per verificare l'eventuale produzione degli anticorpi.

2.2.6 Strategia 2: Progettazione del costrutto genico per l'espressione in eucarioti

Per l'espressione diretta in eucarioti il costrutto genico è stato trasferito dal vettore di clonaggio pDrive al vettore p3XFLAG-CMV-10 nella giusta cornice di lettura. A tale scopo il vettore pDrive ricombinate è stato idrolizzato con due enzimi di restrizione (*Kpn I* e *Xba I*) che consentivano il successivo clonaggio direzionale in p3XFLAG-CMV-10. In questo modo nel vettore p3XFLAG-CMV-10 è stato clonato il costrutto genico di 81cb più parte del polylinker di pDrive, 97bp, generando un costrutto di 178bp.

2.2.7 Produzioni di anticorpi in coniglio mediante immunizzazione con DNA

In questo caso il vettore p3XFLAG-CMV-10 ricombinante è stato iniettato direttamente nel coniglio. Specificatamente nella regione intraperitoniale è stata iniettata un'emulsione costituita da: 0.5ml di una soluzione costituita

da 1mg di vettore ricombinante in 20mM Tris-HCl pH 7.4, e 0.5ml di adiuvante completo di Freund. Per migliorare l'efficienza della risposta anticorpale del coniglio sono stati effettuati 4 richiami a distanza di 10 giorni ciascuno iniettando l'antigene emulsionato all'adiuvante incompleto di Freund.

2.2.8 Identificazione degli anticorpi mediante il Saggio di Outcherlony

Il saggio di Outcherlony è stato utilizzato per verificare la presenza nel siero dei conigli degli anticorpi desiderati. Il saggio si basa sulla proprietà degli anticorpi e degli antigeni di dar luogo ad un precipitato quando vengono soddisfatte le condizioni di equivalenza, ossia quando il numero di determinanti antigenici è uguale ai siti anticorpali. Il saggio è stato effettuato versando su un vetrino da microscopio 3ml di gel di agarosio fuso (1% agarosio in 150mM NaCl) in modo da formare uno strato di gel di 5mm di spessore. Nel gel sono stati effettuati cinque pozzetti di 2mm di diametro, 1 centrale e 4 ai vertici di un quadrato di 1cm.

2.2.9 Purificazione degli anticorpi policlonali dal siero dei conigli immunizzati

Dopo circa 15 giorni dall'ultimo richiamo, dai conigli immunizzati è stato prelevato il sangue (circa 50-70ml). Il sangue raccolto in tubi falcon sterili è stato lasciato coagulare a 37°C per 2h, per ottenere la liberazione del siero. Il siero ottenuto è stato centrifugato a 3000rpm per 20min a 4°C per eliminare i residui di coagulo. Al siero è stato aggiunto solfato di ammonio fino al 40% di saturazione, a questa concentrazione salina si verifica il fenomeno del salting-out delle immunoglobuline. La sospensione è stata

tenuta in agitazione per 1h a 4°C, quindi trasferita in tubi falcon e centrifugata a 7000rpm per 20min a 4°C. Il surnatante risultante, contenente principalmente albumine e β -globine, è stato eliminato mentre il precipitato, contenente soprattutto immunoglobuline e solo in minima parte albumine e β -globine, è stato risospeso con un volume di PBS 1x pari al volume di siero iniziale. È stata effettuata una seconda precipitazione con solfato d'ammonio al 40% di saturazione per eliminare i residui di albumine e β -globine presenti nel primo precipitato. La sospensione ottenuta dalla seconda precipitazione è stata dializzata per 18h a 4°C in tubi Spectra/Por cutoff 6-8kDa contro il tampone NaH_2PO_4 10mM pH 7.5 per eliminare il sale. Dopo la dialisi la soluzione proteica è stata trasferita in falcon e centrifugata a 10000rpm per 30min a 4°C, il surnatante recuperato è stato sottoposto a cromatografia a scambio anionico su una colonna 1.6cm x 49cm impaccata con la resina DA52. Caricato il campione la colonna è stata collegata ad un formatore di gradienti: L'eluizione è stata effettuata con un gradiente lineare di NaCl da 0 a 500mM nel tampone fosfato (velocità di flusso 5ml/8min). Le frazioni eluite contenenti le gammaglobuline sono state raccolte, è stata determinata la concentrazione proteica misurando l'assorbanza a 280nm e sono state conservate a -20°C.

2.2.10 Estrazione di proteine da foglie di *Prunus avium*

Circa 500mg di frammenti di foglie di ciliegio sintomatiche sono stati pestati in un mortaio con azoto liquido. La polvere ottenuta è stata trasferita in tubi da 2ml ed è stato aggiunto un volume di soluzione 10% TCA/Acetone tale da riempire il tubo. Il campione è stato agitato per inversione e centrifugato a 13000rpm per 5min a 4°C, il surnatante è stato

rimosso ed è stata aggiunta una soluzione fredda di 80% metanolo più 0.1 M ammonio acetato, quindi centrifugato a 13000rpm per 5min a 4°C. Eliminato il surnatante è stato aggiunto acetone 80% freddo, il campione è stato agitato utilizzando un vortex e centrifugato a 13000rpm per 5min a 4°C; il pellet risultante dalla rimozione del surnatante è stato incubato a 50°C per 10min per favorire la completa evaporazione dell'acetone. Quindi il campione è stato incubato per 10min con 800µl/100mg di materiale di partenza in una soluzione costituita da 1:1 fenolo (pH8, Sigma)/Dense SDS buffer (30% saccarosio, 2% SDS, 0.1M Tris-HCl pH8, 0.5% 2-mercaptoetanol) e centrifugato a 13000rpm per 5min a 4°C. Dopo la centrifugazione la fase fenolica superiore è stata trasferita in un nuovo tubo e le proteine sono state precipitate aggiungendo 5 volumi di una soluzione fredda costituita da metanolo più 0.1% ammonio acetato incubando il campione per 40min a -20°C. Le proteine precipitate sono state raccolte mediante centrifugazione e lavate per 2-3 volte con metanolo più 0.1% ammonio acetato e 2-3 volte con acetone 80% freddo (W.Wang et al., 2006). Il pellet finale è stato asciugato all'aria fino alla completa evaporazione dell' acetone e poi sciolto nel Sample buffer per SDS-PAGE.

2.2.11 Analisi mediante Western blot

Estratti proteici di foglie di ciliegio sintomatiche e asintomatiche sono stati analizzati per Western blot. Il trasferimento degli estratti proteici dal gel di poliaccrilammide al filtro di nitrocellulosa è stato effettuato a 400mA per 2h a 4°C ed è stato controllato per colorazione con Rosso Ponceau (soluzione allo 0.2% in TCA 3%). Le bande proteiche che immunoreagiscono con gli Ab sono state rivelate mediante saggi immuno enzimatici colorimetrici. Il

filtro è stato incubato a 37°C per 2h in lenta agitazione con la blocking solution (TBS (10mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl), 0.05% Tween-20, 3% proteine di latte in polvere), poi lavato con la soluzione di lavaggio (TBS, 0.05% Tween-20, 3% proteine di latte in polvere) per 3 volte per 5min a T ambiente in lenta agitazione e incubato con gli anticorpi policlonali di coniglio anti-MBP-ricombinante (Ab I) in TBS + 3% proteine di latte in polvere per 1h a T ambiente. Dopo l'incubazione con l'Ab I il filtro è stato lavato con la soluzione di lavaggio per 3 volte per 20min, quindi incubato con gli Ab II (anticorpi di capra anti IgG, coniugati con la perossidasi di rafano SIGMA) (diluizione 1:500) in TBS + 3% proteine di latte in polvere per 1h a T ambiente. Il filtro è stato quindi lavato con soluzione di lavaggio per 4 volte per 20min per allontanare l'Ab II che non si è legato. L'immunorivelazione è stata effettuata immergendo il filtro in 25ml di TBS a cui è stato aggiunto il substrato della perossidasi (10µl di una soluzione di H₂O₂ al 30%) e il cromogeno (diaminobenzidina, o 4-cloronaftolo). La reazione è stata bloccata dopo pochi minuti con H₂O per impedire lo sviluppo eccessivo di colore.

2.3 Identificazione mediante analisi molecolari di un fungo, putativo ospite del Chrysovirus, potenzialmente coinvolto nella malattia

Le analisi per l'identificazione del fungo potenzialmente coinvolto nella CCRS e ospite dei micovirus sono state effettuate da DNA estratto da foglie e gemme sia di alberi affetti da CCRS provenienti dalla provincia di Ariano Irpino (AV) sia di alberi sani, che non hanno mostrato nel corso dei tre anni di indagini alcun tipo di malattia, provenienti da diverse aree della regione Campania e della Toscana. In particolare sono stati analizzati in Campania 5

alberi affetti da CCRS provenienti da Ariano Irpino (700m); 5 alberi a livello del mare di cui 1 di Portici (NA), 2 Sessa Aurunca (CE), 1 di Procida e 1 di Napoli, senza segni di alcuna malattia. In Toscana sono stati analizzati: 4 alberi senza sintomi di malattie di Pratovecchio (400m) 2 alberi da Lonnano (700m) 1 albero da Prato alle Cogne (1054m) tutti in provincia di Arezzo (AR) e 1 albero da Scandicci (FI). Gli alberi di Ariano Irpino, Portici, Pratovecchio e Sessa Aurunca sono stati analizzati stagionalmente per un periodo di 3 anni, gli altri occasionalmente. Inoltre sono state analizzate anche gemme di un noce di Pratovecchio (AR), un albicocco e un ciliegio acido (*Prunus cerasus*) di Ariano Irpino (AV) presenti nelle adiacenze dei ciliegi dolci esaminati.

2.3.1 Estrazione di DNA genomico da tessuto vegetale

Campioni di foglie o gemme di ciliegio (0.5-1g) sono stati sterilizzati effettuando lavaggi in etanolo 70%, ipoclorito di sodio 3% e di nuovo in etanolo 70% (Cardinali et al., 1994), poi sono stati sminuzzati con forbici sterili, posti in un mortaio e frantumati con azoto liquido. Il tessuto polverizzato è stato risospeso in circa 6ml di soluzione di lisi (50mM Tris-HCl pH 8.0, 200mM EDTA pH 8.0, PVP 0.085 mg/ml, BSA 0.24 mg/ml, 0.1% SDS, 0.4% Sarcosyl, 0.014mM β -mercaptoetanolo) e incubato in bagnetto termostato per 2h a 60°C. Il campione è stato raffreddato in ghiaccio per qualche minuto, quindi è stato aggiunto 1/3 di volume di potassio acetato 5M freddo, ed è stato incubato in ghiaccio per 15min previo delicato mescolamento. Dopo centrifugazione a 7.000rpm, a 4°C per 30min., il surnatante è stato prelevato e sottoposto a tre estrazioni con cloroformio-alcool isoamilico (24:1). La precipitazione è stata effettuata

aggiungendo 0.7 volumi di isopropanolo freddo, e incubando per la notte a -20°C. Dopo centrifugazione a 13200rpm, a 4°C per 20min, il DNA precipitato è stato lavato con etanolo 70%, e risospeso in 500µl circa di H₂O sterile. Aliquote di DNA (250-300ng) sono state successivamente dializzate contro H₂O su filtri circolari millipore 0.025 µm per 90min, e poi incubate per 1h a T ambiente con RNase A.

2.3.2 Amplificazione mediante PCR dei geni ribosomali

Ogni preparazione di DNA genomico è stata controllata per possibili inibitori amplificando per PCR una regione compresa tra l'estremità 3' 18S e il 5' terminale dell'rDNA 5.8S di vegetali utilizzando i primer ITSa-ITSb (Adachi et al., 1994), Tabella 2. Quindi aliquote di DNA sono state analizzate per identificare i funghi presenti usando i primer EF4-EF3 che amplificano parte dell'rDNA 18S di funghi (Smit et al., 2001) (Fig.9).

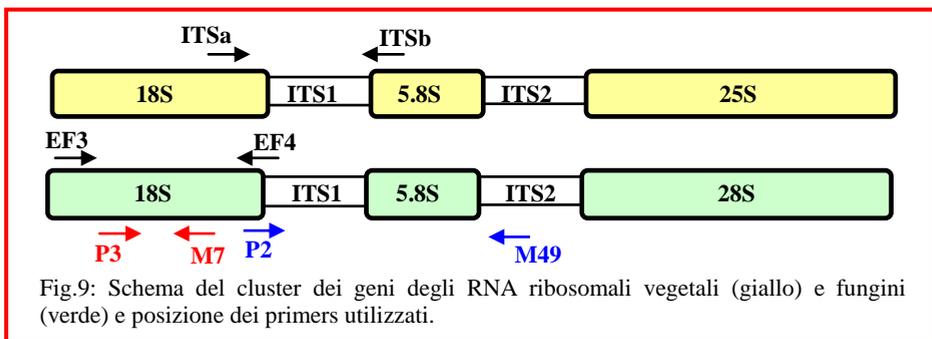


Fig.9: Schema del cluster dei geni degli RNA ribosomali vegetali (giallo) e fungini (verde) e posizione dei primers utilizzati.

La reazione di PCR è stata eseguita nelle seguenti condizioni: 5µl Buffer 10x, 3µl MgCl₂ 25mM, 1 µl dNTPs 10mM, 1µl primer forward 20pmol/µl,

1µl primer reverse 20pmol/µl, 0.5µl Taq-DNA polimerasi (Sigma) 5U/µl, H₂O sterile fino a volume finale di 50µl.

Il profilo di reazione utilizzato è riportato in fig.1, le coppie di primer utilizzate e le relative temperature di “annealing” sono riportate in Tabella 2.

| Primer | Sequenza nucleotidica 5'-3' | Ta°C | Lunghezza attesa |
|--------------|-----------------------------|------|------------------|
| EF4 forward | GGAAGGGGTGTATTTATTAG | 48 | 1600 |
| EF3 reverse | TCCTCTAAATGACCAAGTTTG | | |
| ITSa forward | GGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCG | 60 | 350 |
| ITSb reverse | ATCCTGCAATTCACCAAGTATC | | |

Tabella 2: Caratteristiche dei primers utilizzati per l'amplificazione dell'rDNA fungino e vegetale (Ta = temperatura di “annealing” relativa a ciascuna coppia di primers).

2.4 Identificazione molecolare del fungo *Taphrina*

2.4.1 Progettazione di primers specifici per il fungo del genere *Taphrina*

Per identificare la specie del fungo *Taphrina* sono stati progettati primers (P3-M7) specifici per una regione dell'rDNA 18S del genere fungino *Taphrina* (Fig.9 e Tabella 3) utilizzando le sequenze note in banca dati (A.N.:AY548293 e AB435051). Per stimare il tasso di divergenza tra le specie è stata progettata anche una coppia di primers (P2-M49) per l'amplificazione delle regioni ITS (Fig.9 e Tabella 3). Sulla base delle sequenze presenti in banca dati (DQ479936 e DQ471134) sono stati disegnati anche dei primers per amplificare geni codificanti proteine già usati per studi filogenetici (Spatafora et al., 2006), specifici per il fungo *T. wiesneri*. Si tratta del gene che codifica per il fattore di allungamento della sintesi proteica (EF1- α) e del gene che codifica per la subunità 1 della RNA polimerasi II (RBP1) (Tabella 3). Il profilo di reazione delle PCR è in Fig.4.

| Primer | Sequenza nucleotidica 5'-3' | Ta°C | Lunghezza attesa |
|---------------|------------------------------------|-------------|-------------------------|
| P3 forward | GGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGC | 66 | 250bp |
| M7 reverse | GGTCAACCAAGGCCAAGGTTTCAGC | | |
| P2 forward | GATTGTCGTTGGGCTGCTGG | 65 | 700bp |
| M49 reverse | CGCGTATTCTACCTGATCTGAG | | |
| EF1 forward | CGGAAAGTCAACCACTACCG | 62 | 730bp |
| EF2 reverse | CAGTCCGACCATCAGACGAGC | | |
| RPB1 forward | AGGTAGATGCAAATGACCC | 57 | 546bp |
| RPB1 reverse | CCGGCTCATGTTATCAAGG | | |

Tabella3: Caratteristiche dei primers utilizzati per l'amplificazione dell'rDNA fungino e per l'amplificazione dei geni EF1- α e RPB1 di *Taphrina w.* Ta = temperatura di "annealing" relativa a ciascuna coppia di primers.

2.4.2 Copy number di *T. wiesneri* in *P. avium*

Per definire i rapporti tra fungo e ciliegio ho determinato il valore approssimativo del numero di copie di genoma *Taphrina* rispetto a quello di ciliegio da campioni di DNA preparati da gemme di diversi alberi. In particolare utilizzando la stessa quantità di DNA per ciascun campione ho amplificato con ugual numero di cicli i geni ribosomali del fungo *Taphrina* (primer: P3-M7) e del ciliegio (primer: ITSa-ITSb). I prodotti di amplificazione ottenuti sono stati analizzati per elettroforesi in corsie adiacenti per confrontare l'intensità di fluorescenza delle bande ottenute.

2.4.3 Estrazione di RNA da tessuti vegetali di *Prunus avium* e studi di RT-PCR

Circa 100-150mg di tessuto vegetale (foglie e gemme di ciliegi malati di CCRS e sani) sono stati frammentati in un mortaio con azoto liquido e poi processati per isolare gli RNA utilizzando il kit plant total RNA secondo le istruzioni fornite dal produttore(Sigma). Circa 1 μ g di RNA estratto è stato analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio denaturante (1%

agarosio, MOPS 1x, 6% formaldeide) per verificarne l'integrità. Ai campioni da analizzare è stato aggiunto il loading buffer e sono stati incubati a 65°C per 5min prima del caricamento nel gel. La corsa è stata condotta a voltaggio costante (90V) in tampone di corsa MOPS 1x (50mM MOPS 1mM EDTA pH 7). Un'aliquota di RNA è stata utilizzata per effettuare analisi di RT-PCR seguendo sostanzialmente un protocollo standard. I primer utilizzati sono riportati in Tabella 4

2.5 Localizzazione del fungo *Taphrina* mediante immunocistochimica

2.5.1 Inclusioni di gemme di ciliegio dolce in paraffina

Gemme di ciliegio sono state tagliate longitudinalmente con una lama da bisturi sterile e fissate in formaldeide 10% per 3 giorni. I campioni sono stati lavati in tampone fosfato per 3 volte e quindi disidratati con etanolo (15min in etanolo 30%,50%,70%,85%,95% per 3 volte, 30min in etanolo 99% per 3 volte). I campioni disidratati sono stati immersi in xylene puro per 20min e poi incubati in stufa a 58°C per 15min. Quindi sono stati inclusi in paraffina secondo protocollo standard. I blocchetti di paraffina sono stati affettati sia trasversalmente che longitudinalmente e le fettine (di circa 7micron) sono state collocate su vetrini super-Frost che essendo polilisinati (polyLys), fanno aderire meglio le fette al vetrino, coperti con vetrino copri-oggetto e conservati.

2.5.2 Colorazione con Safranina e verde luce delle sezioni di gemme di ciliegio

Per verificare le buone condizioni dei tessuti inclusi in paraffina è stata effettuata una colorazione con safranina (1g di safranina in 150ml etanolo 50%) e verde luce (0.2g in 100ml di H₂O acidificata con 0.2 ml acido acetico). I vetrini sono stati sparaffinati (10min in xylene, 10min in etanolo 99%,95%,85%,75%,50% e 30%, 10min in H₂O) e colorati con safranina per 24h. Dopo due lavaggi in H₂O per 10min sono stati colorati con verde luce per 1h, quindi lavati con H₂O fredda per 10min. Infine sono stati disidratati, coperti con vetrino coprioggetto e osservati al microscopio.

2.5.3 Produzione per PCR della sonda a DNA marcata con digossigenina

Per localizzare il fungo *Taphrina* in gemme di ciliegio sono state effettuati degli esperimenti di ibridazione *in situ* di sezioni di gemme di ciliegio dolce con una sonda specifica del 18S rDNA di tale fungo. La sonda è stata ottenuta amplificando con gli oligo P3-M7 (Tabella 4) DNA genomico estratto da gemme di ciliegio dolce ed è stata, in una successiva reazione di PCR, marcata con digossigenina (DIG-11-dUTP) con un rapporto di 1:19 tra DIG-11-dUTP e dTTP secondo le indicazioni fornite dal produttore (Roche). La sonda è stata caricata su gel di agarosio all'1% e purificata dal gel prima di essere utilizzata in esperimenti di ibridazione *in situ*.

2.5.4 Ibridazione "in situ"

I vetrini sono stati sparaffinati, lavati per due volte in PBS per 5min e incubati con Proteinasi K (10µg/ml in 1mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH

7.2) per 15min. Poi sono stati lavati per 2 volte in PBS per 5min e 2 volte in SSC (15 mM NaCl 15mM sodio citrato, pH7) per 3min, quindi sono stati incubati in Tris-Glicina buffer (100mM Tris, 100mM Glicina) per 1h e 30min, asciugati ed incubati a 60°C per la notte previa aggiunta della mix di ibridazione: formaldeide 40%, SSC 5x, Denhardt's 1x, tRNA 100µg/ml, 100µg/ml di DNA di *C. intestinalis* frammentato mediante sonicazione, 150ng di sonda marcata, la mix con un volume finale di 70µl è stata riscaldata a 95°C per 2min e incubata in ghiaccio fino al momento dell'uso. Il giorno successivo i vetrini sono stati lavati con SSC 5x per 3 volte per 20min, poi lavati con una soluzione, preriscaldata a 60°C, di SSC 0.5x e formammide 20% a 60°C per 1h e incubati a T ambiente fino a quando la soluzione ha raggiunto i 37°C. Raggiunti i 37°C sono stati lavati con NTE buffer (500mM NaCl, 5mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 7.0), preriscaldato a 37°C, per 15min, poi con una soluzione, preriscaldata a 60°C, di SSC 0.5x più formammide 20% a 60°C per 30min e successivamente con una soluzione di SSC 2x per 30min a T ambiente. Infine i campioni sono stati incubati con la blocking solution (1% blocking reagent Boehringer in MBT buffer costituito da 100mM Acido malico e 150mM NaCl, pH 7.5) per 10min e successivamente incubati con anticorpi anti-Digossigenina (diluiti 1:2000 in MBT buffer) per tutta la notte a 4°C. Il giorno successivo i vetrini sono stati sottoposti a 4 lavaggi di 10min con TBS (10mM Tris-HCl, 15mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄, pH 7.4) e incubati con la soluzione di rivelazione (0.1% Tween-20, 50mg/ml di levamisol, 1ml di BM Purple AP substrate (Roche)) per 12-24h a T ambiente. I vetrini sono stati lavati con PBS per rimuovere la soluzione di rivelazione e osservati al microscopio.

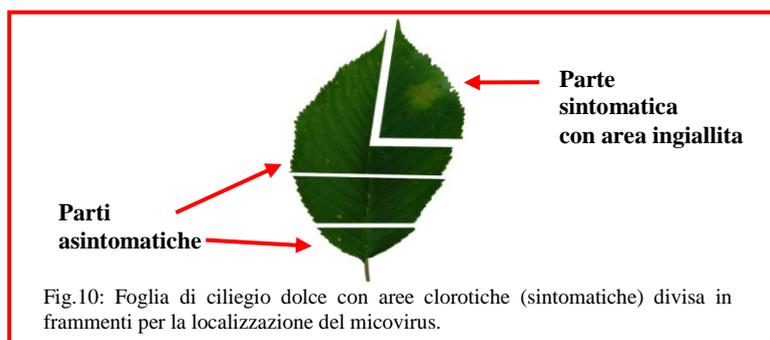
2.5.5 Colorazioni con coloranti specifici per funghi: Trypan blu, Sudan III e Blu di Lattofenolo

Allo scopo di localizzare il fungo in sezioni di gemme di ciliegio sono state effettuate delle colorazioni con coloranti specifici per funghi quali il Trypan blu, Sudan III e Blu di Lattofenolo. Il protocollo seguito è quello pubblicato da J.R.Barrow (J. R.Barrow, 2003) che prevede un'iniziale decolorazione delle sezioni presenti sul vetrino seguita poi dalla colorazione specifica.

3 Risultati e Discussione

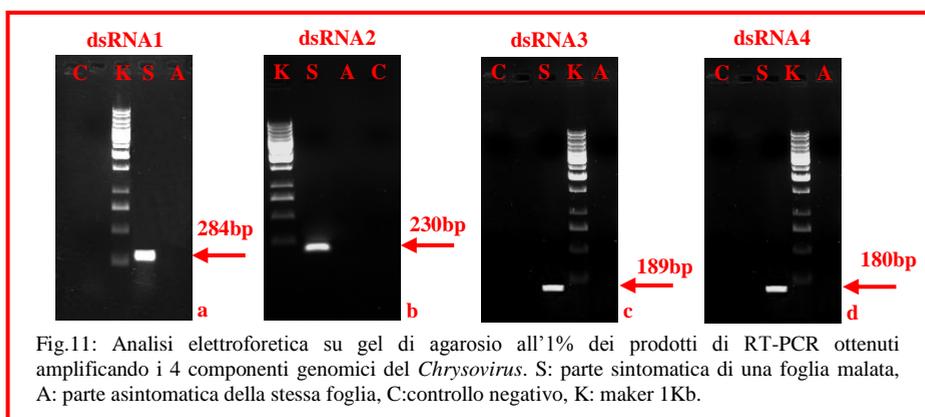
3.1 Identificazione dei micovirus mediante rivelazione delle unità genetiche

L'identificazione del micovirus del genere *Chrysovirus* è stata effettuata inizialmente mediante rivelazione delle sue 4 unità genetiche in campioni di acidi nucleici di foglie malate. Ho messo a punto un protocollo di estrazione di acidi nucleici totali seguita dai RT-PCR (par. 2.1.2 in Materiali e Metodi) sufficiente a rivelare i componenti genomici del micovirus (dsRNA) partendo da piccole parti di foglia (2-3cm²) così da localizzare in modo accurato la loro presenza. Una foglia di ciliegio dolce con i sintomi della CCRS (campioni provenienti da Ariano Irpino) è stata suddivisa in parte sintomatica caratterizzata da clorosi e parti asintomatiche (Fig.10) e poi sottoposte separatamente poi sottoposte a estrazione di acidi nucleici totali.

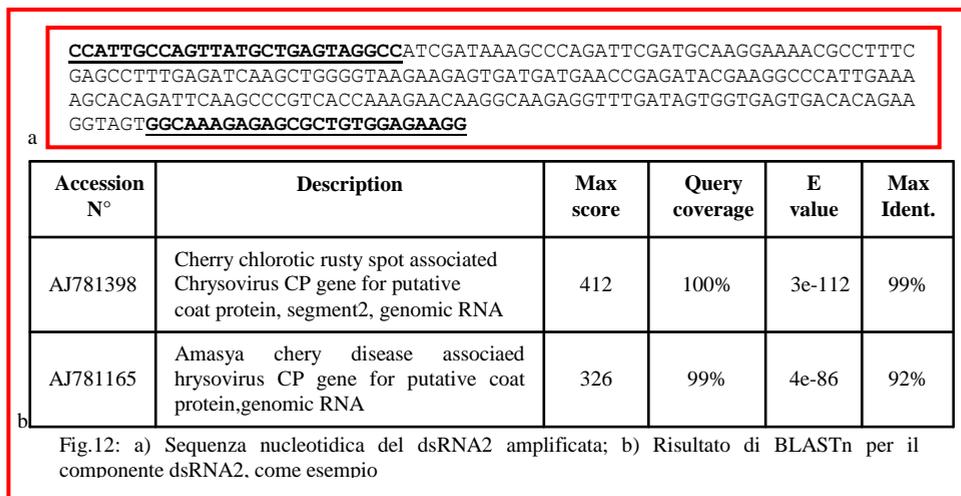


Gli acidi nucleici totali estratti sono stati utilizzati come stampo per effettuare le 4 distinte reazioni di retrotrascrizione con l'oligo reverse scelto per ognuno dei 4 dsRNA del *Chrysovirus*. I prodotti di ciascuna

retrotrascrizione sono stati utilizzati per amplificare mediante 4 PCR i 4 componenti genomici tipici del *Chrysovirus* (i primers utilizzati sono in Tab.1 in “Materiali e metodi”). I prodotti di PCR sono stati analizzati per elettroforesi e in Fig.11 si osserva che sono stati ottenuti i 4 frammenti di lunghezza attesa (dsRNA1 di 284bp, dsRNA2 di 230bp, dsRNA3 di 189bp, dsRNA4 di 180bp) solo dall’area di foglia con i sintomi della malattia (S), mentre dalle aree asintomatiche (A) non si osserva alcuna amplificazione.



I prodotti di amplificazione delle 4 PCR sono stati clonati per determinarne la sequenza nucleotidica per una identificazione definitiva. Le sequenze ottenute, confrontate con quelle presenti in banca dati, hanno mostrato un’identità del 99% ognuna con il rispettivo componente genomico del *Chrysovirus*. In Fig.12 è riportata come esempio la sequenza nucleotidica del dsRNA2 amplificato e il relativo risultato del BLASTn.



La rivelazione dei 4 componenti genomici del *Chrysovirus* nella sola area sintomatica di una stessa foglia non solo conferma l'associazione di tale micovirus con la CCRS (Di Serio et al.,1996), rappresenta un'indicazione della sua esatta localizzazione che esclude la presenza nei fasci vascolari.

Le analisi per la rivelazione dei componenti genomici del micovirus sono state ripetute periodicamente nel corso dei 3 anni di indagini, selezionando sempre le nervature di foglie con sintomi della CCRS che sempre hanno dato risultato negativo. L'indicazione è che la malattia non è sistemica. Esperimenti eseguiti su campioni di foglia con sintomi molto precoci hanno mostrato che quando la malattia è in una fase iniziale, cioè quando è osservabile soltanto una alterazione molto lieve del colore in aree circoscritte, ben diverse dalla clorosi, i *Chrysovirus* sono già presenti in quantità molto rilevante. La localizzazione è sempre nell'area mostrante il sintomo indicando che la loro presenza può essere considerata come una spia precoce nell'insorgenza della malattia.

3.2 Identificazione del Chrysovirus mediante rivelazione della putativa proteina capsidica

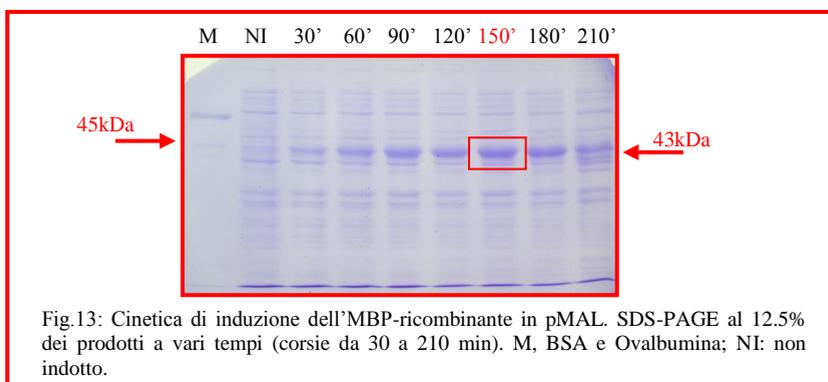
3.2.1 Progettazione del costrutto genico

Confermata la presenza dei componenti genomici del *Chrysovirus* nelle aree clorotiche della foglia di ciliegio, ho cercato di identificare un suo componente proteico per avere una identificazione diversa. E' da notare che le proteine codificate nel genoma micovirale sono solo putative e finora nessuna di esse è stata isolata. Tra le proteine codificate nei 4 segmenti genomici ho scelto di ricercare la proteina capsidica, perché necessaria a formare il virus e presumibilmente la più abbondante e stabile. Poiché la presenza della proteina capsidica era certamente scarsa negli omogenati di foglia, mi è sembrato opportuno mettere a punto un metodo immunologico che in genere è molto sensibile. Non ci sono in letteratura esempi di anticorpi contro *Chrysovirus* (e micovirus in generale) a cui fare riferimento, e perciò ho stabilito di produrre in coniglio anticorpi policlonali utilizzando sia la via classica richiedente l'iniezione dell'immunogeno proteico, sia un metodo innovativo in cui si inietta il DNA plasmidico. Anche l'immunogeno è stato prodotto con una strategia innovativa consistente nella sintesi *in vitro* di un costrutto codificante per due epitopi della proteina capsidica collegati tra loro dagli amminoacidi GKG, che tipicamente collegano i domini proteici di varie proteine, così da rendere più disponibili i due siti antigenici all'interazione con anticorpi. Il costrutto genico ottenuto, clonato per verificare l'assenza di errori nella sequenza nucleotidica, è stato trasferito direzionalmente dal vettore pDrive sia nel vettore di espressione pMAL-c2E per l'espressione in procarioti (strategia

1) sia nel vettore p3XFLAG-CMV-10 per l'espressione in eucarioti (strategia 2).

3.2.2 Strategia 1: Espressione del costrutto genico in procarioti e purificazione dell'MBP-ricombinante

Per l'espressione in procarioti il costrutto genico è stato clonato direzionalmente nel vettore di espressione pMal-c2E a valle del gene *mal E* che codifica per la maltose binding protein (MBP), allo scopo di ottenere una proteina ricombinante facilmente purificabile. Per ottenere la concentrazione maggiore di proteina MBP-ricombinante solubile ho effettuata una cinetica di induzione prelevando 2ml di coltura ogni 30min. Gli estratti proteici analizzati per SDS-PAGE sono mostrati in Fig.13. Si può osservare che la concentrazione maggiore di MBP-ricombinante si ha dopo 150min dall'aggiunta dell'IPTG e questo è il tempo di crescita usato per la sua preparazione.



La purificazione dell'MBP-ricombinante è stata effettuata mediante cromatografia di affinità su resina di amilosio. La proteina è risultata solubile e purificabile (Fig.14).

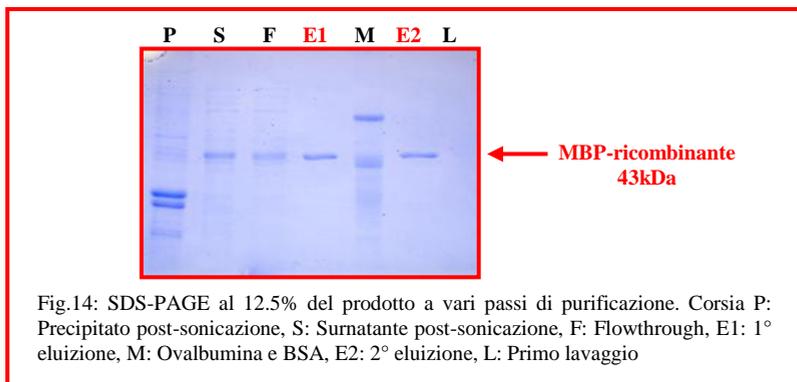
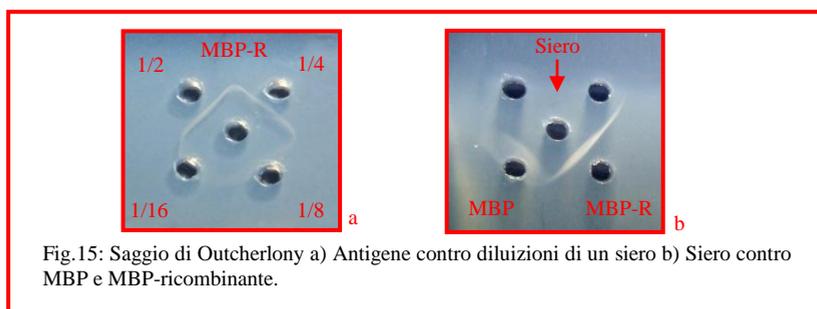


Fig.14: SDS-PAGE al 12.5% del prodotto a vari passi di purificazione. Corsia P: Precipitato post-sonicazione, S: Surnatante post-sonicazione, F: Flowthrough, E1: 1° eluizione, M: Ovalbumina e BSA, E2: 2° eluizione, L: Primo lavaggio

3.2.3 Produzione degli anticorpi policlonali in coniglio

L'MBP-ricombinante purificata è stata utilizzata come antigene per la preparazione di anticorpi policlonali in conigli (paragrafo 2.2.5 in Mat.e met.). Prima della 3° iniezione di richiamo, effettuata dopo 40 giorni dall'iniezione dell'immunogeno, è stato prelevato circa 0.1ml di sangue dalla vena marginale posteriore dell'orecchio di ognuno dei 2 conigli usati e il siero analizzato mediante il saggio di Outcherlony per controllare la presenza sia di anticorpi contro l'MBP sia la presenza di reattività verso il peptide ad essa fuso. In Fig.15a è mostrato il saggio di Outcherlony effettuato per una stima di dosaggio del titolo anticorpale con varie quantità di siero. Si può osservare che in corrispondenza dei 3 pozzetti 1/2, 1/4 e 1/8 sono ben chiare le bande di precipitazione, visibili per semplice diffusione di luce dimostrando la presenza abbondante di anticorpi. In Fig.15b è

mostrato un saggio di Outcherlony effettuato per verificare se gli anticorpi prodotti fossero diretti non solo verso l'MBP ma anche verso il peptide fuso ad essa. Questo dato si ottiene analizzando il pattern di precipitazione all'incrocio di bande di precipitazione adiacenti. Come è evidente in Fig.15a, dove l'antigene è nel pozzetto centrale e le varie diluizioni dello stesso siero sono in pozzetti successivi, gli incroci producono intersezioni con angoli ben arrotondati, senza sbavature, indicando l'omogeneità dei componenti. Invece, in Fig.15b, dove in due pozzetti periferici in successione ci sono la MBP e la MBP fusa al peptide recante gli epitopi della proteina capsidica, e al centro un siero, si osserva chiaramente che l'intersezione tra le due bande di precipitazione genera una sbavatura (baffo). Ciò dimostra che il siero trova nella proteina ricombinante epitopi non presenti nella sola MBP.



3.2.4 Strategia 2: Progettazione del costruito genico per l'espressione in eucarioti e produzioni di anticorpi in coniglio

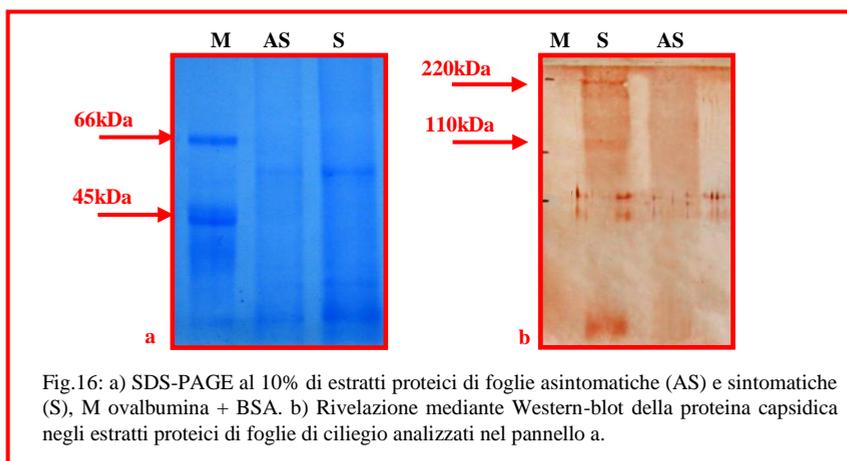
Per una diversa strategia di produzione di anticorpi, al fine di aumentarne la probabilità di ottenimento, oltre alla metodica classica ho applicata, in parallelo, una metodica moderna più rapida e meno costosa che prevede

l'iniezione del vettore ricombinante direttamente in coniglio. Il vettore p3XFLAG-CMV-10 utilizzato per questo esperimento ha opportunamente il promotore forte del citomegalovirus umano (CMV) che consente la trascrizione del peptide in cellule di mammifero. In questo caso il costrutto genetico deve essere riconosciuto dalle cellule del coniglio, trascritto, tradotto e il prodotto antigenico, espresso direttamente nelle cellule dell'animale, deve stimolare il sistema immunitario e produrre anticorpi. Il siero immune, in questo caso, ha solo anticorpi contro il peptide codificato nel costrutto.

3.2.5 Rivelazione della proteina capsidica del Chrysovirus con gli anticorpi prodotti

Prima d'ora la presenza del *Chrysovirus* è stata accertata solo sulla base del suo riconoscimento genetico. La disponibilità di anticorpi che interagiscono *in vitro* con il costrutto peptidico prodotto sulla sequenza di presunti determinanti antigenici della proteina capsidica ha dato la possibilità di rivelare la presenza di quella proteina nei campioni naturali. Il risultato non era sicuro, perché i determinanti antigenici scelti si trovano in ambienti diversi nel costrutto e nella sequenza della putativa proteina. L'efficienza degli anticorpi è stata verificata sulle proteine totali estratte sia da foglie sintomatiche che asintomatiche per confronto di analisi di Western blot. In Fig.16a sono mostrati i pattern elettroforetici su gel di poliacrilammide al 10% di estratti di proteine totali da una foglia di ciliegio sintomatica (S) e estratti di parte asintomatica (AS) colorati con blue coomassie. In Fig.16b è mostrato il Western blot di filtro relativo agli estratti proteici in Fig.16a trattato con gli anticorpi che interagiscono contro la MBP-ricombinante,

rivelato per attività perossidasi. Come si può notare dalla Fig.16b si è avuto un segnale di immunorivelazione solo nella corsia dove è stato caricato l'estratto proteico della foglia sintomatica, infatti si osservano due bande, che non appaiono nella colorazione con blue coomassie, una a peso molecolare di circa 120kDa, che corrisponde a quello della proteina capsidica del micovirus *Chrysovirus*, e una banda di circa 220kDa esattamente il doppio di quello atteso. Analogo risultato si è ottenuto con gli anticorpi prodotti con la strategia 2 (dato non mostrato). Quindi il micovirus è presente non solo geneticamente nelle sole aree sintomatiche ma è anche come proteina capsidica e quindi, presumibilmente, è completo di capsula.



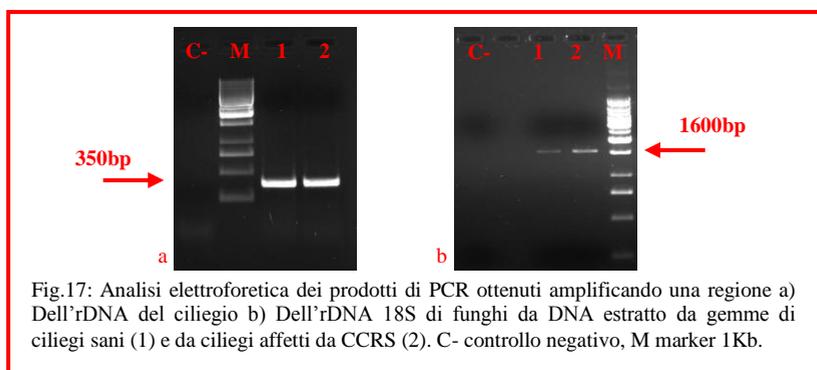
3.3 Identificazione di un fungo, putativo ospite del *Chrysovirus*.

La presenza della proteina capsidica indica che il micovirus *Chrysovirus* è strutturato in una capsula e indirettamente dimostra la necessaria presenza di un fungo che lo ospiti, perché nessun micovirus è stato mai osservato come forma libera. La mia ricerca sull'identificazione di un fungo, putativo ospite

del *Chrysovirus*, è stata inizialmente diretta all'analisi di foglie di alberi affetti da CCRS provenienti da Ariano Irpino (AV) e di alberi senza sintomi di malattie di varia provenienza.

I risultati delle identificazioni ottenuti utilizzando primer generici per funghi (EF4-EF3), che amplificano una parte dell'rDNA 18S fungino, hanno mostrato varietà di funghi, in assortimenti diversi tra loro, nonostante gli accurati lavaggi e sterilizzazioni a cui erano state sottoposte le foglie prima delle analisi. I dati coerentemente mostravano presenze occasionali tra cui emergeva la sola costante presenza del fungo *Taphrina*, noto patogeno del ciliegio. Poiché i risultati dimostravano la presenza di funghi non coinvolti in patologie e certamente trovati perché ben fissati alle foglie, si decise di analizzare la presenza di rDNA fungino nelle gemme di ciliegio che sono strutture chiuse nella quali è meno probabile che un occasionale fungo riesca a penetrare. Infatti, uno strato compatto esterno di piccole foglie cerose (perule) racchiude e protegge le foglioline embrionali che a loro volta racchiudono le altre strutture interne. Le estrazioni di DNA dalle strutture interne alle gemme, sono state fatte dopo lavaggi, sterilizzazione e rimozione delle perule. Il DNA estratto è stato utilizzato per amplificare mediante PCR una regione compresa tra l'estremità 3' dell'rDNA 18S e il 5' terminale dell'rDNA 5.8S del ciliegio per verificare l'efficienza della reazione sul DNA della pianta e l'assenza di inibitori. In Fig.17a è riportata la separazione elettroforetica dei prodotti di PCR ottenuti. Si osserva nelle corsie 1 e 2 la presenza della banda da 350bp della grandezza attesa per la regione di rDNA di ciliegio. L'analisi BLASTn della sequenza del frammento, confrontata con quelle presenti in banca dati, ha rivelato un'identità del 98% con l'rDNA di vari *Prunus* tra cui il ciliegio dolce

(*Prunus avium*). L'amplificazione per PCR è stata poi fatta utilizzando i primers generici per funghi (EF4-EF3) che amplificano una regione di circa 1600bp dell'rDNA 18S. Il frammento ottenuto, in un esperimento tipico (Fig.17b), clonato per la determinazione della sequenza nucleotidica ha generalmente mostrato che su 10 cloni analizzati almeno 6 avevano un'identità del 98% con rDNA 18S di un fungo appartenente al genere *Taphrina*. Gli altri cloni mostravano identità con rDNA 18S di diversi funghi presenti occasionalmente e quindi non associabili alla malattia.



Il ritrovamento del fungo del genere *Taphrina* in tutti i campioni di gemme di ciliegi sani di diversa provenienza(par. 2.3 in Materiali e Metodi) e affetti da CCRS costituisce un dato interessante sia perché dimostra che tale fungo non è presente solo sulle foglie di ciliegio ma anche nelle gemme, sia poiché funghi di tale genere sono responsabili di gravi malattie nei *Prunus* quali ad esempio la bolla del pesco causata da *Taphrina deformans*, gli scopazzi del ciliegio causata da *T. wiesneri*, i bozzacchioni del susino causata da *T. pruni* etc. Ho quindi ritenuto interessante stabilire se la presenza di *Taphrina* fosse una caratteristica dei ciliegi dell'area di Ariano Irpino e Portici, inizialmente

in esame. Ho quindi analizzato gemme di ciliegi sani di altre aree campane (Sessa Aurunca, Procida e Napoli) e di ciliegi presenti ad altitudini diverse in aree della Toscana (Scandicci (FI), Pratovecchio, Lonnano e Prato alle Cogne (AR) e a tale scopo ho progettato dei primers (P3-M7) che amplificano una regione dell'rDNA 18S specifica del genere *Taphrina*. In tutti i campioni è stata sorprendentemente ottenuto il frammento della lunghezza attesa, 252bp (Fig. 18).

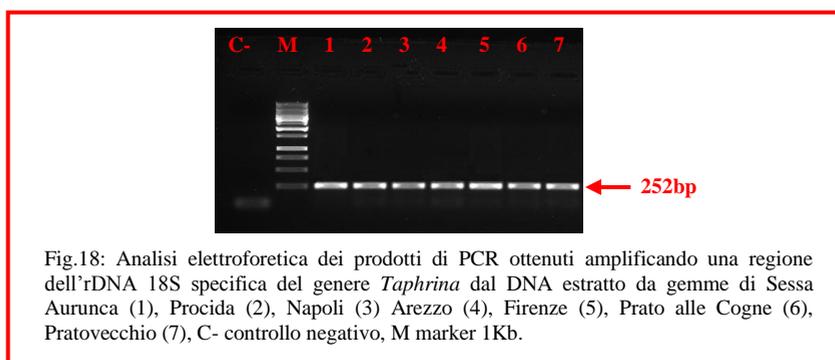


Fig.18: Analisi elettroforetica dei prodotti di PCR ottenuti amplificando una regione dell'rDNA 18S specifica del genere *Taphrina* dal DNA estratto da gemme di Sessa Aurunca (1), Procida (2), Napoli (3) Arezzo (4), Firenze (5), Prato alle Cogne (6), Pratovecchio (7), C- controllo negativo, M marker 1Kb.

L'analisi delle sequenze nucleotidiche dei vari cloni isolati e sequenziati, ha mostrato invariabilmente un'identità del 100% con l'rRNA ribosomale 18S di vari funghi del genere *Taphrina* confermando la sua presenza genetica. E' da notare che tutti gli alberi analizzati hanno fruttificato regolarmente senza mostrare segni di alcun tipo di patologia nel periodo dei 3 anni di indagini. Come controllo della particolarità della presenza della *Taphrina* nei ciliegi analizzati ho ricercato la presenza di funghi del genere *Taphrina* in gemme di un noce, di un albicocco e di un ciliegio acido (*Prunus cerasus*) adiacenti ai ciliegi analizzati. In nessuna di queste analisi ho ottenuto l'amplificazione del frammento della lunghezza attesa per la *Taphrina* indicando che quel

fungo, in quei campioni, non era rivelabile per PCR nemmeno con primer specifici ad alta efficienza. Il costante ritrovamento genetico in tutti i ciliegi analizzati di funghi *Taphrina* mi ha spinto ad analizzare parti ancora meno accessibili della gemma di ciliegio quali le teche polliniche e gli ovari dissezionati da gemme chiuse (Fig.19).

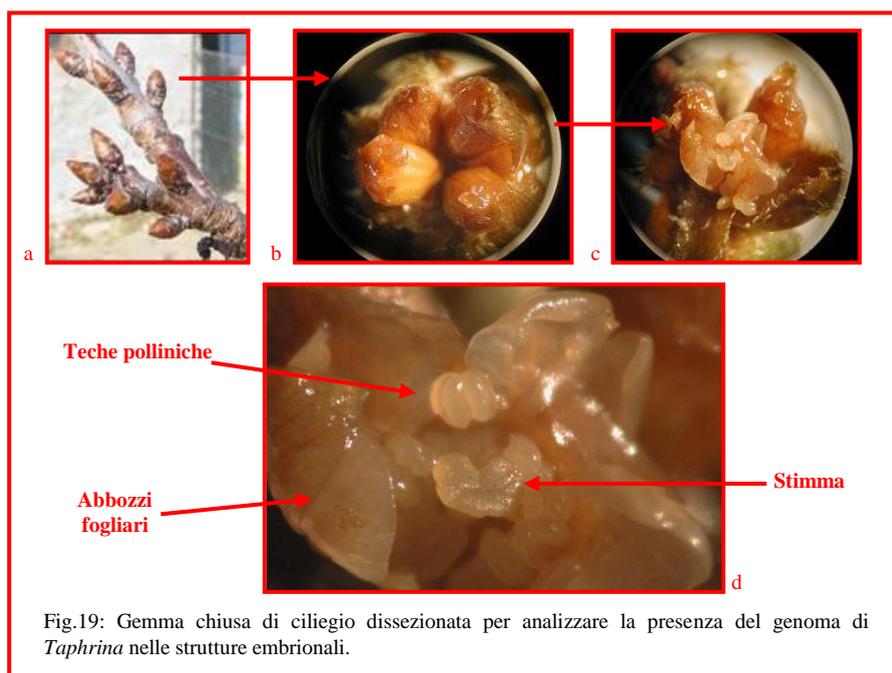
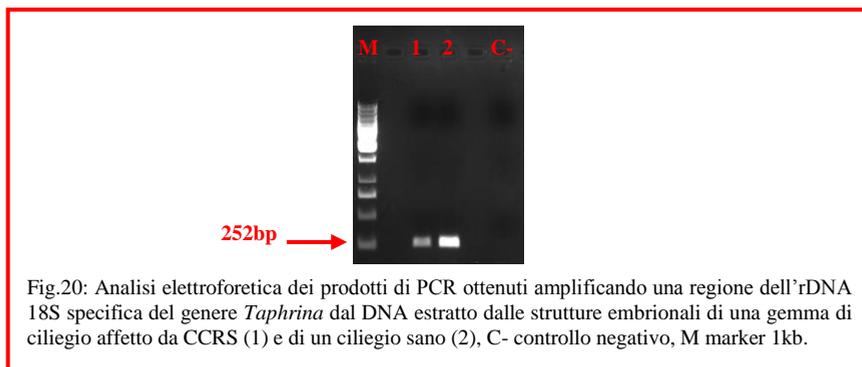


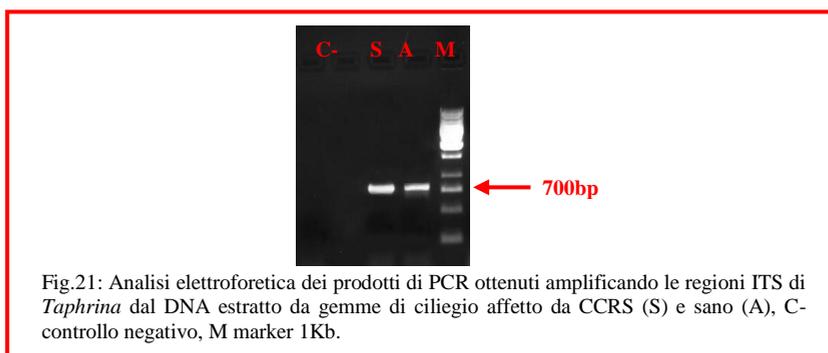
Fig.19: Gemma chiusa di ciliegio dissezionata per analizzare la presenza del genoma di *Taphrina* nelle strutture embrionali.

I prodotti di PCR tipicamente ottenuti sono mostrati in Fig.20. Si osserva la presenza della banda attesa per la *Taphrina*, sia dal DNA estratto da strutture embrionali di una gemma di un ciliegio sano sia di un ciliegio affetto da CCRS. L'evidenza è che anche in queste strutture l'analisi della sequenza nucleotidica dei vari cloni isolati e sequenziati invariabilmente mostra la presenza del rDNA di *Taphrina*.



3.3.1 Identificazione della specie di Taphrina

Ho quindi ritenuto necessario verificare se la specie di *Taphrina*, sempre presente in tutti i ciliegi analizzati, fosse quella patogena per il ciliegio. A questo scopo è stata progettata una coppia di primers (P2-M49) che amplifica una regione tra il 3' del gene 18S e il 3' dello spaziatore ITS2 (Fig.9 in Materiali e Metodi), dove le varie specie di *Taphrina* hanno differenze di composizione ed è quindi possibile distinguerle tra di loro. Le analisi sono state effettuate sia su alberi sani sia su alberi affetti da CCRS. Un risultato tipico è mostrato in Fig.21.

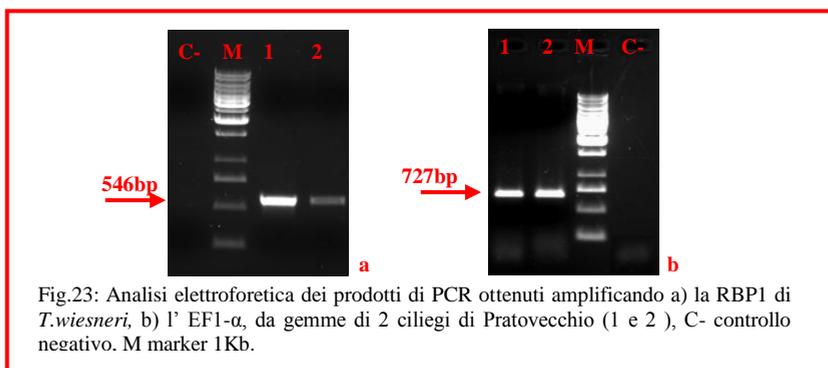


Il frammento della lunghezza attesa, circa 700bp, di ciascun campione è stato clonato per la determinazione della sequenza nucleotidica ed ha mostrato un'identità del 98-99% con l'rDNA di un fungo appartenente alla specie *Taphrina wiesneri* o *T. cerasi* (Fig.22) che è responsabile della malattia delle foglie accartocciate e degli scopazzi nei ciliegi (Ito, 1964; Tubaki, 1978).

| Accession N° | Description | Max score | Query coverage | E value | Max ident. |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|----------------|---------|------------|
| DQ497616 | <i>Taphrina wiesneri</i> isolate AFTOL-ID 265 ITS 1, partial sequence; 5.8S rRNA gene, complete sequence; and ITS 2, partial sequence | 1075 | 88% | 0.0 | 98% |
| AF492127 | <i>Taphrina wiesneri</i> strain HA ITS 1, 5.8S rRNA gene, and ITS 2, complete sequence | 1029 | 83% | 0.0 | 98% |
| AB435029 | <i>Taphrina wiesneri</i> genes for ITS 1, 5.8S rRNA and ITS 2, partial and complete sequence, isolateTw043 | 1024 | 83% | 0.0 | 98% |
| AB435048 | <i>Taphrina wiesneri</i> genes for ITS 1, 5.8S rRNA and ITS 2, partial and complete sequence, isolateTw059 | 1020 | 83% | 0.0 | 98% |

Fig.22: Riproduzione della parte iniziale dell'analisi della sequenza del frammento di 700bp con BLASTn riportata come esempio.

Per un'ulteriore conferma che la specie di *Taphrina* rivelata nel ciliegio sia la *wiesneri* sono state analizzate le sequenze nucleotidiche del gene che codifica per il fattore di allungamento della sintesi proteica (EF1- α) e della subunità 1 della RNA polimerasi II (RBP1). Questi geni, comunemente usati per studi filogenetici, sono stati analizzati in vari campioni di DNA di gemme di alberi sia della Campania sia della Toscana. Come esempio in Fig.23 sono mostrati i prodotti di amplificazione ottenuti da gemme di due ciliegi di Pratovecchio (AR). I frammenti sono stati clonati e l'analisi della sequenza nucleotidica ha confermato l'identificazione genetica del fungo *T. wiesneri*.



In particolare la sequenza della RBP1 (AN: FJ972197 da noi depositata) confrontata con quelle in banca dati mostra il 98% di identità con l'unica sequenza di *T. wiesneri* presente e l'81% di identità con le due di *T. deformans* distinguendo chiaramente tra le due specie di *Taphrina* (risultato di BLASTn in Fig.24).

| Accession N° | Description | Max score | Query coverage | E value | Max ident. |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|----------------|---------|------------|
| DQ471134 | <i>Taphrina wiesneri</i> isolate AFTOL-ID 265 RNA polymerase II subunit 1 (RBP1) gene, partial sequence | 949 | 100% | 0.0 | 98% |
| EF014374 | <i>Taphrina deformans</i> RNA polymerase II largest subunit (RBP1) gene, partial cds | 529 | 99% | 5e-147 | 81% |
| DQ471170 | <i>Taphrina deformans</i> isolate AFTOL-ID 1234 RNA polymerase II subunit 1 (RBP1) gene, partial sequence | 529 | 99% | 5e-147 | 81% |
| DQ471135 | <i>Protomyces inouyei</i> isolate AFTOL-ID 266 RNA polymerase II subunit 1 (RBP1) gene, partial sequence | 190 | 98% | 6e-45 | 68% |

Fig.24: Riproduzione della parte iniziale dell'analisi della sequenza del frammento di 546bp con BLASTn

Un risultato simile si è ottenuto con l'analisi della sequenza del gene EF1- α (AN: FJ975773 altra sequenza da noi depositata).

La costruzione di un albero filogenetico comprendente le sequenze ITS dell'rDNA di *Taphrina* presenti in GeneBank, comprese le due sequenze da noi depositate, hanno fornito un'ulteriore conferma della specie *wiesneri* del fungo da noi studiato. Infatti quelle due sequenze si raggruppano decisamente (bootstrap value 98) con le *Taphrina wiesneri* (Fig.25). Una analisi simile non è stata possibile con i geni codificanti le due proteine studiate perché in banca dati sono presenti solo 3 sequenze dell'RBP1 e 2 sole di EF1- α di funghi del genere *Taphrina*.

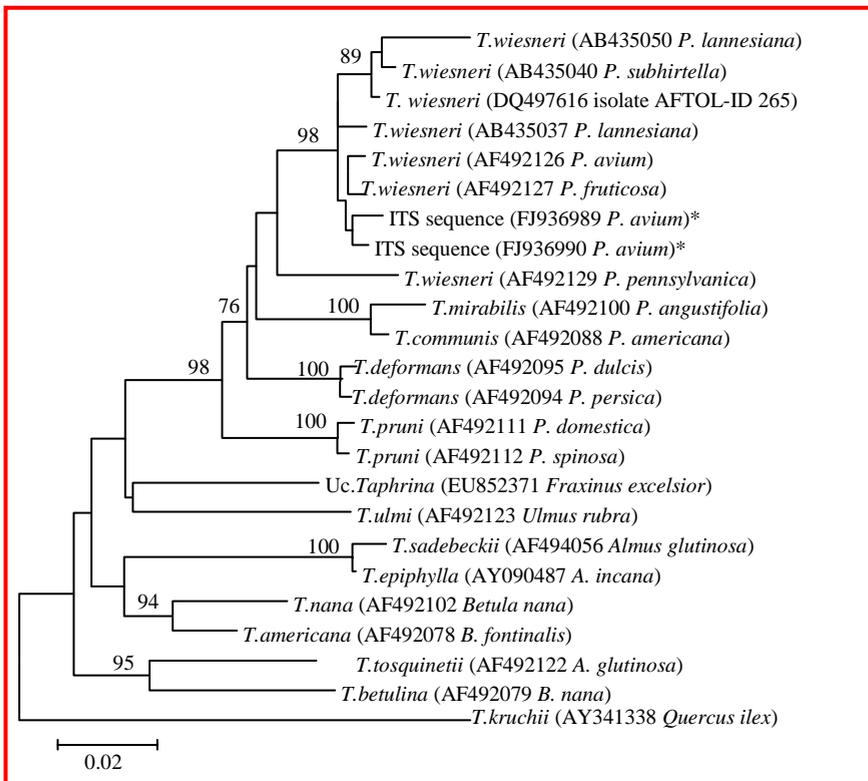


Fig.25: Albero filogenetico senza radice ottenuto mediante l'utilizzo del programma MEGA v. 3.1. Gli asterischi indicano le sequenze depositate in questo lavoro.

3.3.2 Numerosità della presenza di *Taphrina* in gemme di ciliegio

Per definire la numerosità del fungo *Taphrina* nei ciliegi ho determinato il numero di copie di genoma dei due organismi in campioni di DNA preparati da gemme di diversi alberi. In particolare, dallo stesso DNA e utilizzandone la stessa quantità, sono state fatte amplificazioni per PCR usando una coppia di oligo specifici per rDNA di ciliegio (banda attesa 350bp) e la coppia che amplifica una parte dell'18S rDNA di *Taphrina* (banda attesa 252bp). I prodotti delle amplificazioni sono stati analizzati per elettroforesi in corsie adiacenti usando quantità scalari di amplificato. Un esempio di risultato è riportato in Fig.26, si può osservare che l'intensità di fluorescenza della banda ottenuta amplificando un segmento dei geni ribosomali del ciliegio è circa 1/3 di quella prodotta amplificando quelli di *Taphrina*.

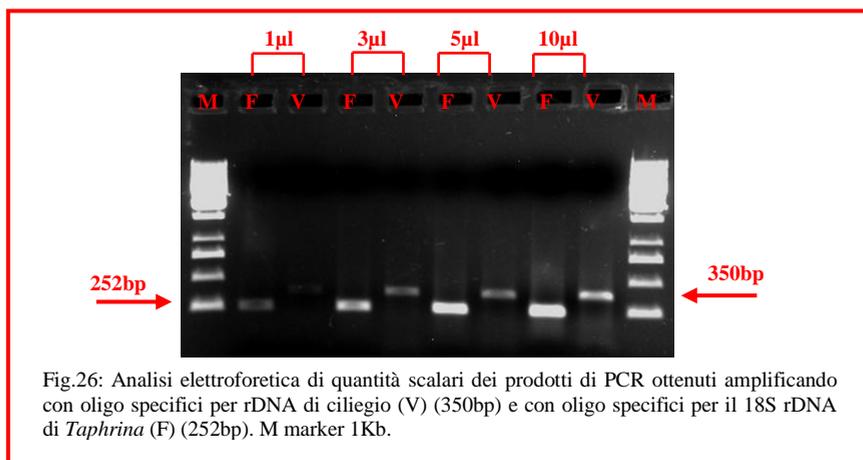


Fig.26: Analisi elettroforetica di quantità scalari dei prodotti di PCR ottenuti amplificando con oligo specifici per rDNA di ciliegio (V) (350bp) e con oligo specifici per il 18S rDNA di *Taphrina* (F) (252bp). M marker 1Kb.

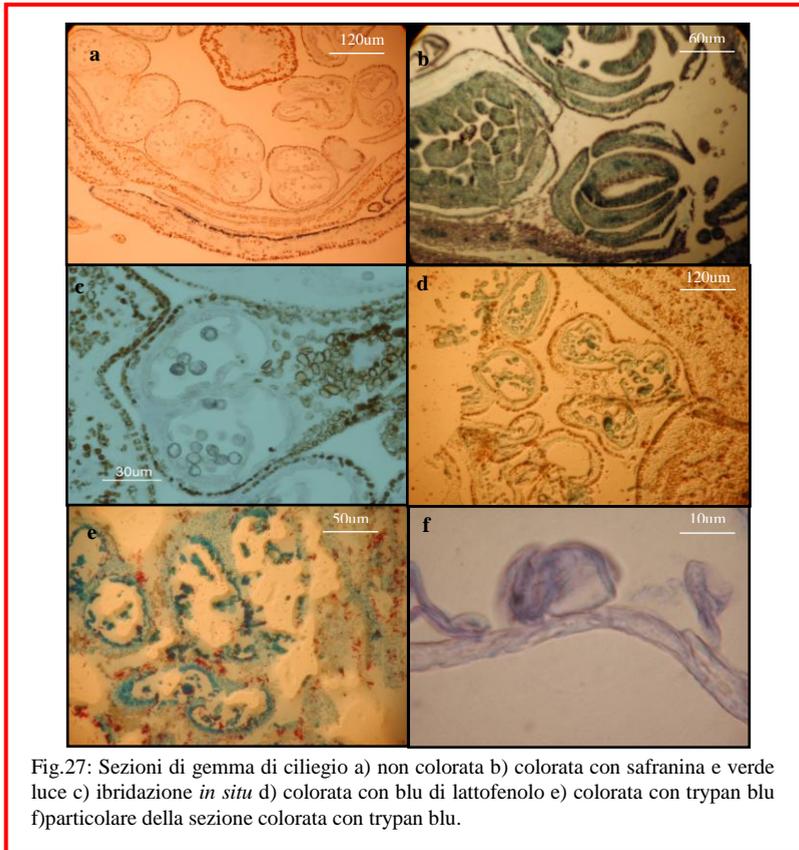
Assumendo in prima approssimazione uno stesso numero di ripetizione dell'unità di trascrizione di rDNA nel fungo e nel ciliegio, e considerando che il genoma di *T. wiesneri* è dell'ordine di 20-40 Mbasi, mentre quello di

ciliegio dolce è noto essere di 338 Mbasi, e trascurando inoltre la differenza di lunghezza tra le due bande paragonate, risulta che il genoma di fungo è presente in un rapporto minimo di circa 1 a 3 con quello del ciliegio.

Se le ripetizioni fossero in numero maggiore nel ciliegio e se si tenesse conto della differenza di fluorescenza delle bande per la loro diversità di lunghezza, il rapporto diventerebbe maggiore. In ogni caso il rapporto tra numero di genomi di fungo e di ciliegio presenti in una gemma difficilmente si può considerare dovuto a presenza occasionale.

3.3.3 Localizzazione del fungo *Taphrina* mediante immunoistochimica

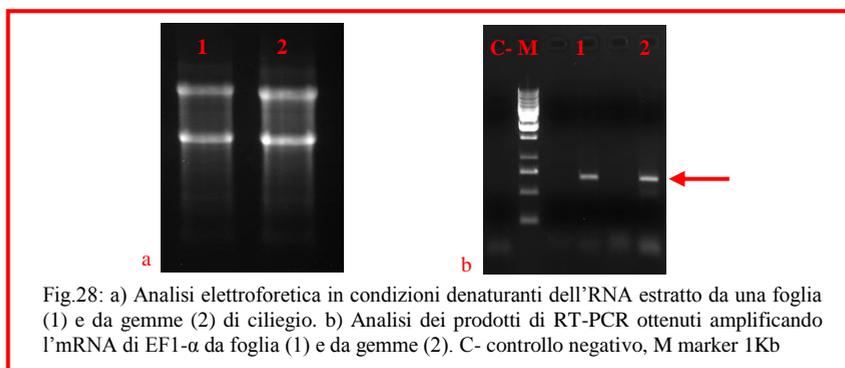
I risultati ottenuti hanno indotto ad analizzare la localizzazione del fungo *Taphrina* nelle gemme di ciliegio. L'analisi è stata fatta mediante ibridazione *in situ* su sezioni sottili di gemme con una sonda specifica per una regione del 18S rDNA di *Taphrina*. Alcune delle sezioni preparate sono state colorate con safranina e verde luce per verificare le buone condizioni dei tessuti (Fig.27b). Sezione seriali a quelle colorate con safranina e verde luce sono state trattate con una sonda specifica per 18S rDNA di *Taphrina* prodotta con i primer P3-M7, marcata con digossigenina durante l'amplificazione e rivelata con reazione colorimetrica (Fig.27c). Le strutture marcate sono piccole aree circolari che potrebbero corrispondere a sezioni trasversali di ife di fungo. Questa possibilità è stata confermata per colorazione delle sezioni successive con blu di lattofenolo (Fig.27d), usato per rivelare funghi e con il colorante trypan blu (Fig.27e), che interagisce con le chitine presenti nella capsula di funghi e non presente nelle cellule vegetali. Anche queste colorazioni hanno rivelato strutture circolari simili a quelle marcate dalla ibridazione con la sonda per ITS rDNA di *Taphrina*.



L'insieme dei risultati ottenuti ha portato a ipotizzare che il fungo *Taphrina wiesneri* abbia stabilito uno stato di endofitismo con il ciliegio. I casi finora riportati di endofitismo riguardano solo piante erbacee e piante grasse e questo caso costituirebbe il primo esempio per alberi, particolarmente da frutto.

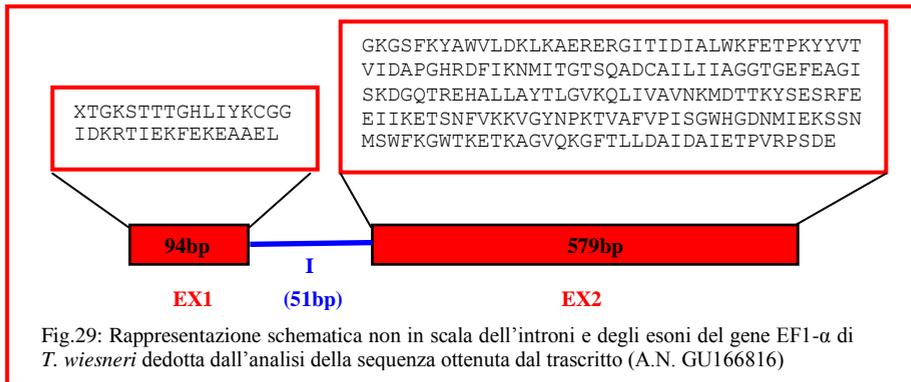
3.3.4 Studi di RT-PCR da *Prunus avium* per la rivelazione di trascritti di *T.wiesneri*

A sostegno dell'ipotesi che il fungo *T.wiesneri* sia un endofita del ciliegio ho cercato di rivelarne l'attività mediante selettivo isolamento dei suoi mRNA scelti tra quelli codificanti per proteine coinvolte nella sintesi proteica. In particolare, ho effettuato estrazioni di RNA totali da campioni di foglie e di gemme di ciliegi sani (Fig.28a) con successive RT-PCR per amplificare il cDNA dell' EF1- α fungino utilizzando gli stessi oligo che me ne hanno consentito l'identificazione del gene da DNA estratto da foglie e gemme di ciliegi. L'analisi elettroforetica (Fig.28b) ha rivelato che i prodotti ottenuti dagli esperimenti di RT-PCR, corrispondenti ad mRNA, hanno lunghezza di poco inferiore di quelli ottenuti dagli esperimenti di PCR sul DNA che hanno portato all'identificazione di una sequenza genica identica al 98% con quella di EF1- α di *T. wiesneri* presente in banca dati.



I prodotti di RT-PCR ottenuti sono stati clonati e la sequenza nucleotidica determinata è stata depositata in banca dati (A.N. GU166816). Il confronto delle sequenze ottenute, di 673bp, ha mostrato massima identità con la

sequenza non annotata per il gene EF1- α del fungo *T.wiesneri* che presenta un tratto di sequenza aggiuntivo interno di 51bp, con caratteristiche di un introne delimitato dai siti consenso di splicing, come rappresentato schematicamente in Fig.29.



L'analisi bioinformatica ha anche rivelato che il cDNA sequenziato presenta un'unica ORF ininterrotta codificante per 226 aa. Questo risultato dimostra che negli RNA totali estratti da foglie e gemme di ciliegi sani sono presenti numerose copie di mRNA maturi, codificanti per proteine coinvolte nella sintesi proteica, della stessa specie fungina *Taphrina wiesneri* identificata geneticamente in questo lavoro di tesi. Questo risultato, successivo alla sottomissione del manoscritto (Carrieri R. et al., 2009) in cui sono riportate le evidenze della presenza non occasionale del genoma di *T.wiesneri* in diversi tessuti di ciliegi sani e affetti da CCRS, indica che il fungo non si trova in uno stato quiescente nella pianta e può essere considerato una prova a sostegno del possibile endofitismo tra il fungo *T.wiesneri* e il ciliegio.

4 Conclusioni

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi hanno confermato che il micovirus del genere *Chrysovirus* è presente geneticamente nelle foglie di ciliegio affette da CCRS. Inoltre, avendo messo a punto un protocollo che mi ha consentito di rivelare i componenti genomici (4 dsRNA) del micovirus *Chrysovirus* da 200mg di foglia, sono riuscita a localizzarlo esattamente su una singola area di foglia sintomatica escludendo la presenza nelle aree sane circostanti e nei fasci vascolari. Questo dato indica che la morte del ciliegio, dopo varie infezioni, non dipende da una propagazione sistemica. Il micovirus è rivelato ad alto titolo in frammenti di foglia in cui i sintomi della malattia sono molto precoci, indicando che la sua riproduzione è parte di un passo iniziale della CCRS e pertanto la sua presenza può essere un marker dell'insorgenza della patologia. Per una più completa identificazione, il micovirus è stato rivelato anche mediante immunorivelazione della proteina capsidica (non più putativa) da estratti proteici di foglie malate mediante l'uso di anticorpi policlonali specifici per epitopi della proteina capsidica prodotti con due strategie in coniglio. Prima di questi risultati la presenza del *Chrysovirus* era stata accertata solo sulla base del suo riconoscimento genetico per RT-PCR (Di Serio et al. 1996) senza avere nessuna evidenza della completezza del micovirus e della sua localizzazione. Dai risultati ottenuti si evince che il *Chrysovirus* è strettamente associato alla malattia delle macchie clorotico rugginose del ciliegio ed essendo presente non solo come genoma deve essere necessariamente presente un fungo che lo ospiti confermando così l'ipotesi iniziale che un fungo è coinvolto nella patologia CCRS.

Un fungo potenzialmente responsabile della malattia non è stato ancora né isolato su piastra né identificato geneticamente. I risultati ottenuti in questo lavoro mostrano evidenze molecolari della inaspettata presenza del fungo ascomicete dimorfico *Taphrina wiesneri*, noto patogeno del ciliegio (Mix, 1949) in foglie, gemme e, sorprendentemente, anche in strutture embrionali di gemme chiuse di tutti i ciliegi dolci analizzati sia affetti da CCRS sia sani che non hanno mostrato, nel corso dei tre anni di indagini, sintomi di alcuna malattia. Il fungo *T. wiesneri* identificato mediante analisi dell'rDNA e di due geni codificanti proteine quali EF1- α e RBP1, è risultato invariabilmente presente in tutte le gemme di ciliegi di diverse località di due regioni italiane. Non è stato possibile trovare un solo albero di ciliegio che non abbia mostrato la presenza di tale fungo. In letteratura sono riportati casi in cui la presenza genomica del fungo *T. deformans* è un'indicazione che la pianta sta per manifestare la malattia delle foglie accartocciate (Tavares et al.,2004) cioè che i due eventi, il ritrovamento del fungo e la malattia, sono strettamente correlati. Nel caso del ciliegio, invece, come dimostrato dalle mie ricerche, la presenza del fungo non è associabile a malattia. La presenza della *Taphrina* svernante sulle gemme di ciliegio, è ben conosciuta. Ma la sua presenza nelle teche polliniche, rivelata per genoma e per localizzazione in sezioni di gemme, è un fatto assolutamente nuovo.

Anche l'analisi comparativa del numero di genomi del fungo rispetto ai genomi di ciliegio in campioni di DNA estratti da gemme di diversi alberi è risultato minimo di 1 a 3, dimostrando che la presenza del fungo non può considerarsi occasionale.

Sulla base dei risultati ottenuti sembra che il fungo dimorfico *T. wiesneri* possa aver stabilito una relazione di endofitismo con il ciliegio probabilmente mediante il processo noto come “ipotesi del Miglioramento” secondo il quale gli effetti nocivi causati da un fungo patogeno si attenuano nel tempo fino al momento in cui l’ospite trae beneficio dall’essere infettato (Boucher et al.1982) e il fungo diventa un ospite innocuo. E’ infatti possibile che l’endofitismo che si è stabilito sia un vantaggio per il ciliegio considerando che la *Taphrina* produce citochinine, di vantaggio per la pianta (Johnston and Trione, 1974)

L’isolamento del mRNA codificante per un gene della sintesi proteica (EF1- α) dimostra la vitalità del fungo presente nelle strutture del ciliegio fornendo una ulteriore evidenza di un possibile endofitismo tra il fungo e il ciliegio che costituirebbe il primo caso di endofitismo in piante da frutto.

I risultati ottenuti portano ad escludere che il fungo *T. wiesneri* possa essere il patogeno responsabile della CCRS, quando infettato da micovirus. Infatti questo tipo di virus non è esportabile come tale, deve essere contenuto in un fungo ospite ed è difficile da propagare da un fungo portatore ad un altro. Queste caratteristiche sono state dimostrate in diversi esperimenti anche per propagare un micovirus da un fungo ad un altro (Màrquez et al., 2007). Sono necessarie altre indagini per identificare il fungo responsabile della CCRS.

Bibliografia

Açikgöz, S., Doken, M. T., Citir, A. and Bostan, H., 1994. The analysis of double-stranded (ds) RNA for the diagnosis of the causal agent of Amasya cherry disease in Turkey. EMBO-INRA Workshop Plant and Viruses: Partners in Pathogenicity, Grignon, abstract 36.

Adachi M., Sako Y. and Ishida Y., 1994. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S region in Japanese *Alexandrium* species (*Dinophyceae*). *J Phycol.* 30: 857-863.

Alioto, D., Zaccaria, F., Covelli, L., Di Serio, F., Ragozzino, A. and Milne, R. G., 2003. Light and electron microscope observations on chlorotic rusty spot, a disorder of cherry in Italy. *J. Plant Pathol.* 5, 215-218.

Anagnostakis, S. L., Chen, B., Geletka, L. M. and Nuss, D. L., 1998. Hypovirus transmission to ascospore progeny by field-released transgenic hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathol.* 88, 598-604.

Anagnostakis, S. L., 1982. Biological control of chestnut blight. *Science* 215, 466-471.

Arnold A. E., Mejía L. C., Kyollo D., Rojas E. I., Maynard Z., Robbins N. and Herre E. I., 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 15649-54.

Balakirev, M. Y., Tcherniuk, S. O., Jaquinod, M. and Chroboczek, J., 2003. Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO Rep.* 4(5), 517-522.

Barrow J. R. , 2003. Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza* 13: 239-247.

Blodgett, E.C., Ismen, F.H., Gomec, B., Kalay, K., Altynyai, N. and Wagon, H.K., 1970. La maladie d'Amasya du cerisier en Turquie. *FAO Plant Prot Bull* 18, 49-52.

Bruening, G.,1989. Compilation of self-cleaving sequences from plant virus satellite RNAs and other sources. *Methods Enzymol.* 180, 546-558.

Carrieri R.* , D'Elia* I., Geraci G., Alioto D., Ragozzino A. and del Gaudio R. Molecular evidence of *Taphrina wiesneri* in leaves and buds of healthy sweet cherry (*prunus avium*). A possible endophytism? *J.of Plant pathology* 2009 accepted for publication

Choi, G. H. and Nuss D. L.,1992. A viral gene confers hypovirulence-associated traits to the chestnut blight fungus. *EMBO J.* 11, 473-477.

Citir, A., 1987. Preliminary investigations about identity of the causal agent of Amasya cherry disease in Turkey. *J Turk Phytopathol* 16, 23-34.

Coutts, R. H. A., Covelli, L., Di Serio, F., Citir, A., Açikgöz, S., Hernández, C., Ragozzino, A. and Flores, R.,2004. Cherry chlorotic rusty spot and Amasya cherry diseases are associated with a complex pattern of mycoviral-like double-stranded RNAs. II. Characterization of a new species in the genus *Partitivirus*. *J. Gen. Virol.* 85, 3399-3403.

Covelli, L., Coutts, R. H. A., Di Serio, F., Citir, A., Açikgöz, S., Hernández, C., Ragozzino, A. and Flores, R., 2004. Cherry chlorotic rusty spot and Amasya cherry diseases are associated with a complex pattern of mycoviral-like double-stranded RNAs. I. Characterization of a new species in the genus *Chrysovirus*. *J. Gen. Virol.* 85, 3389-3397.

Deforest Heald F., 1933. *Manual of Plant Disease*, p. 517. McGraw-Hill Book Co. Inc.

Di Serio, F., Daròs, J. A., Ragozzino, A. and Flores, R.,1997 A 451-nt circular RNA from cherry with hammerhead ribozymes in its strand of both polarities. *J. Virol.* 71, 6603-6610.

Di Serio, F., Flores, R. and Ragozzino, A., 1996. Cherry chlorotic rusty spot: description of a virus-like disease from cherry and studies on its aetiological agent. *Plant Dis* 80, 1203-120.

Di Serio, F., Flores, R. and Ragozzino, A.,1996. Cherry chlorotic rusty spot: description of a virus-like disease from cherry and studies on its aetiological agent. *Plant Dis* 80, 1203-1206.

Forster, A. C. and Symons, R. H.,1987. Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virus and a structural model for the active sites. *Cell* 49, 211-220.

Ghabrial, S. A., Soldevila, A. I. and Havens, W. M., 2002. Molecular genetics of the viruses infecting the plant pathogenic fungus *Helminthosporium victoriae*. *dsRNA Genetic Elements: Concepts and Applications in Agriculture, Forestry and Medicine*, Tavantzis, S. M. (Ed.), CRC Press, Boca Raton 213-236.

Ghabrial, S. A.,1998. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes* 16, 119-131.

Goidanich, G., 1964. *Manuale di Patologia Vegetale*. Edizioni Agricole Bologna.

Hillman, B. I., Supyani, S., Kondo, H. and Suzuki, N., 2004. A Reovirus of the fungus *Cryphonectria parasitica* that is infectious as particles and related to the Coltivirus genus of animal pathogen. *J. Virol.* 78, 892-898.

Hollings, M., 1962. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature* 196, 962-965.

Hong, Y., Cole, T. E., Brasier, C. M. and Buck, K. W., 1998. Evolutionary relationships among putative RNA-dependent RNA polymerase encoded by a mitochondrial virus-like RNA in the Dutch elm disease fungus, *Ophiostoma novo-ulmi*, by other viruses and virus-like RNAs and by the *Arabidopsis* mitochondrial genome. *Virology* 246, 158-169.

Johnston J. C. and Trione E. J., 1974. Cytokinin production by the fungi 280 *T. cerasi* and *T. deformans*. *Can. J. Botany* 52: 1583-88.

Kolaskar A.S., Tongaonkar, 1990. P.C.A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens *FEBS Letters*, 276 (1-2), 172-174.

Kumar S., Tamura K. and Nei M., 2004. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150-163.

Márquez L. M., Redman R. S., Rodriguez R. J. and Roossinck M. J., 2007. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315 no. 5811: 513-515.

Miller, W. A., Hercus, T., Waterhouse, T. M. and Gerlach, W. L. 1991. A satellite RNA of barley yellow dwarf virus contains a novel hammerhead structure in self-cleavage domain. *Virology* 183, 711-720.

Mix A. J., 1949. A monograph of the genus *Taphrina*. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 33: 1-167. [Reprinted: 1969, Bibliotheca mycological, Vol. 18. Cramer, Vaduz.]

Pearson MN, Beever RE, Boine B, Arthur K., 2009. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Mol Plant Pathol.* Jan;10(1):115-28. Review.

Rodrigues M. G. and Fonseca Á., 2003. Molecular systematics of the dimorphic ascomycete genus *Taphrina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 607-616.

Sasaki A., Kanematsu, S., Onoue, M., Oyama, Y. and Yoshida, K. 2006. Infection of *Rosellina necatrix* with purified viral particles of a member of Partitiviridae (RnPV1-W8). *Arch. Virol.* 151, 697-707.

Schmitz H., 1916. Some observations on witches' brooms of cherries. *The Plant World* 19: 239-242.

Smit E., Leeflang P., Glandorf B., van Elsas J. D. and Wernars K., 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Env. Microbiol.* 65 (6): 2614-2621.

Spatafora J. W., Sung G. H., Johnson D. et al., 2006. A five-gene phylogeny of *Pezizomycotina*. *Mycologia* 98(6): 1018-1028.

Tavares S., Inácio J., Fonseca Á. and Oliveira C., 2004. Direct detection of *Taphrina deformans* on peach trees using molecular methods. Eur. J. Plant Pathol. 110: 973-982.

Wang W., Vignai R., Scali M., Cresti M., 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissue for proteomic analysis. Electrophoresis 27, 2782–2786

Yamada T., Tsukamoto H., Shiraishi T., Kawamata S. and Oku H., 1990. Changes in indoleacetic acid production and chromosome length polymorphism in clofibric acid resistant mutants of *Taphrina wiesneri* and *Taphrina deformans*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 56: 651-657.

Yamamoto A., Matsuda Y. and Ito S., 2008. Molecular characterization of *Taphrina wiesneri* based on internal transcribed spacer region. Unpublished.

Zhang, R., Dickinson, M. J. and Pryor, A., 1994. Double-strand RNAs in the Rust fungi. Ann. Rev. Phytopathol. 32, 115-133.

Title page

MOLECULAR EVIDENCE OF *TAPHRINA WIESNERI* IN LEAVES AND BUDS OF HEALTHY SWEET CHERRY (*PRUNUS AVIUM*). A POSSIBLE ENDOPHYTISM?

Authors: R. Carrieri^{1*}, I. D'Elia^{2*}, G. Geraci², D. Alioto¹, A. Ragozzino¹ and R. del Gaudio²

Affiliations: ¹*Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia vegetale, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Università 100, 80055 Portici (Na), Italia*

²*Dipartimento di Scienze biologiche, Sezione di Genetica e Biologia Molecolare, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Mezzocannone, 8, 80134 Napoli, Italia*

Running title: *T. wiesneri* in *P. avium*

Corresponding author: A. Ragozzino;

FAX number: 390812539367

e-mail address: antonio.ragozzino@unina.it

*** Authors contributing equally to this work.**

SUMMARY

Analyses performed on DNAs prepared from leaves and buds of several *Prunus avium* trees growing in two different Italian regions, at different climates, have revealed the presence of *Taphrina wiesneri*, in all analyzed samples. Indeed, the presence of other fungi was only occasional. The genetic presence of *T. wiesneri*, in the DNA samples, was revealed by sequence analyses of segments of rDNA genes amplified by PCR. Similar analyses, on genes coding for the elongation factor-1 α (EF1- α) and RNA-polimerase II subunit 1 (RPB1), confirmed *T. wiesneri* occurrence. The *Taphrina wiesneri* sequences were variants of those reported in data bases. However, *Taphrina wiesneri* was not genetically detectable in buds of walnut, apricot and sour cherry growing close to the analysed sweet cherry trees. Determination of the relative numbers of *T. wiesneri* and sweet cherry genomes in the DNA samples prepared from the same buds of 4 different trees produced comparable values indicating a massive presence of the fungus. However, *in situ* hybridization experiments on bud sections using a *T. wiesneri* specific 18S rDNA probe and stains for fungi labelled structures not clearly representing hyphae.

Key words: stone fruits, PCR, EF1 α , rRNA genes, RPB1

INTRODUCTION

A molecular study performed to characterize the fungal population related to cherry chlorotic rusty spot (CCRS), a disease whose aetiological agent was supposed to be a fungus since constantly associated to mycelium-like structures (Alioto *et al.*, 2003) and mycoviruses (Di Serio *et al.*, 1996, 1997; Covelli *et al.*, 2004; Coutts *et al.*, 2004; Kozlakidis *et al.*, 2006), unexpectedly revealed the presence of *Taphrina wiesneri* in asymptomatic and CCRS-symptomatic cherry trees.

Taphrina wiesneri (synonym *T. cerasi*) is the causal agent of witches' broom and leaf curl on cherry and apricot trees and is found in practically all regions where these trees are grown. The fungus is transmitted by blastosporic conidia or ascospores from infected tissues, and overwinters on bud scales and in infected wood (Mix, 1949). As other fungi belonging to order *Taphrinales*, this pathogen is a dimorphic plant parasite forming mycelium and asci in its parasitic phase and budding yeast cells in its saprotrophic phase with no ascomata (ascomycetous fruiting bodies) (Kramer 1973, 1987).

Here, we report results about the genetic presence of *T. wiesneri* in leaves and in the inner structures of buds of all the analysed sweet cherry trees, independently from disease symptoms, geographical areas and altitude. Particularly, *Taphrina* and cherry tree genomes are found in comparable numbers in bud DNAs. In addition, labelling bud sections with a *Taphrina*-specific probe reveals non random dots similar to hyphae cross sections.

The invariable and numerous presence of *T. wiesneri* in inner structures of all sweet cherries, none showing *T. wiesneri* symptoms over the investigated period of 3 years, has suggested the occurrence of a possible endophytism.

MATERIALS AND METHODS

Origin of samples and DNA extraction. DNA from leaves and buds of Italian sweet cherry trees located in several areas of Campania and Tuscany regions was extracted as reported (Caputo *et al.*, 1991). Specifically, in Campania: 4 CCRS affected trees were from Ariano Irpino (AV) (altitude of 700mt); 4 apparently healthy trees growing at sea level,

were from Portici (NA) (buds from 1 new yearly graft, too), Sessa Aurunca (CE), Procida (NA) and Naples. In Tuscany: 4 apparently healthy trees were from Pratovecchio (400mt altitude), 2 trees from Lonnano (700mt altitude) and 1 tree from Prato alle Cogne (1054mt altitude), all in the province of Arezzo (AR), 1 tree was from Scandicci (FI), at sea level. The trees from Pratovecchio (AR), Ariano Irpino (AV) and Portici (NA) were analysed systematically over a period of 3 years. The other trees were analysed occasionally with the main intent to find a sweet cherry tree without the genetic presence of *Taphrina*. DNA samples from buds of a walnut, apricot and sour cherry tree (*Prunus cerasus*), located in the areas of analyzed *Prunus avium* trees, were used as negative controls. In particular, walnut was from Pratovecchio (AR), apricot and sour cherry from Ariano Irpino (AV).

Polymerase chain reaction and sequence analysis. Primers EF4 - EF3 (Smit *et al.*, 1999), were used to amplify the region of 1600bp typical of all fungal rDNA 18S genes. Primers P3 (5' - GGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGC - 3') and M7 (5' - GGTCACCAAGGCCAAGGTTTCAGC - 3'), designed on *T. wiesneri* 18S rDNA sequence accession number AY548293, were used to amplify a 252bp 18S rDNA segment to detect *Taphrina* 18S rDNA gene in sweet cherry tree analyses and, particularly, to be used as a specific probe in *in situ* hybridization experiments on bud sections. Primer P2 (5' - GATTGTCGTTGGGCTGCTGG - 3') was designed on *T. wiesneri* rDNA sequence accession number AY548293 and primer M49 (5' - CGCGTATTCCTACCTGATCTGAG - 3') on *T. wiesneri* rDNA sequence accession number AB435051, to amplify a region encompassing both ITS1 and ITS2 spacers to distinguish *Taphrina* species and variants (Marongiu *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2008). The primers for gene coding for RNA polymerase II subunit 1 (RPB1), RPB-F (5' - AGGTAGATGCAAATGACCC - 3') and RPB-R (5' - CCGGCTCATGTTATCAAGG - 3'), and for the elongation factor-1 α (EF1- α), EF1-F (5' - CGGAAAGTCAACCACTACCG - 3') and EF1-R (5' - CAGTCCGACCATCAGACGAGC - 3'), of *T. wiesneri* were designed on GenBank sequences with accession numbers, respectively: DQ471134 and DQ479936. Incubation mixtures for PCR amplifications contained 50ng of DNA, 1.5mM MgCl₂, 200 μ M each dNTP, 400nM forward and reverse primers and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Sigma-Aldrich, USA). All reagents were combined and maintained at 95°C for 3 min. Thirty-five cycles of PCR were performed using primers EF4 and EF3, by heating at 95°C for 30 sec, 48°C for 30 sec, and 72°C for 1 min, followed by final period at 72°C for 10 min. Other primers were amplified in the same conditions except that annealing temperatures were 66°C for primers P3 - M7, 65°C for P2 - M49, 62°C for primers EF1-forw/EF1-rev, and 57°C for RPB1-forw/RPB1-rev.

PCR products, of the expected lengths, were isolated by electrophoretic separations on agarose gels and purified from the excised bands using NucleoSpin® Extract kit (Macherey-Nagel, Germany). The purified PCR products were ligated in pDRIVE vectors (Qiagen, USA), used to transform competent TG1 cells and plated on agar LB in the presence of 100 μ g/ml Ampicillin. Transformed bacterial colonies were identified by Blue/White selection. The inserts of at least 5 positive clones for each experiment were sequenced (BMR Genomics, Padova, Italy or MWG Biotech, Bochum, Germany) and analyzed using BLASTn program with default parameters (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Phylogenetic analysis was performed using program MEGA v. 3.1 (Kumar *et al.*, 2004), Neighbour-Joining method, and the validity of the branches was evaluated by performing bootstrap analysis (1.000 replicas). The relative numbers of genomes of

Taphrina and of sweet cherry in the same DNA samples isolated from buds of 4 different cherry trees were evaluated comparing the relative fluorescence intensities of rDNA fragments produced by PCR amplifications. Primers for fungal DNA were P3 – M7 that amplify a 252nt 18S rDNA segment. Primers for cherry tree DNA were ITSa – ITSb (Adachi *et al.*, 1994) that amplify a 350nt segment spanning from the 3' region of 18S to 3' region of 5.8S rDNA of sweet cherry.

***In situ* hybridization.** To study fungal localization cherry bud sections were prepared using a standard procedure. In brief, buds were split into halves, fixed in 10% formaldehyde for 3 days at room temperature, washed in 0.1M phosphate buffer pH 7.0, dehydrated in ethanol solutions at increasing concentrations (from 30 to 100%), incubated in xylene, embedded in paraffin at 57 - 59°C and finally sectioned (section thickness 7µm). Bud sections for *in situ* hybridization experiments were treated with the probe of 252bp, specific for 18S rDNA gene of *Taphrina* genus, prepared by PCR amplification with primers P3 - M7 in the presence of digoxigenin-11-dUTP (Roche, Switzerland) as a label, in a ratio of 5% DIG-11-dUTP and 95% dTTP as reported (De Rienzo *et al.*, 2001). In brief, sections hybridized with the digoxigenin labelled probe were treated with anti-digoxigenin antibodies conjugated to alkaline phosphatase (Roche, Switzerland) and revealed with BM-purple substrate (Roche, Switzerland). Sections were stained with Trypan-blue and Sudan III to reveal fungi, as reported (Barrow, 2003) and Lactophenol-blue was used according to the manufacturer instructions (Sigma-Aldrich, USA).

RESULTS

Identification of *T. wiesneri*. All samples of DNAs extracted from leaves and buds of cherry trees located in different areas at different altitudes and climatic conditions showed the presence of rDNA genes of *Taphrina* genus. These findings were the results of several experiments in which the DNA fragments obtained by PCR amplification using primers EF4 – EF3, generic for 18S rDNA of fungi, were cloned and sequenced. In each experiment about 40 to 60% of the isolated clones invariably showed sequences corresponding to genus *Taphrina* as revealed by BLASTn analyses (data not shown). Moreover, among the sequences producing significant alignments, the species *Taphrina wiesneri* was present among those with the best score (data not shown). In addition, the sequences of the other clones produced alignments to different fungal genera not detected in the DNAs of all analyzed cherry trees (data not shown). These results were obtained for all analysed cherry trees, independently from CCRS symptoms, geographical areas and altitude. As a negative control of *Taphrina* rDNA presence, bud DNAs of a sour cherry and an apricot tree in Ariano Irpino (AV) and of a walnut tree in Pratovecchio growing in close proximity of the analyzed sweet cherry trees (see Methods), were used. *Taphrina* rDNA was never detected in 10 different clones amplified from the bud DNA of each of those tree. This indicates that the finding of *Taphrina* in all analyzed *P. avium* trees does not depend on a particular environmental presence of this fungus.

To molecularly identify *Taphrina* species, DNA was amplified with PCR primers P2 – M49 encompassing ITS regions of rDNA genes in 100 clones derived from 10 different trees. BLASTn sequence analyses of individual clones reveal the presence of *T. wiesneri* in all these specimens. Table I shows the accession numbers of the two sequences that have been deposited in Genbank, representing the 2 major variant sequences showing an identity to

each other of 99% isolated from the DNAs of the 9 cherry trees studied for a period of 3 years (see Methods). The other analyzed *T. wiesneri* sequences differ in few nucleotide positions in the ITS regions from the deposited ones (data not shown). This is in line with the findings of Rodrigues and Fonseca (2003) who demonstrated intraspecific ITS sequence polymorphisms that correlated with host species. The two deposited sequences (Table I), were used to construct an unrooted phylogenetic tree with bootstrap values (Figure 1). The 2 sequences cluster with *Taphrina wiesneri* group with a bootstrap value of 98, in line with BLASTn results.

To analyze tissues less exposed to external contamination, the presence of *Taphrina* was investigated also in dissected embryonic gamete structures of buds collected in the months of December, May and October from 4 different trees: 1 tree from Portici (NA), 2 from Pratovecchio (AR) and 1 from Ariano Irpino (AV). PCR amplifications were performed using primers P3 – M7 designed by us to specifically identify *Taphrina* genus: BLASTn analyses of the sequences of the amplified products confirmed specificity of the primers because only 18S rRNA genes of *Taphrina* genus were found in the analyzed clones of each cherry tree.

The presence of *T. wiesneri* genome was searched also by analysing the sequences of genes coding for RNA polymerase II subunit 1 (RPB1) and for the elongation factor-1 α (EF1- α) proteins, used for fungal phylogeny (Spatafora *et al.*, 2006). Genes were amplified on bud DNAs of 2 sweet cherry trees, one from Portici (NA) and one from Prato alle Cogne (AR). The results of the sequence determinations on the 5 clones of PCR products show the presence of a single variant of the two genes coding for proteins. BLASTn analysis on EF1- α gene sequence shows 98% identity with the only *T. wiesneri* and 97% with the only *T. deformans* sequences present in data bases. Similar analysis on RPB1 gene sequence shows 98% identity with the only *T. wiesneri* and 81% identity with the 2 *T. deformans* sequences present in data bases. This adds evidence to the identification of *T. wiesneri* in DNA of *Prunus avium*.

Determination of *Taphrina* gene copy number and immunodetection. The relative numbers of *Taphrina* and sweet cherry genomes in the DNA extracted from cherry tree buds were calculated using a value of $2 - 4 \times 10^7$ for *Taphrina* genome size and of 3.38×10^8 for the genome of cherry tree (Arumuganathan and Earle, 1991). Values calculated from fluorescence intensities corresponding to different loading quantities of amplified DNA fragments (Figure 2) result in a minimal value of about 0.3 fungal genome per cherry tree genome, assuming a similar number of rDNA repetitions in both organisms. In fact, if the cherry tree would contain a larger number of repetitions of rDNA transcriptional units, the number of calculated fungal genomes would increase.

In situ hybridization experiments were carried out on transversal sections of cherry tree buds, using a digoxigenin labelled probe specific for 18S rDNA of *Taphrina*. This probe, revealed by enzymatic immunoassay, decorates series of dots that, although not clearly typical of fungi, might correspond to serial cross sections of hyphae (Figure 3 panel b). The unstained bud sections of figure 3 panel a, and the Saphranine and Light-green stained section of panel c, show that bud structures are well preserved. In panels d and e of adjacent serial sections stained, respectively, with Lactophenol-blue and with Trypan-blue, provide similar results. A detail of a structure stained with Trypan-blue is shown in panel f.

DISCUSSION

The results of the researches presented here show the molecular evidence of *T. wiesneri* in leaves, micro and mega-sporophylls inside closed buds, of sweet cherry trees free of leaf-curl or witches broom or affected by CCRS. Repetitive washings and sterilization aiming at removing organisms contaminating externally the leaf (Cardinali *et al.*, 1994) did not substantially change the results. The fungus *T. wiesneri* was invariably found to be genetically present in all tissues, also the inner gametal structures of buds, as demonstrated by the positive amplification of fragments both of rDNA and of two genes coding for protein. Our search of a cherry tree not carrier of *T. wiesneri* in Campania and Tuscany failed. This is a difference with the molecular detection of *T. deformans* in washings of some asymptomatic peach trees buds, before the appearance of leaf curl symptoms (Tavares *et al.*, 2004). The comparative analyses of the number of *T. wiesneri* and of sweet cherry tree genomes in the same DNA samples extracted from buds of different trees (Figure 2), provide values indicating that the fungus is not an occasional presence since a minimum number of about 0.3 *T. wiesneri* genomes per sweet cherry tree genome resulted in different experiments. This ratio, calculated assuming a similar number of repetitions of rDNA genes in the fungus and in the plant, is increased if the plant genome has a higher number of repetitions of rDNA genes. Surprisingly, a series of experiments of *in situ* hybridization, using a rDNA probe specific for *Taphrina*, labelled structures not clearly typical of fungi on asymptomatic sweet cherry tree bud sections. Similar results were observed using stains generally used to detect fungi (Figure 3). On the other hand, details of the morphology of Trypan-blue stained structures shown in figure 3, panel f, are intriguing for their clear interaction with a stain specific for chitin (Barrow, 2003). This poses a question concerning the occurrence of possible adaptive modifications of the fungal structures mainly due to the fact that all analysed trees, in all habitats, showed no particular sign of *Taphrina* infection (leaf curl or witches' broom) (Schmitz, 1916; Deforest, 1933; Mix, 1949). Moreover, some of the cherry trees analysed in Florence and Arezzo provinces, were chosen in areas where no fungicide treatment was applied during the investigation period.

Symptoms caused by *T. wiesneri* are described in all textbooks of Plant Pathology not so much for their relevance as for the peculiarities of their symptoms. In Campania (Southern Italy) the disease was rarely observed and only on old and declining trees, often residual of previously existing orchards. While that disease may be considered now of no economical importance, the data reported here demonstrate that *T. wiesneri* is normally present not only in leaves, but also in structures internal to cherry buds suggesting that this fungus might be normally innocuous becoming a pathogen in particular conditions (Ogawa and English, 1991). The finding that the same analytical procedure, based on PCR amplification, cloning of DNA fragments and sequence analysis of 10 individual clones, revealed no *T. wiesneri* in the buds of control trees (walnut, apricot and sour cherry), suggests that *T. wiesneri* is not an occasional contaminant. All together, the results here reported indicate the possibility that *T. wiesneri* might have established an endophyte-type of relation with the cherry tree. This would be a peculiarity because several plant species have been reported to harbour endophytes (Redman *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2003, Márquez *et al.*, 2007) but none so far concerning fruit trees. In the hypothesis of a possible endophytism, it is interesting that *T. wiesneri* has been reported to produce cytokinin (Johnston and Trione, 1974, Kern and Naef-Roth, 1975, Yamada *et al.*, 1990, Matsuyama and Misawa, 1966) that might play a role in a mutual relationship.

As a final consideration, it should be remembered that in many Plant Pathology text books concerning fruit trees, the hypothesis emerges that *T. wiesneri* might be present in the tissues of the cherry tree (host plant) (Goidanich, 1964, Mac Swan and Koepsell, 1974, Atkinson, 1971, Ogawa and English, 1991). The data presented here give experimental support to that previous hypothesis, and permit us to rationalize the invariable presence of *T. wiesneri* on asymptomatic healthy cherry trees as due to a possible endophytism.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Italian Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, project MACLONELECI-MIPAF, Rome.

We are grateful to Prof F. Aniello and Dr. B. Avallone, University of Naples Federico II, for their helpful suggestions.

REFERENCES

- Adachi M., Sako Y. and Ishida Y., 1994. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S region in Japanese *Alexandrium* species (*Dinophyceae*). *Journal of Phycology* **30**: 857-863.
- Alioto D., Zaccaria F., Covelli L., Di Serio F., Ragozzino A. and Milne R.G., 2003. Light and electron microscope observations on chlorotic rusty spot, a disorder of cherry in Italy. *Journal of Plant Pathology* **5**: 215-218.
- Arnold A. E., Mejía L. C., Kyollo D., Rojas E. I., Maynard Z., Robbins N. and Herre E. I., 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 15649-54.
- Arumuganathan K. and Earle E. D., 1991. Plant Molecular Biology Reporter. Department of Plant Breeding and Biometry, Cornell University, 14853-1902 Ithaca, N.Y, USA.
- Atkinson J.D., 1971. Diseases of tree fruits in New Zealand. Dept. Sci.& Industrial Research, pp. 406. Auckland, N. Z.
- Barrow J. R., 2003. Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza* **13**: 239-247.
- Caputo P., Stevenson D.W. and Wurtzel E. T., 1991. A phylogenetic analysis of American Cycads (Cycadales) using chloroplast DNA restriction fragment polymorphisms. *Brittonia* **43**: 135-145.
- Cardinali S., Gobbo F. and Locci R., 1994. Endofiti fungini in tessuti fogliari di vite. *Mycologia italiana* **1**: 81-84.
- Coutts R. H. A., Covelli L., Di Serio F., Citir A., Açikgöz S., Hernández C., Ragozzino A. and Flores R., 2004. Cherry chlorotic rusty spot and Amasya cherry diseases are associated with a complex pattern of mycoviral-like double-stranded RNAs. II. Characterization of a new species in the genus *Partitivirus*. *Journal of General Virology* **85**: 3399-3403.
- Covelli L., Coutts R. H. A., Di Serio F., Citir A., Açikgöz S., Hernández C., Ragozzino A. and Flores R., 2004. Cherry chlorotic rusty spot and Amasya cherry diseases are associated with a complex pattern of mycoviral-like double-stranded RNAs. I. Characterization of a new species in the genus *Chrysovirus*. *Journal of General Virology* **85**: 3389-3397.
- Deforest Heald F., 1933. Manual of Plant Disease, p. 517. McGraw-Hill Book Co. Inc.
- De Rienzo G., Aniello F., Branno M. and Minucci S., 2001. Isolation and Characterization of a Novel Member of the Relaxin/Insulin Family from the Testis of the Frog *Rana esculenta*. *Endocrinology* **142**: 3231-3238.

- Di Serio F., Flores R. and Ragozzino A., 1996. Cherry chlorotic rusty spot: description of a virus-like disease from cherry and studies on its aetiological agent. *Plant Disease* **80**: 1203-1206.
- Di Serio F., Daròs J. A., Ragozzino A. and Flores R., 1997. A 451-nt circular RNA from cherry with hammerhead ribozymes in its strand of both polarities. *Journal of Virology* **71**: 6603-6610.
- Goidanich G., 1964. *Manuale di Patologia Vegetale*, vol. 2, pp1282. Edizioni Agricole Bologna.
- Johnston J. C. and Trione E. J., 1974. Cytokinin production by the fungi *T. cerasi* and *T. deformans*. *Canadian Journal of Botany* **52**: 1583-88.
- Kern H. and Naef-Roth S., 1975. Zur bildung von auxinen und cytokininen durch *Taphrina* arten. *Phytopathologische Zeitschrift* **83**: 193-222.
- Kozlakidis Z., Covelli L., Di Serio F., Citir A., Açikgöz S., Hernández C., Ragozzino A., Flores R. and Coutts R. H. A., 2006. Molecular characterization of the largest mycoviral-like double-stranded RNAs associated with Amasya cherry disease, a disease of presumed fungal aetiology. *Journal of General Virology* **87**: 3113-3117.
- Kramer C.L., 1973. *Protomycetales and Taphrinales*. In: G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow and A.S. Sussman (Eds.), *The Fungi – an advanced treatise*, Vol. IVA. Academic Press, New York, pp. 33-41.
- Kramer C.L., 1987. *The Taphrinales*. In: G.S. de Hoog, M.Th. Smith and A.C.M. Weijman (Eds.), *The Expanding Realm of Yeast-like Fungi*. Elsevier, Amsterdam, pp. 151–166 (*Stud. Mycol.* 30, 151–166).
- Kumar S., Tamura K. and Nei M., 2004. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**: 150-163.
- Mac Swan J.C. and Koepsell P.A., 1974. *Oregon plant disease control handbook*, pp 187. Oregon State Univ. Bookstore Corvallis, U.S.A.
- Marongiu P., Linaldeddu B. T. and Franceschini A., 2003. Sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer (ITS) of *Taphrina kruchi*. Unpublished.
- Márquez L. M., Redman R. S., Rodriguez R. J. and Roossinck M. J., 2007. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* **315** no. 5811: 513-515.
- Matsuyama N. and Misawa T., 1966. Studies on the hypertrophic disease caused by *Taphrina* species. (V) DNA level of nucleus in the infected tissue. *Tohoku Journal of Agricultural Research* **17** (2): 109-115.
- Mix A. J., 1949. A monograph of the genus *Taphrina*. *Univ. Kansas Sci. Bull.* **33**: 1-167. [Reprinted: 1969, *Bibliotheca mycological*, Vol. 18. Cramer, Vaduz.]
- Ogawa J. M. and English H., 1991. *Diseases of temperate zone. Tree fruit and nut crops*. Univ. California, Div. Agric. Nat. Resources, Publ. n. 3345, pp. 461.
- Redman R. S., Sheehan K. B., Stout R. G., Rodriguez R. J. and Henson J. M., 2002. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* **298**: 1581.
- Rodrigues M. G. and Fonseca Á., 2003. Molecular systematics of the dimorphic ascomycete genus *Taphrina*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 607-616.
- Schmitz H., 1916. Some observations on witches' brooms of cherries. *The Plant World* **19**: 239-242.

Smit E., Leeflang P., Glandorf B., van Elsas J. D. and Wernars K., 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (6): 2614-2621.

Spatafora J. W., Sung G. H., Johnson D. et al., 2006. A five-gene phylogeny of *Peizizomycotina*. *Mycologia* **98**(6): 1018-1028.

Tavares S., Inácio J., Fonseca Á. and Oliveira C., 2004. Direct detection of *Taphrina deformans* on peach trees using molecular methods. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 973-982.

Yamada T., Tsukamoto H., Shiraishi T., Kawamata S. and Oku H., 1990. Changes in indoleacetic acid production and chromosome length polymorphism in clofibric acid resistant mutants of *Taphrina wiesneri* and *Taphrina deformans*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **56**: 651-657.

Yamamoto A., Matsuda Y. and Ito S., 2008. Molecular characterization of *Taphrina wiesneri* based on internal transcribed spacer region. Unpublished.

Figure and Table legends

Figure 1. Unrooted phylogenetic tree calculated from the ITS region sequences of fungi belonging to *Taphrina* genus present in databases and from the 2 ITS region sequences deposited by the authors. The tree was calculated using the program MEGA v. 3.1 (Kumar et al., 2004), Neighbour-Joining method, and the validity of the branches was evaluated by performing a bootstrap analysis (1.000 replicas). Bootstrap values superior to 70% are displayed. The scale bar at the bottom represent 2% divergence.

Accession number and host tree of reference sequences are indicated in brackets.

* : ITS sequences obtained in this work, deposited in GenBank.

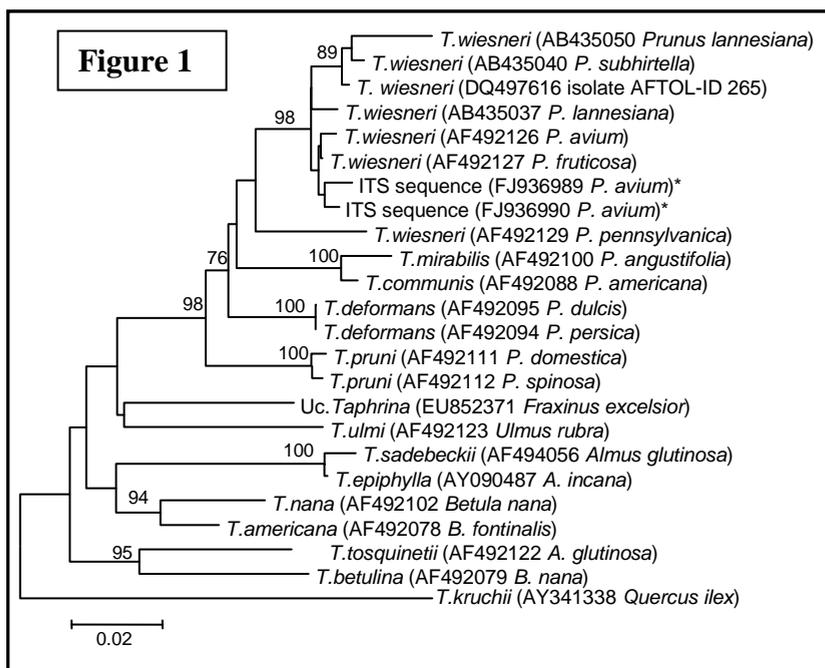
Figure 2. Electrophoretic analyses of sweet cherry (V) and *Taphrina* (F) rDNA fragments amplified by PCR from the same DNA samples isolated from sweet cherry buds. The relative numbers of genomes were estimated from the relative fluorescence intensities of the respective amplified DNA bands. From left to right: 1, 3, 5, 10 µl loaded solution of PCR product. M = 1Kb marker DNA.

Figure 3. Micrographs of cherry tree bud sections analyzed to detect fungal presence. Panel a) unstained; b), *in situ* hybridized with *T. wiesneri* 18S rRNA probe; c) dual-stained with Saphranin and Light-green, d) stained with Lactophenol blue, e) dual-stained with Trypan blue and Sudan III, f) detail of the Trypan blue stained section.

Table 1. PCR genetic identification of uncultured *Taphrina* species from bud DNA of Italian *P. avium*.

Table I

| Used primers (expected sequence length) | Accession numbers | | BLASTn results | | |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| | Deposited sequences in this paper | GenBank reference sequence | Identity (%) | Score (bits) | e- value |
| EF4-EF3 (1600bp, sequenced 921bp, 18S rDNA) | FJ936988 | <i>Taphrina wiesneri</i> (AY495827) | 98 (902/919) | 1594 | 0.0 |
| P3-M7 (252bp, 18S rDNA) | Identical to deposited sequence | <i>Taphrina wiesneri</i> (AY548293) | 100 (252/252) | 466 | 2e ⁻¹²⁸ |
| P2-M49* (690bp, spacers rDNA) | FJ936989 FJ936990 | <i>Taphrina wiesneri</i> (DQ497616) | 98 (601/610) | 1080 | 0.0 |
| EF1-forw/EF1-rev (727 bp, EF1 α protein) | FJ975773 | <i>Taphrina wiesneri</i> (DQ479936) | 98 (716/727) | 1282 | 0.0 |
| RPB1-forw/RPB1-rev (550bp, RPB1 protein) | FJ972197 | <i>Taphrina wiesneri</i> (DQ471134) | 98 (538/546) | 949 | 0.0 |



Results of sequence analyses of PCR amplified regions of rDNA and protein genes, as indicated. *, two variants deposited.

Figure 2

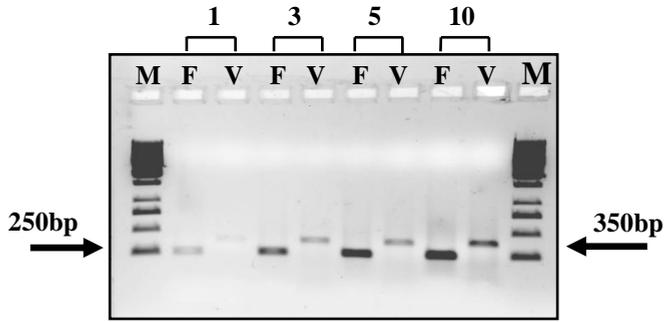


Figure 3

