

ALMA MATER STUDIORUM

UNIVERSITA' DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN:

Ecologia microbica e resistenza indotta ad agenti fitopatogeni

Prog. N. 2 “Resistenza indotta ad agenti fitopatogeni”

Settore Scientifico Disciplinare: AGR/12

XIX CICLO

“Utilizzo del virus del rachitismo cespuglioso del pomodoro (TBSV) come vettore virale per l’induzione di resistenza al virus della vaiolatura delle drupacee (PPV)”

Presentata dalla Dott.ssa:
Daniela Pignatta

Tutore:
Dott. Carlo Poggi Pollini

Co-tutore:
Dott. Massimo Turina

Coordinatore: Chiar. mo Prof. Paolo Bertolini

Indice

Capitolo Primo

INTRODUZIONE

1.1	Caratteristiche del virus della vaiolatura	
	(PPV= <i>Plum pox virus</i>)	p. 1
1.1.1	<i>Generalità</i>	p. 1
1.1.2	<i>Struttura del virione</i>	p. 1
1.1.3	<i>Ceppi, epidemiologia e trasmissione</i>	p. 4
1.1.4	<i>Sintomatologia su pesco</i>	p. 6
1.1.5	<i>Lotta</i>	p. 9
1.2	Silenziamento genico	p. 10
1.2.1	<i>Silenziamento dell'RNA e resistenza indotta</i>	p. 13
1.2.2	<i>Soppressione del silenziamento genico: p19</i>	p. 14
1.3	Caratteristiche di TBSV	p. 15
1.3.1	<i>Generalità</i>	p. 15
1.3.2	Struttura del virione	p. 17
1.3.3	<i>TBSV come vettore virale</i>	
	<i>per l'espressione transiente di proteine eterologhe</i>	p. 18
1.3.3.1	<i>Generalità sui vettori virali</i>	p. 18
1.3.3.2	<i>TBSV come vettore virale</i>	p. 20
1.4	Scopo della tesi	p. 21

Capitolo Secondo

MATERIALI E METODI

2.1	Isolato virale	p. 23
2.1.1	Scelta e mantenimento dell' isolato "wild-type"	
	di PPV	p. 23
2.2	Clonaggio dei geni che codificano per la proteina capsidica di PPV e per l'enzima magnesio chelatasi	

di <i>Nicotiana benthamiana</i> in vettori di espressione di origine virale (TBSV)	p. 23
2.2.1 Estrazione degli acidi ribonucleici totali da foglie di <i>N. benthamiana</i> infette da PPV.....	p. 23
2.2.2 Estrazione del DNA da foglie di <i>N. benthamiana</i> sana.....	p. 24
2.2.3 Sintesi della catena di DNA complementare.....	p. 24
2.2.4 Amplificazione del DNA tramite PCR.....	p. 25
2.2.5 Controllo dei frammenti amplificati.....	p. 26
2.2.6 Purificazione dei prodotti di PCR.....	p. 26
2.2.7 Clonaggio dei prodotti di PCR nel vettore pGEM [®] -T-Easy.....	p. 26
2.2.8 Digestione del DNA.....	p. 27
2.2.9 Preparazione dei vettori di espressione TBSV (privati del CP).....	p. 27
2.2.10 Reazione di ligasi.....	p. 28
2.2.11 Trasformazione delle cellule competenti.....	p. 28
2.2.12 Analisi dei cloni positivi.....	p. 29
2.2.13 Coltura in substrato liquido delle colonie ed estrazione del DNA plasmidico (miniprep).....	p. 29
2.2.14 Conferma mediante mappa di restrizione dell'individuazione dei cloni di interesse.....	p. 30
2.2.15 Sequenziamento dei cloni.....	p. 30
2.3 Sintesi <i>in vitro</i> di RNA infettivo	p. 31
2.3.1 Linearizzazione dei vettori di espressione.....	p. 31
2.3.2 Reazione di trascrizione <i>in vitro</i>	p. 31
2.4 Analisi delle proteine	p. 32
2.5 Clonaggio del gene che codifica per la proteina capsidica di PPV nel vettore di espressione pBin61 e agroinfiltrazione in <i>N. benthamiana</i>	p. 34
2.5.1 Preparazione del vettore di clonaggio.....	p. 34
2.5.2 Reazione di ligasi.....	p. 34
2.5.3 Trasformazione di cellule competenti di <i>E. Coli</i>	p. 35

2.5.4	<i>Analisi delle colonie derivate dalla trasformazione.....</i>	p. 35
2.5.5	<i>Coltura delle colonie ed estrazione del DNA plasmidico.....</i>	p. 35
2.5.6	<i>Trasformazione di cellule competenti di A. tumefaciens.....</i>	p. 36
2.5.7	<i>Agroinfiltrazione.....</i>	p. 36
2.6	<i>Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA).....</i>	p. 37
2.7	Quantificazione dell'mRNA di <i>ChIH</i> tramite Real-Time RT-PCR.....	p. 38
2.7.1	<i>Estrazione dell'RNA da foglie di N. benthamiana.....</i>	p. 38
2.7.2	<i>Digestione del DNA.....</i>	p. 38
2.7.3	<i>Sintesi della catena di DNA complementare.....</i>	p. 38
2.7.4	<i>Real-Time PCR.....</i>	p. 39
2.8	Analisi statistica.....	p. 40
2.9	Inoculazione di pesco.....	p. 40
2.9.1	<i>Vettore TBSV con promotore T7e trascrizione in vitro.....</i>	p. 40
2.9.2	<i>Vettore TBSV con promotore 35S e transfezione biolistica....</i>	p. 41
Capitolo Terzo		
RISULTATI		
3.1	Resistenza alla sharka mediante VIGS.....	p. 43
3.2	Espressione del gene che codifica per la proteina capsidica di PPV mediante agroinfiltrazione in <i>Nicotiana benthamiana</i>.....	p. 46
3.3	Silenziamento genico del gene magnesio chelatasi in <i>N. benthamiana</i> con vettore ricombinante TBSV.....	p. 47
3.3.1	<i>Espressione dei vettori ricombinanti in N. benthamiana.....</i>	p. 47
3.3.2	<i>Real-Time PCR per la quantificazione relativa dell'RNA messaggero di <i>ChIH</i> e analisi statistica dei dati....</i>	p. 53
3.4	Inoculazione di TBSV su pesco.....	p. 54
3.4.1	<i>Trascrizione in vitro.....</i>	p. 54
3.4.2	<i>Transfezione biolistica.....</i>	p. 54

Capitolo Quarto
Discussione

4.1 Resistenza alla sharka mediante VIGS.....p. 58
4.2 Silenziamento del gene endogeno magnesio chelatasi.....p. 61
4.3 TBSV come vettore virale per pesco?.....p. 63
4.4 Sviluppi futuri della ricerca.....p. 65

APPENDICE I.....P. 67
APPENDICE II.....p. 68

Bibliografia.....P. 69

1. Introduzione

1.2 Caratteristiche del virus della vaiolatura (PPV= *Plum pox virus*)

1.2.1 Generalità

La vaiolatura delle drupacee o sharka (vaiolo in lingua bulgara) è l'affezione che causa i maggiori danni alle coltivazioni di susino, albicocco e pesco nel continente europeo e nei paesi del bacino del Mediterraneo.

La prima comparsa della virosi in Europa risale al 1917-1918 in Bulgaria in piante di susino, mentre nel continente americano la malattia è stata segnalata recentemente in Pennsylvania (1999), in Canada (2000), in Michigan e nello stato di New York (2006).

Data l'entità del danno prodotto sui frutti delle piante colpite e la sua elevata diffusione nel territorio, l'Organizzazione Europea e Mediterranea per la Protezione delle Piante (EPPO/OEPP) ha inserito il PPV nella lista dei patogeni da quarantena, mentre il governo federale degli Stati Uniti d'America ha classificato il virus fra le prime dieci più importanti avversità per la propria agricoltura (Public Health Security and Bioterrorism Act of 2002).

Con riferimento al nostro Paese, la vaiolatura delle drupacee è stata individuata per la prima volta nel 1973, in un albicocchetto nella provincia di Bolzano. Nel 1982 la malattia è stata segnalata in Emilia-Romagna e Piemonte sempre su albicocco e, successivamente, in quasi tutte le regioni italiane. Per quanto riguarda le coltivazioni peschicole, nel 1992 la sharka è stata rinvenuta in Basilicata e tre anni dopo in Emilia-Romagna e Veneto con gravi conseguenze per le aree tipiche della peschicoltura (Giunchedi, 2003). Attualmente è in atto un decreto di lotta obbligatoria contro il virus in tutto il territorio nazionale (D.M. 29 Novembre 1996).

1.2.2 Struttura del virione

Il virus della vaiolatura delle drupacee è inserito nella famiglia *Potyviridae*, genere *Potyvirus* (Fauquet *et al.*, 2005).

I virioni sono filamenti flessuosi di circa 15x750 nm (Fig. 1.1). L'involucro proteico del virus è formato da circa 2.000 subunità identiche fra loro, ciascuna delle

quali è composta da una molecola peptidica di 330-332 amminoacidi, corrispondenti a un peso molecolare di 36-38 kDa, con eccezione dei ceppi non trasmissibili da afidi nei quali si è avuta la delezione di un frammento di 15 amminoacidi in prossimità dell'estremità amminica.

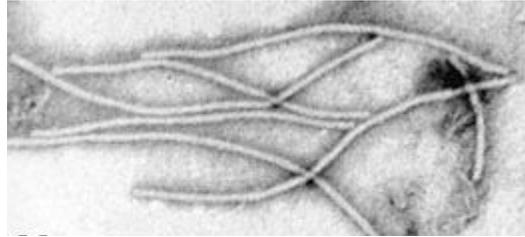


Fig. 1.1. Immagine di particelle virali di PPV al microscopio elettronico.

Il genoma monopartito è costituito da una molecola di RNA a filamento singolo con polarità positiva di circa 9800 nucleotidi, con una proteina a funzione protettiva codificata dal virus e posizionata all'estremità 5' (VPg) e una serie di residui di adenina all'estremità 3' (coda poli A) (Fig. 1.2).

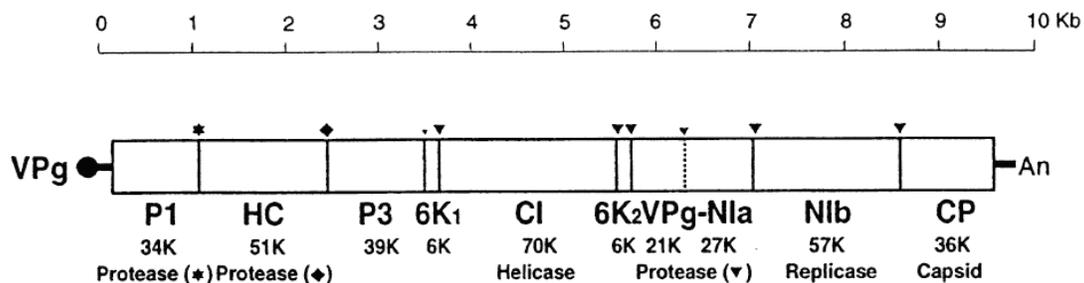


Fig. 1.2. Mappa del genoma di PPV. L'RNA è rappresentato al di sotto della linea graduata con VPg all'estremità 5' e la coda poli A all'estremità 3'. L'unica ORF è rappresentata come un rettangolo con i nomi delle proteine abbreviati, i rispettivi pesi molecolari (in kDa) e funzioni. I siti in cui avviene la proteolisi sono indicati con linee verticali ed un simbolo al di sopra. I simboli più piccoli e le linee tratteggiate indicano un digestione parziale o subottimale (da Lopez-Moya *et al.*, 2000).

L'RNA virale contiene un'unica lunga griglia di lettura che inizia al nucleotide 36 con un codone AUG (₃₆AUG). Tuttavia, i risultati di alcune ricerche effettuate *in vitro*

fanno ritenere che la traduzione dell'RNA genomico inizi solamente al nucleotide 146 con il secondo codone AUG (₁₄₆AUG) (Simon *et al.*, 1997).

La regione codificante del PPV dà origine ad una catena polipeptidica (3125-3143 aminoacidi) che viene scissa nei peptidi codificati dai singoli geni da tre proteasi che si separano dalla stessa catena peptidica tramite autocatalisi (Garçia *et al.*, 1994). Da tale processo derivano dieci proteine le cui proprietà, per i *Potyvirus* in generale, possono essere così riassunte (Urucuqui-Inchima *et al.*, 2000) (Fig. 1.2):

1. P1: proteina con attività proteolitica (si autoscinde nella sua porzione C-terminale) implicata nella replicazione dell'RNA, nella determinazione del quadro sintomatologico causato dal virus e, assieme alla HC-Pro, nella soppressione del meccanismo di silenziamento genico post-trascrizionale (PTGS);
2. HC-Pro: necessaria per la trasmissione dei virioni da parte degli afidi (HC = helper component); possiede attività proteolitica (si autoscinde nella sua porzione C-terminale). E' stato ipotizzato un suo ruolo per il movimento a lunga distanza delle particelle virali nella pianta. Interagisce con se stessa ed è implicata nella replicazione dell'RNA. Soppressore di PTGS;
3. P3: pare influenzare la patogenicità di alcuni virus;
4. 6K1: solitamente associata con la P3, con cui sembra regolare la patogenicità di alcuni virus;
5. CI: agisce come ATPasi e RNA elicasi ed è coinvolta nella replicazione dell'RNA virale. Si accumula nei corpi d'inclusione cilindrici (girandole) spesso associati con la membrana plasmatica e con i plasmodesmi. E' stata ipotizzata una sua funzione nel passaggio del complesso RNA virale-proteina capsidica da cellula a cellula;
6. 6K2: si lega con la proteina NIa e la induce ad associarsi con le membrane citoplasmatiche così da prevenire il suo trasporto nel nucleo. La sua funzione enzimatica è sconosciuta;
7. NIa e NIb: fanno parte degli inclusi cristallini, localizzati soprattutto nel nucleo, ma anche nel citoplasma. La porzione C-terminale della proteina NIa possiede attività proteolitica e scinde in *cis* e in *trans* la catena polipeptidica (Fig. 1.3a). NIa si autoscinde dalla regione N-terminale la quale diviene la proteina (VPg) che

- si lega all'estremità 5' del genoma virale. NIa interagisce anche con NIB formando un complesso coinvolto nella replicazione virale. NIB consente la replicazione del genoma virale (RNA polimerasi RNA-dipendente);
8. CP: proteina capsidica con tre domini funzionali, di cui quelli alle estremità amminica e carbossilica sono esposti alla superficie delle particelle virali, mentre quello centrale si aggrega strettamente all'acido nucleico provocando l'assemblaggio dei virioni (Fig. 1.3b). Il dominio centrale e quello N-terminale in associazione con la proteina CI sembrano coinvolti nella diffusione dell'RNA virale da cellula a cellula. I domini terminali in associazione con la HC-Pro e la proteina genomica (VPg) regolano la traslocazione dei virioni attraverso il sistema vascolare. La regione N-terminale contiene il motivo DAG essenziale per la trasmissione dei potyvirus da parte degli afidi vettori.

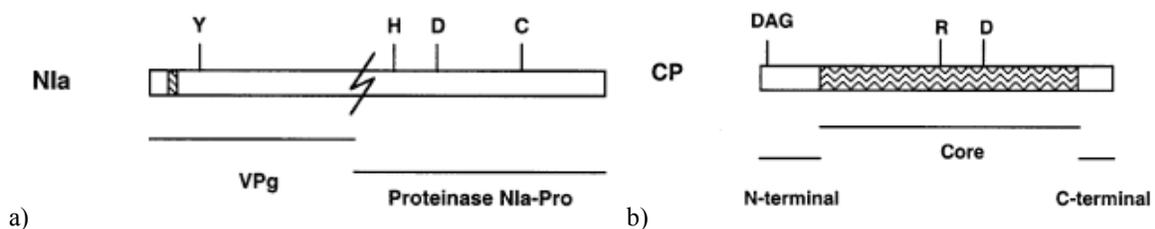


Fig. 1.3. Rappresentazione schematica delle proteine NIa e CP. (a) NIa: i domini VPg e NIa-Pro sono indicati con una linea orizzontale al di sotto del rettangolo che rappresenta la proteina. La linea a zig-zag rappresenta il punto in cui NIa si autoscinde. (b) CP: le regioni N- e C-terminale ed il dominio centrale sono indicati con una linea orizzontale al di sotto del rettangolo che rappresenta la proteina (da Urucuqui-Inchima *et al.*, 2000).

1.1.3 Ceppi, epidemiologia e trasmissione

In base alle proprie caratteristiche antigeniche, gli isolati virali sono inquadrati in due sierogruppi principali:

- D (da Dideron, proprietario di un albicocchetto in Francia da cui deriva l'isolato originario del gruppo), di cui fanno parte i ceppi Rankovic, PPV-D e PPV-NAT;
- M (da Markus, varietà greca di pesco, da cui è stato ricavato l'isolato del gruppo per primo caratterizzato), rappresentato dai ceppi PPV-SK 68 e PPV-PS.

Esistono anche due sierogruppi minori: C, comprendente gli isolati da ciliegio acido e dolce, ed El Amar, comprendente gli isolati diffusi in alcune aree di coltivazione dell'albicocco in Egitto (Myrta *et al.*, 1998). In associazione a piante di susino sono stati inoltre segnalati ceppi ricombinanti (PPV-Rec), diffusi nei Paesi dell'Europa centro-orientale e trasmessi da afidi. Essi derivano da un' unica ricombinazione omologa fra ceppo M e D (cross-over fra le regioni 3' del gene NIb) (Glasa *et al.*, 2004). Infine ricordiamo il ceppo PPV-W (Winona) segnalato ed immediatamente eradicato da piante di susino in Canada (James e Varga, 2005).

L'analisi della sequenza nucleotidica del gene che codifica la porzione C-terminale della proteina capsidica ha consentito l'individuazione di un polimorfismo molecolare in gran parte correlato con gli isolati dei due sierotipi maggiori e del sierotipo C. Infatti, nella regione genomica in questione gli isolati del sierotipo D presentano i siti di restrizione per le endonucleasi *AluI* e *RsaI*, quelli del sierotipo M presentano solo il sito di taglio per l'enzima *AluI*, mentre quelli del sierotipo C sono privi del sito di taglio per entrambi gli enzimi (Candresse *et al.*, 1995; Nemchinov e Hadidi, 1996; Crescenzi *et al.*, 1997).

Inoltre, gli isolati del virus possono essere distinti attraverso il confronto delle sequenze nucleotidiche (il livello di conservazione è di circa il 98 % fra gli isolati di ciascun sierotipo e intorno all'85% fra quelli dei due sierotipi) e delle proprietà antigeniche della parte N-terminale della proteina del capsido (Myrta *et al.*, 1998).

Gli isolati dei sierotipi M e D presentano anche caratteristiche epidemiologiche e patogenetiche distinte, anche se isolati del medesimo gruppo spesso differiscono fra loro nelle proprietà patogenetiche. Gli isolati del sierotipo M più di frequente infettano il pesco, mentre quelli del sierotipo D sono maggiormente diffusi nelle coltivazioni di albicocco (Quiot *et al.*, 1995). Inoltre, gli isolati del gruppo M si diffondono in natura in modo più rapido rispetto a quelli del gruppo D.

Gli isolati caratterizzati nel nostro Paese fino al 1995 appartenevano tutti al gruppo D. Soltanto nel 1996 sono stati rinvenuti i primi isolati del gruppo M in piante di pesco in Emilia-Romagna e Veneto e di susino in Trentino.

PPV viene trasmesso in natura da numerose specie di afidi secondo la modalità della non-persistenza, mentre la sua diffusione a media e lunga distanza avviene essenzialmente attraverso l'utilizzo di materiale di propagazione infetto.

Gli afidi alati acquisiscono le particelle virali dai tessuti vegetali infetti e le trasmettono a piante sane attraverso punture “di assaggio” della durata di pochi secondi che tali insetti effettuano in rapida successione, alla ricerca delle proprie piante ospiti. La capacità di trasmissione del virus viene persa dopo qualche ora dall'acquisizione in assenza di altre punture d'assaggio, tuttavia un afide può infettare molte piante in seguito ad una sola acquisizione.

La maggior parte degli afidi vettori di PPV appartengono alla famiglia *Aphididae* (eg *A. gossypii*). Le specie vettrici che svolgono un ruolo importante nella trasmissione in campo non sono quelle che infestano le drupacee coltivate, bensì quelle che effettuano punture di assaggio su molte foglie e germogli di numerose piante in modo casuale.

La velocità di diffusione secondaria del PPV all'interno di una coltivazione per opera degli afidi dipende da numerosi fattori, fra cui il ceppo virale. Negli impianti peschicoli, le epidemie indotte dagli isolati del gruppo M si diffondono con maggiore rapidità rispetto a quelle causate dagli isolati del gruppo D nelle coltivazioni di albicocco. Questa diversità nella diffusione è legata al tipo di reazione che la pianta sviluppa al seguito dell'infezione virale: in albicocco la diffusione del virus a livello sistemico sembra non essere frequente o in ogni caso più lenta rispetto al pesco. Inoltre i peschi vengono visitati da varie specie di afidi e quindi fungono da fonte d'inoculo dalla ripresa vegetativa fino alla fine di agosto, contrariamente a quanto avviene per gli albicocchi, colonizzati solo fino alla fine di giugno (Giunchedi, 2003).

1.1.4 Sintomatologia su pesco

I sintomi dell'infezione virale variano notevolmente in relazione alla suscettibilità varietale, alla specifica virulenza dell'isolato virale coinvolto, alle condizioni ambientali e di crescita dell'albero e alla presenza contemporanea di altre infezioni virali. Le manifestazioni sintomatologiche interessano soprattutto i frutti e le foglie, ma sono presenti anche sui petali dei fiori rosacei e sulla corteccia dei giovani rami, mentre la

fioritura, la fecondazione e lo sviluppo generale delle piante di solito non sono influenzate.

Sui fiori delle varietà a fioritura tardiva e con corolla di tipo rosaceo (a petali aperti), si possono osservare i sintomi della sharka sottoforma di striature di colore rosato, sinuose o parallele alle nervature (Fig. 1.4); i fiori con corolla di tipo campanulaceo (con petali ripiegati verso il centro del fiore), non presentano, invece, alcun sintomo.



Fig. 1.4. Fiori di pesco con corolla di tipo rosaceo mostrandoti sintomi della sharka, sottoforma di striature rosate.

All'inizio della ripresa vegetativa, sulle foglie compare un'irregolare decolorazione clorotica di brevi tratti delle nervature secondarie e dei tessuti adiacenti a queste. In alcune varietà più sensibili i tessuti colpiti dalla decolorazione non si sviluppano normalmente per cui la lamina nell'accrescersi assume un andamento ondulato e contorto. Nelle foglie che si differenziano successivamente (dalla terza fino all'ottava di un germoglio) appaiono delle bande di colore giallo-chiaro che nell'insieme formano macchie più o meno circolari, centrate sulle nervature secondarie o terziarie, con al centro una area verde (Fig. 1.5).



Fig. 1.5. Foglia di pesco (varietà Rich May) con sintomi causati da PPV.

I sintomi fogliari sono di solito più evidenti durante il periodo primaverile e tendono a scomparire nei mesi estivi per effetto delle elevate temperature o sono visibili solo su qualche foglia nelle parti più ombreggiate della chioma. Talvolta, inoltre, i sintomi interessano solo poche foglie di un ramo o di una branca, specialmente se l'albero è stato infettato tramite afidi da poco tempo (Giunchedi, 2003).

Sulle pesche a polpa bianca la malattia si manifesta poco prima dell'epoca di raccolta con una maculatura rotondeggiante, di colore biancastro o giallo-verde a contorni diffusi, disposta su tutta la superficie del frutto ma più in particolare verso l'emisfero calicino o quello peziolare. Nei frutti con l'epicarpo colorato si possono avere macchie depigmentate di varia dimensione, aree irregolarmente pigmentate, anelli clorotici o rossastri, aree depresse di forma allungata o anulare nelle quali l'epidermide conserva la pigmentazione verdastra anche a maturità, e zone gibbose di colore rossastro alternate ad aree depresse (Fig. 1.6). Tutte le varietà di pesco e di nettarine evidenziano in modo più o meno accentuato sintomi sui frutti.

Su alcune varietà di pesco (eg "Rich Lady"), sulla corteccia dei rametti di un anno, possono comparire anelli di colore verde chiaro, con contorni netti, a partire da settembre-ottobre fino a marzo-aprile.



Fig. 1.6. Frutti di pesco mostranti sintomi di PPV: varietà Caldesi-2010 (a sinistra), varietà Rich May (a destra).

1.1.5 Lotta

Le misure di contenimento del PPV sono essenzialmente preventive e sono basate su un'accurata scelta del materiale di propagazione usato per la realizzazione di nuovi impianti, sulla scelta di varietà resistenti o poco suscettibili al virus, e sulla riduzione delle sorgenti d'inoculo, attraverso la distruzione delle piante infette.

L'eradicazione completa della malattia è forse possibile nelle aree geografiche in cui la contaminazione è recente e se i centri d'infezione sono in numero limitato, mentre diviene estremamente difficile e onerosa con il passare del tempo, per la diffusione naturale del virus. Nelle aree dove l'infezione è endemica l'eliminazione delle piante infette permette di ridurre le sorgenti d'inoculo per gli afidi vettori e conseguentemente di rallentare la velocità di diffusione naturale del virus. La lotta chimica contro gli afidi non previene la diffusione dell'infezione in campo in quanto la trasmissione del virus avviene prima che gli afidi subiscano l'effetto letale dell'aficida (Giunchedi, 2003).

Per quanto riguarda le piante resistenti, osservazioni condotte in diversi paesi dell'est Europeo, in Germania, Grecia e Francia hanno evidenziato la presenza di sorgenti di resistenza al virus della sharka in un ristretto numero di varietà. Fra quelle di albicocco sembrano presentare un buon livello di resistenza alcune cv. di origine nord americana ("Stark Early Orange", "Stella", etc) e alcune europee, derivate da incroci con cultivar americane. Le varietà di pesco e nettarine mostrano diversi livelli di sensibilità, ma nessuna si presenta completamente resistente. L'ibridazione interspecifica di queste specie con *P. davidiana* potrebbe forse dare varietà con un elevato grado di resistenza alla sharka.

Un'altra possibile strategia per l'ottenimento di piante resistenti al virus riguarda l'utilizzo dell'ingegneria genetica. La resistenza transgenica ai virus è caratterizzata in larga misura dall'uso della resistenza derivata dal patogeno (PDR = Pathogen-Derived Resistance), la quale viene conferita ad una pianta da sequenze nucleotidiche (RNA o DNA) codificanti o non, isolate dal genoma del patogeno, clonate e trasferite stabilmente nel genoma dell'ospite con metodiche di ingegneria genetica (Hull, 2002).

Per quanto riguarda l'ospite susino, sono stati realizzati diversi cloni transgenici (C2, C3, C5, C6) in cui la sequenza nucleotidica che codifica per la proteina capsidica di PPV è stata inserita all'interno del genoma della pianta per essere espressa

costituitivamente (Ravelonandro *et al.*, 1998; Scorza *et al.*, 1998). In particolare un clone (C5), sebbene non immune, è stato classificato come altamente resistente in seguito alla sua sperimentazione in campo. A livello molecolare è stato poi dimostrato che la resistenza nel caso del clone C5 si basa sul fenomeno del silenziamento genico post-trascrizionale (Hily *et al.*, 2005).

1.2 Silenziamento genico

Il silenziamento genico post trascrizionale (PTGS = post-transcriptional gene silencing) nelle piante, il “quelling” nei funghi e l’interferenza mediata dall’RNA (RNAi = RNA interference) negli animali sono manifestazioni dello stesso fenomeno biologico, conservato a livello evolutivo (Benedito *et al.*, 2004; Voinnet, 2005).

Si tratta di un meccanismo di regolazione dell’espressione genica che prevede la degradazione di molecole di RNA secondo una modalità sequenza-specifica negli organismi eucarioti (Hammond *et al.*, 2000).

Anche se il silenziamento avviene attraverso vie metaboliche diverse fra loro, alla base di questo fenomeno c’è la presenza di molecole di RNA a doppia catena (dsRNA= double strand RNA) nella cellula, che attivano una risposta altamente specifica basata sulla degradazione degli RNA citoplasmatici caratterizzati da un’elevata omologia di sequenza con la molecola di dsRNA che ha innescato il processo (Fire *et al.*, 1998).

I primi studi sul silenziamento genico risalgono al 1990 (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990), quando si tentò d’intensificare il colore viola dei petali di petunia tramite la super-espressione del gene calcione sintetasi (CHS), coinvolto nella via metabolica delle antocianine. Contrariamente alle aspettative, tale tentativo portò all’ottenimento di petali variegati viola e bianchi a causa del silenziamento del gene (CHS) di cui si voleva ottenere la super-espressione.

Alcuni anni dopo (Cogoni *et al.*, 1994) si cercò in modo analogo di incrementare la pigmentazione arancione del fungo *Neurospora crassa*, con l’introduzione nel genoma di un gene coinvolto nella via di sintesi dei carotenoidi. Ancora una volta fu ottenuto l’effetto contrario (il fungo assunse un colore bianco) e il fenomeno fu chiamato “quelling”.

La dimostrazione del ruolo fondamentale del dsRNA come potente stimolatore del silenziamento genico risale al 1998, da uno studio condotto da Fire e Mello (premio Nobel per la medicina 2006) sul nematode *Caenorhabditis elegans*, in cui fu mostrato che l'iniezione di molecole di dsRNA in adulti di *C. elegans* risultava in una interferenza dell'RNA (RNAi) più efficace rispetto a quella stimolata dall' introduzione di molecole a RNA senso-antisenso (Fire *et al.*, 1998).

Con riferimento alle piante, il silenziamento genico è stato dimostrato essere coinvolto nella difesa dagli agenti virali (Baulcombe, 1996). I virus sono allo stesso tempo attivatori e bersaglio di questo meccanismo, chiamato silenziamento genico indotto da virus (VIGS = Virus Induced Gene Silencing).

Nel caso dei virus con genoma a ssRNA di polarità positiva, che rappresentano la maggior parte dei virus vegetali, la replicazione avviene all'interno del citoplasma della cellula ospite ad opera della RNA polimerasi virale RNA-dipendente, che sintetizza RNA negativi complementari, da cui sono prodotte numerose copie di ssRNA. Il parziale o totale appaiamento dei filamenti di RNA positivi e negativi costituisce la forma replicativa del virus, che rappresenta la fonte di dsRNA, attiva nell'innescare il VIGS (Fig. 1.7). Un'altra fonte è data dal ripiegamento del ssRNA genomico che forma strutture secondarie a doppia catena ("hairpins" = forcine) per l'interazione imperfetta fra basi (Voinnet, 2005).

D'altra parte, i virus finiscono per essere bersaglio del meccanismo da loro stessi innescato, in quanto le molecole di dsRNA vengono digerite in piccoli RNA interferenti (siRNA = small interfering RNA) da un complesso enzimatico (Dicer), con attività endoribonucleasica con due domini RNasi III, un dominio PAZ (dai nomi delle proteine Piwi, Argonaut e Zwiille; la sua funzione non è nota con certezza; tuttavia pare legare gli siRNA) e una RNA elicasi (Hamilton e Baulcombe, 1999). Gli siRNA sono lunghi 21-25 paia di basi, hanno un gruppo fosfato all'estremità 5' e un gruppo idrossilico al 3', con 2 nt protudenti al 3' (Elbashir *et al.*, 2001). Le due catene che costituiscono gli siRNA sono separate da un'elicasi, che fa parte di un complesso enzimatico noto come RISC (RNA-Induced Silencing Complex), che usa gli RNA a singolo filamento di polarità negativa come guida nella ricerca di altre molecole citoplasmatiche a RNA che presentino

complementarietà di sequenza. Una volta individuate, tali sequenze vengono infine degradate (Fig. 1.7).

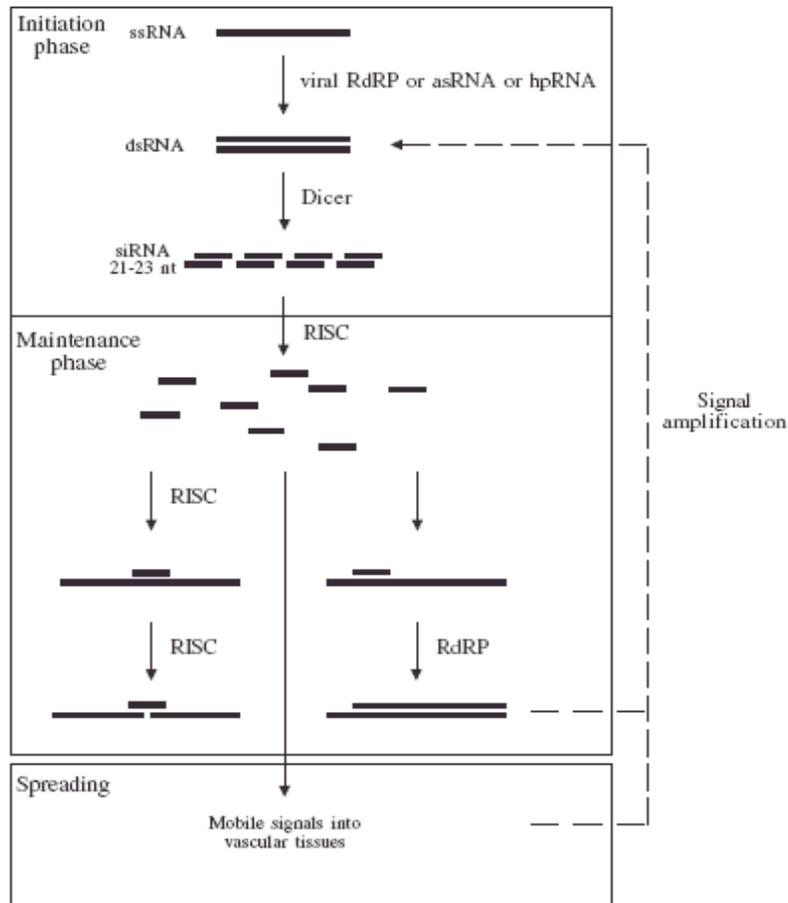


Fig. 1.7. Rappresentazione grafica del meccanismo del silenziamento genico indotto da virus (VIGS) (da Benedito *et al.*, 2004).

Anche se il silenziamento viene indotto localmente, esso è in grado di diffondersi sistemicamente grazie ad un segnale che, data la specificità di sequenza di tale meccanismo, ha probabilmente una componente di acido nucleico (RNA) (Yoo *et al.*, 2004; Voinnet, 2005). Grazie all'azione di una RNA polimerasi RNA dipendente codificata dall'ospite, la quale usa i filamenti a polarità negativa di siRNA come inneschi per la sintesi di nuovi dsRNA sullo stampo di mRNA a singolo filamento, il segnale verrebbe poi amplificato e si muoverebbe di cellula in cellula attraverso i plasmodesmi (Himber *et al.*, 2003; Voinnet, 2005).

1.2.1 Silenziamento dell'RNA e resistenza indotta

Il silenziamento dell'RNA è un fenomeno altamente adattativo, specifico e sistemico e per queste sue caratteristiche intrinseche, può essere visto come una forma di sistema immunitario che opera a livello degli acidi nucleici (RNA) (Voinnet, 2005). Tuttavia, a differenza dei sistemi immunitari che operano attraverso l'interazione di proteine, la specificità del silenziamento dell' RNA non è programmata dall'ospite ma è determinata dalla natura (eg. sequenza nucleotidica) del genoma del patogeno.

E' interessante notare come il silenziamento dell'RNA, esempio primario di resistenza indotta, e altri sistemi di difesa, come quello mediato dall'acido salicilico (SA), appaiono essere connessi. SA è un segnale importante nella difesa della pianta e si accumula nei tessuti vegetali a seguito della reazione ipersensibile (HR), che consiste nello sviluppo di lesioni necrotiche localizzate nell'area di inoculazione del virus. La reazione ipersensibile porta ad un incremento nella capacità difensiva della pianta a livello sistemico verso un ampio spettro di patogeni, fenomeno noto come resistenza sistemica acquisita (Systemic Acquired Resistance = SAR). SA può ostacolare l'infezione virale durante tre fasi distinte: replicazione, movimento da cellula a cellula e sistemico (Singh *et al.*, 2004) (Fig. 1.8). L'idea di una correlazione fra SAR e il silenziamento dell'RNA deriva dalla scoperta che l'espressione di un gene di *N. tabacum* che codifica per RNA polimerasi RNA-dipendente importante nel silenziamento dell'RNA, è indotta da SA (Xie *et al.*, 2001). Inoltre, diversi soppressori del VIGS sono in grado di elicitarne una risposta ipersensibile (Li *et al.*, 1999; Scholthof *et al.*, 1995a) e fra questi la proteina 2b di *Cucumber mosaic virus* (CMV) sopprime sia il silenziamento dell'RNA, che la via metabolica dell'acido salicilico (Ji *et al.*, 2001).

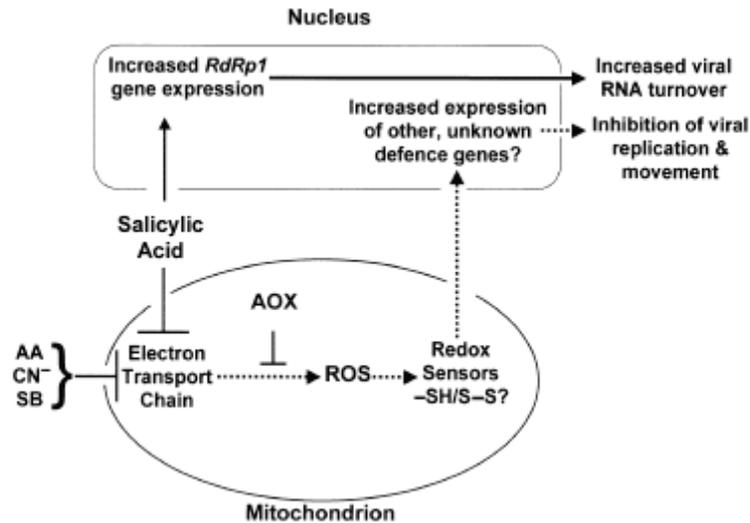


Fig. 1.8. Modello per l'induzione di resistenza ai virus da parte dell'acido salicilico (SA). SA può indurre l'espressione del gene (RdRp1), che codifica per una RNA polimerasi RNA-dipendente importante nel silenziamento dell'RNA. Alternativamente, SA può portare all'accumulo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel mitocondrio, che potrebbero essere captate da proteine-sensore con la conseguente induzione di gene nucleari che influenzerebbero la replicazione e il movimento del virus (da Singh *et al.*, 2004).

1.2.2 Soppressione del silenziamento genico: p19

Un'ulteriore prova del ruolo di difesa svolto da VIGS è stata la dimostrazione che numerose proteine virali hanno una funzione di soppressore del silenziamento genico (Voinnet, 2005). Per quanto riguarda più specificatamente l'oggetto di questa tesi, è opportuno ricordare la proteina p19, la cui sequenza nucleotidica è altamente conservata nei *Tombusvirus*. A seguito della scoperta del suo ruolo di potente soppressore del silenziamento genico post-trascrizionale (Voinnet *et al.*, 1999), p19 è stata ampiamente utilizzata negli studi dell'interferenza dell'RNA (RNAi) in diversi modelli eucariotici. La dimostrazione della sua attività anti-RNAi è risultata da una ricerca condotta su piante di *N. benthamiana* transgeniche esprimenti costitutivamente GFP (Green Fluorescent Protein) (Qiu *et al.*, 2002). Tali piante, a seguito dell'inoculazione di un virus ricombinante (*Potato virus X*) con inserito il gene omologo per GFP, appaiono rosse alla luce ultravioletta, come manifestazione fenotipica del silenziamento del transgene in atto. Se però nel sistema viene introdotta fin dall'inizio l'espressione di p19, le piante mostrano una intensa fluorescenza verde a dimostrazione del fatto che tale proteina

sopprime il silenziamento genico anche se non è in grado di fermarlo una volta iniziato. In particolare, è stato chiarito come p19 operi come dimero e sequestri le molecole di siRNA (21 bp), prevenendo l'azione di RISC e quindi bloccando il meccanismo del silenziamento (Silhavy *et al.*, 2002) (Fig. 1.9). In tal modo, la presenza di p19 inibisce la degradazione del genoma dei *Tombusvirus* in *N. benthamiana* e facilita la sua diffusione a livello sistemico, al di fuori del sistema vascolare. P19 svolge anche altri ruoli, strettamente pianta ospite-specifici, quali elicitore della risposta ipersensibile (Chu *et al.*, 2000) e coadiuva la diffusione virale sia a lunga che a breve distanza (Turina *et al.*, 2003).

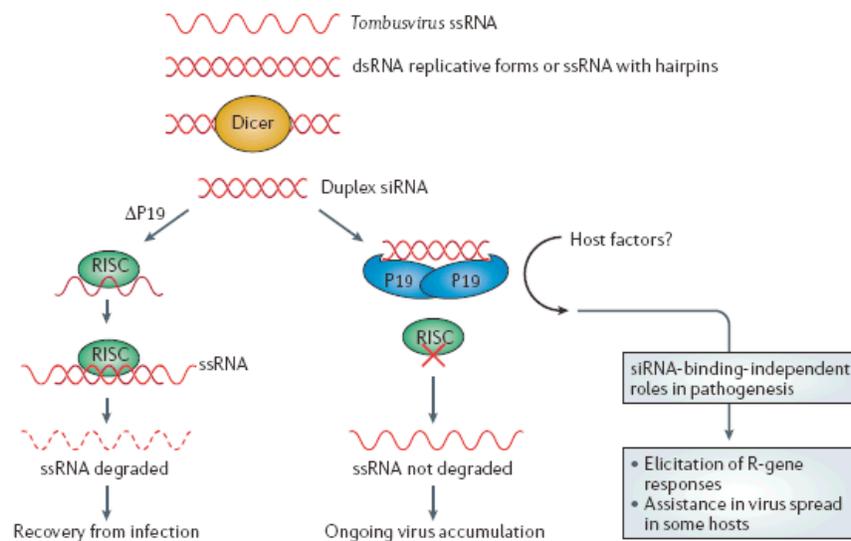


Fig. 1.9. Rappresentazione grafica del meccanismo del silenziamento genico (a sinistra) e del ruolo di soppressore di p19 (a destra) (da Scholthof, 2006).

1.3 Caratteristiche di TBSV

1.3.1 Generalità

La prima segnalazione del virus del rachitismo cespuglioso del pomodoro risale al 1935 in Irlanda (Tomlinson *et al.*, 1982). La nomenclatura del virus fa riferimento al quadro sintomatologico osservabile sull'ospite pomodoro, su cui TBSV causa arricciamento e maculatura fogliare assieme ad una crescita stentata e proliferazione di germogli laterali, che conferiscono alla pianta un aspetto cespuglioso.

Nonostante TBSV sia stato riscontrato in Europa, Nord Africa e America in colture ornamentali, orticole (e.g. pomodoro, peperone) e occasionalmente anche in

piante arboree (melo, pero, ciliegio), il virus non riveste una particolare importanza pratico-economica come agente patogeno (Tomlinson *et al.*, 1982; Yamamura e Scholthof, 2005).

A dispetto di questo suo ruolo marginale nell'economia di poche specie orticole, il virus ha un'ampia gamma di ospiti sperimentali: più di centoventi specie appartenenti a più di venti famiglie sono state segnalate come suscettibili al virus, anche se nella maggioranza dei casi l'infezione rimane locale.

TBSV è la specie tipo del genere *Tombusvirus*, all'interno della famiglia *Tombusviridae* (Fauquet *et al.*, 2005).

Questa famiglia comprende otto generi: *Aureusvirus*, *Avenavirus*, *Carmovirus*, *Dianthovirus*, *Machlomovirus*, *Necrovirus*, *Panicovirus* e *Tombusvirus*.

La maggior parte delle conoscenze sulla biologia molecolare dei *Tombusvirus* deriva da studi condotti su quattro specie dello stesso genere: TBSV, *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV), *Cucumber necrosis virus* (CNV) and *Carnation Italian ringspot virus* (CIRV). Tali ricerche riguardano la struttura delle proteine (Hsu *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2003; Vargason *et al.*, 2003), l'espressione genica e la replicazione dei virus (Choi e White, 2002; Sit *et al.*, 1998), i meccanismi alla base del movimento all'interno della pianta ospite (Scholthof *et al.*, 1995a) e della patogenicità. Sono stati condotti studi sugli RNA difettivi interferenti (DI RNAs) e satellite, che si trovano spesso associati alle infezioni da *Tombusvirus*. E' stato dimostrato che l'espressione delle replicasi p36 e p95 di CIRV mediante l'utilizzo del lievito *Saccharomyces cerevisiae*, è sufficiente per la replicazione dei DI RNA, ma non degli RNA satellite, che hanno probabilmente una strategia di replicazione diversa basata sulla presenza di altri elementi genomici (Rubino *et al.*, 2004). Di particolare interesse, per lo scopo di questa tesi, risultano gli studi effettuati sull'uso di TBSV come vettore virale per l'espressione *in planta* di geni eterologhi (Scholthof, 1996) e sul silenziamento genico post-trascrizionale (Lakatos *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2002).

1.3.2 Struttura del virione

Le particelle virali hanno forma icosaedrica (T=3) di diametro di 33 nm, composte da 180 subunità proteiche identiche (42 kDa), la cui organizzazione origina un aspetto granuloso della superficie capsidica (Fig. 1.10).

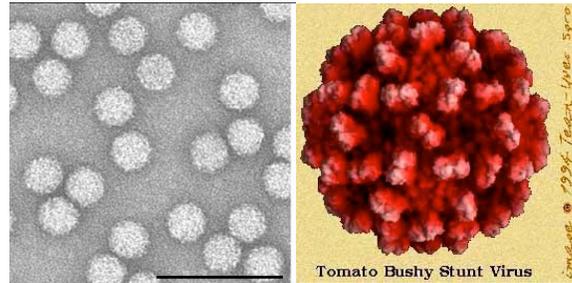


Fig. 1.10. Immagine al microscopio a trasmissione elettronica di particelle virali di TBSV (a sinistra). Particolare della struttura capsidica (a destra).

All'interno del capsid si trova il genoma monopartito a RNA a singolo filamento di polarità positiva e di 4775 nucleotidi in lunghezza. L'RNA genomico manca sia di cuffia all'estremità 5' che di coda poliadenilica all'estremità 3' e codifica per cinque ORFs (Hearne *et al.*, 1990) (Fig. 1.11).

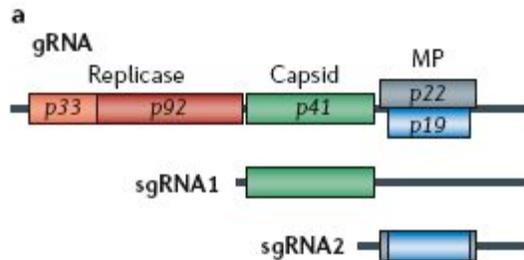


Fig. 1.11. Organizzazione genomica di TBSV. Le linee blu rappresentano le regioni non tradotte e il nome delle cinque ORFs (rettangoli) derivano dai pesi molecolari (in kDa) delle rispettive proteine prodotte (da Scholthof, 2006).

Le prime due ORFs a partire dall'estremità 5' rappresentano i geni per la replicazione del virus (Oster *et al.*, 1998) che codificano per le proteine p33 e p92, tradotte direttamente dall'RNA genomico. La p92 è tradotta per “read-through” del

codone stop ambra (UAG) della p33; ne consegue una traduzione di p33 superiore di almeno 20 volte rispetto alla p92 (Scholthof *et al.*, 1995b).

Durante la replicazione, due RNA subgenomici (sgRNAs) sono prodotti attraverso un meccanismo noto come prematura terminazione della sintesi dell'RNA di polarità negativa. Tale modello prevede l'interazione fra diversi elementi della struttura primaria dell'RNA con conseguente formazione di una struttura secondaria, causa della prematura terminazione. Gli RNA complementari derivanti agirebbero poi come stampo per la trascrizione degli RNA subgenomici (White, 2002).

L'RNA subgenomico 1 agisce come RNA messaggero (mRNA) per il gene della proteina capsidica (p41), mentre sgRNA2 rappresenta l'mRNA per p19 e p22, le due ORFs all'estremità 3'. P22 e p19 condividono la stessa sequenza nucleotidica ma sono tradotte da due ORFs in due griglie di lettura diverse (imprinting). P22 rappresenta la proteina di movimento, mentre p19 è soppressore del silenziamento genico post-trascrizionale (Voinnet *et al.*, 1999). pX rappresenta infine un sesto gene, la cui funzione nella patogenesi non è stata definita (Scholthof e Jackson, 1997).

1.3.3 TBSV come vettore virale per l'espressione transiente di proteine eterologhe

1.3.3.1 Generalità sui vettori virali

L'uso dei vettori virali per l'espressione di geni esogeni in pianta si è diffuso largamente negli ultimi dieci anni, soprattutto negli studi rivolti all'individuazione della funzione di un gene (genetica inversa) (Benedito *et al.*, 2004) e all'espressione di proteine eterologhe (Alamillo *et al.*, 2006). Essi trovano applicazione anche nello studio della risposta di difesa all'attacco di un patogeno e delle vie metaboliche alla base dello sviluppo (Burton *et al.*, 2000).

Nel caso della genetica inversa, il loro utilizzo si basa sul meccanismo del VIGS: il gene di cui si conosce la sequenza nucleotidica ma la cui funzione è sconosciuta, viene clonato all'interno del vettore con lo scopo di silenziare il suo omologo nell'ospite. A seguito del silenziamento è poi possibile rilevarne gli effetti fenotipici e risalire alla sua funzione.

I virus in grado di replicarsi in modo autonomo offrono numerosi vantaggi rispetto all'espressione mediante trasformazione quali un alto livello di espressione,

grazie all'elevata capacità replicativa del vettore, e la possibilità di studiare geni coinvolti nei primi stadi di sviluppo della pianta.

Affinchè un virus possa servire come valido vettore di espressione transiente, esso deve essere in grado di infettare le piante ospiti in modo efficiente per via meccanica.

Per l'ottenimento di un virus ricombinante possono essere impiegate diverse strategie quali l'inserzione di un gene esogeno all'interno del genoma virale del vettore o la sostituzione di sequenze geniche endogene non essenziali alla funzionalità del vettore stesso (nella maggior parte dei casi sono stati sostituiti geni necessari per la trasmissione da parte di insetti vettori o codificanti proteine nucleocapsidiche) (Scholthof *et al.*, 1996).

Un'ulteriore strategia riguarda l'introduzione di sequenze geniche esogene codificanti peptidi di ridotte dimensioni (epitopi) fuse "in frame" alle ORF di sequenze geniche del virus vettore, determinando la produzione di una proteina di fusione; in tal caso, è necessario che la modifica apportata non interferisca con le normali proprietà del prodotto virale originario ed è richiesta una approfondita conoscenza della struttura del vettore virale. E' stato dimostrato che virus ricombinanti così ottenuti possono essere utilizzati per immunizzare animali nutriti con i tessuti vegetali infetti per la produzione di specifici anticorpi (Alamillo *et al.*, 2006).

D'altro canto, un fattore limitante nell'utilizzo dei vettori virali in generale è rappresentato dall'elevata capacità di ricombinazione, con conseguente instabilità genomica e perdita delle sequenze geniche introdotte all'interno del genoma. Alla base di tali meccanismi, non ancora perfettamente chiariti, vi potrebbe essere una strategia virale universale per evitare l'introduzione di geni esogeni e la successiva amplificazione di sequenze non utili o di disturbo per il corretto assemblaggio e per l'architettura delle particelle virali (Pogue *et al.*, 2002; Scholthof, 1999).

I vettori virali sono solitamente meno competitivi rispetto ai virus da cui hanno avuto origine. Tale aspetto, unito alla loro intrinseca instabilità, fa in modo che siano esclusi rapidamente dalla propria progenie "wild-type", riducendo il rischio di dispersione del vettore contenente la proteina ricombinante al di fuori di sistemi controllati (Scholthof *et al.*, 1996).

1.3.3.2 TBSV come vettore virale

TBSV rappresenta un ottimo vettore virale per alcune sue caratteristiche intrinseche, quali:

- Elevata capacità replicativa associata ad un'alta espressione del gene eterologo inserito all'interno del genoma;
- Genoma di piccole dimensioni, monopartito;
- Capacità d'infezione del vettore a cDNA con trascrizione in vivo mediata dal promotore S35 (Scholthof, 1999) che quindi non abbisogna della costosa fase di trascrizione in vitro;
- Possibilità di inserire il gene di interesse al posto della ORF codificante la proteina capsidica (Scholthof *et al.*, 1996);
- Molteplici piante ospiti, fra cui specie arboree;

TBSV è stato usato con successo per il silenziamento del gene codificante per GFP (Green Fluorescent Protein) in *N. benthamiana* (Qiu *et al.*, 2002), mentre il suo utilizzo per il silenziamento di un gene endogeno nella medesima pianta ospite si è dimostrato fin'ora fallimentare (Zhong *et al.*, 2005).

1.4 Scopo della tesi

La sharka rappresenta la più grave infezione virale che colpisce le drupacee coltivate. Data la sua elevata diffusione e l'inefficacia dei trattamenti chimici contro gli afidi vettori, è auspicabile lo sviluppo di una nuova strategia di difesa, che tuttavia non si basi sull'ottenimento di piante transgeniche, in quanto non compatibile con le normative europee in campo di OGM.

Oggetto di questa tesi è stato lo sviluppo un vettore virale per un suo possibile impiego nell'ottenimento della resistenza alla sharka. Il meccanismo che si presuppone potrebbe essere utilizzato si basa sullo sfruttamento del PTGS mediante VIGS.

Il vettore virale scelto deriva da *Tomato bushy stunt virus*, perchè oltre ad essere usato più volte nello studio dell'interazione molecolare ospite-patogeno (Scholthof *et al.*, 1996), ha una ampia gamma di piante ospiti che si estende alle piante arboree. In particolare, come noto nella letteratura fitopatologica, TBSV è in grado di infettare piante come il ciliegio, il melo, il pero e piante appartenenti al genere *Citrus* (Allen e Davidson, 1967; Allen, 1969).

Preliminarmente, si è voluta verificare l'efficienza nell'infettività di TBSV su pesco, con lo scopo di verificare se l'uso di TBSV come vettore virale nell'ospite pesco è effettivamente una strategia applicabile. L'infezione meccanica a partire da cloni infettivi è stata condotta seguendo due diverse strategie: inoculazione meccanica a partire da tessuti infetti di *N. benthamiana* e, direttamente, tramite metodo biolistico.

La ricerca è stata quindi orientata nello sviluppo del vettore per il suo impiego nel silenziamento di PPV utilizzando *N. benthamiana* come pianta ospite modello. Un frammento del gene codificante per la proteina capsidica del PPV è stato clonato all'interno del vettore TBSV al posto del gene per la p41 (CP): la sua espressione *in planta* è stata confermata mediante separazione elettroforetica in gel di poliacrilamide delle proteine estratte da foglie inoculate e successiva analisi "western blot", prelevando i campioni da tessuti infetti. Lo stesso frammento è stato clonato in un vettore binario pBin61 e trasferito all'interno di cellule di *Agrobacterium tumefaciens*, usato come vettore di espressione eterologa transiente di proteine all'interno del tessuto fogliare. L'impiego di *A. tumefaciens* permette infatti di fare chiarezza sul funzionamento di

singolo frammento genico esogeno, al di là di ogni possibile effetto dovuto al vettore virale.

Tenuto conto dei risultati preliminari non soddisfacenti ottenuti con il vettore TBSV privato di CP, nella parte finale della ricerca si è cercato di indagare sui possibili motivi del parziale fallimento. In particolare si è voluta verificare la sua effettiva utilità come vettore per VIGS utilizzando come bersaglio non un gene virale eterologo, ma un gene della pianta ospite il cui silenziamento fosse facilmente monitorabile. Tale sistema ci dà anche la possibilità di valutare la sua effettiva capacità di infezione a livello sistemico della pianta ospite. Sebbene infatti il vettore privato di CP sia in grado di infettare sistemicamente *N. benthamiana*, l'infezione procede più lentamente e dà origine a sintomi meno gravi rispetto a quelli causati dal virus "wild type" (Desvoyes e Scholthof, 2002; Scholthof *et al.*, 1993). Il gene bersaglio selezionato è stato il gene magnesio chelatasi di *N. benthamiana*, che è stato clonato all'interno del vettore TBSV privato di CP. La scelta di tale gene endogeno deriva dal fatto che i tessuti vegetali in cui avviene il silenziamento manifestano clorosi, per cui la diffusione del virus nella pianta risulta di facile monitoraggio a livello fenotipico. Il silenziamento genico è stato confermato tramite quantificazione degli RNA messaggeri di interesse mediante la tecnica Real-Time PCR e i dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente.

2. Materiali e metodi

2.1 Isolato virale

2.1.1 Scelta e mantenimento dell' isolato "wild-type" di PPV

L'isolato di PPV prescelto appartiene al sierotipo M, proveniente da Bari (BA), disponibile nella collezione di virus vegetali dell'Istituto di Virologia Vegetale dal 31/05/2002. L'isolato virale è stato mantenuto mediante inoculazione meccanica su piante di *Nicotiana benthamiana* in serra integrando la luce naturale con luce artificiale (tubi fluorescenti Philips – Son-T Agro 400), con fotoperiodo di 15 ore, alla temperatura di 25° C. Il materiale vegetale infetto, prelevato da provette conservate in azoto liquido, è stato omogeneizzato in mortaio con tampone Paul (tampone fosfato 0,05 M pH 7,0, 5 mM DIECA, 1 mM EDTA, 5 mM Na-Tioglicolato) e carbone-attivo. Il succo ottenuto è stato applicato sulle foglie delle piante, preventivamente cosparse di polvere abrasiva (Carborundum), per facilitare l'infezione del virus.

Il virus è stato trasmesso periodicamente per via meccanica a un nuovo gruppo di piante per mantenere la fonte di inoculo infettiva. I materiali fogliari sintomatici sono stati conservati a lungo termine in azoto liquido e usati come fonte di inoculo.

2.2 Clonaggio dei geni che codificano per la proteina capsidica di PPV e per l'enzima magnesio chelatasi di *Nicotiana benthamiana* in vettori di espressione di origine virale (TBSV)

2.2.1 Estrazione degli acidi ribonucleici totali da foglie di *N. benthamiana* infette da PPV

L'RNA è stato purificato seguendo il protocollo descritto da Scholthof *et al.* (1993) con alcune modificazioni. Il materiale vegetale è stato pesato e circa 0,3 g omogeneizzati in mortaio a freddo in una soluzione di 700 µl tampone 2X STE-1% SDS (1 X STE: 0,05 M Tris-HCl pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,1 M), 700 µl fenolo:cloroformio: alcool isoamilico (25:24:1) e 70 µl β-mercaptoetanololo. L'omogenato è stato trasferito in provette coniche tipo Eppendorf da 1,5 ml, mescolato energicamente

mediante vortex e centrifugato a 5° C per 5 minuti a 14000 rpm (giri al minuto) in microcentrifuga Eppendorf 5402. La fase liquida è stata recuperata, aggiunta a 600 µl di fenolo:cloroformio:alcool isoamilico, mescolata energicamente e centrifugata per 5 minuti a 14000 rpm in microcentrifuga; quindi il supernatante è stato riestratto in 500 µl di solo cloroformio.

L'RNA è stato precipitato miscelando la fase liquida separata mediante centrifugazione per 5 minuti a 14000 rpm con 1/4 di volume di litio cloruro 10 M e incubando la soluzione in ghiaccio per almeno 3 ore. Dopo centrifugazione per 10 minuti a 14000 rpm in microcentrifuga, il sedimento è stato lavato con etanolo 70%, asciugato in camera a vuoto (SpeedVac Concentrator, Savant), risospeso in 50 µl di acqua distillata sterile e conservato a -80° C fino al momento dell'uso.

2.2.2 Estrazione del DNA da foglie di *N. benthamiana* sana

Il DNA è stato purificato utilizzando il kit DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, U.S.A.) seguendo il protocollo della ditta produttrice. Il DNA è stato eluito in 100 µl di acqua distillata sterile.

2.2.3 Sintesi della catena di DNA complementare

La catena di DNA complementare (cDNA) all'RNA virale è stata ottenuta con una reazione di trascrizione inversa, impiegando il sistema "ThermoScript RT-PCR System" (Invitrogen Life-Technologies). Inizialmente 4 µl di RNA, 5 µl di acqua sterile e 1 µl di una miscela di "random primer" (oligonucleotidi di 6 basi azotate la cui sequenza randomizzata permette l'innescamento della sintesi del DNA complementare in differenti punti del genoma virale) sono stati mantenuti prima a 65° C per 5 min, per eliminare eventuali strutture secondarie presenti all'interno della singola elica di RNA, e quindi trasferiti prontamente in ghiaccio. Successivamente, sono stati aggiunti 10 µl di una soluzione preparata unendo 4 µl di tampone 5X (250 mM Tris-acetato pH 8,4, 375 mM acetato di potassio, 40 mM acetato di magnesio), 1 µl 0,1 M DTT, 2 µl 10 mM dNTPs, 2 µl di acqua sterile, 0,5 µl di RNaseOUT (40 U/µl) e 0,5 µl di ThermoScript RT (15 U/µl), una

trascrittasi inversa ingegnerizzata per garantire elevata stabilità termica e alta resa in cDNA. La reazione è stata incubata per 1 ora a 37° C.

2.2.4 Amplificazione del DNA tramite PCR

Le sequenze di cDNA specifiche ottenute dalla trascrizione inversa sono state amplificate mediante reazione a catena della polimerasi (PCR, Polymerase Chain Reaction). In un volume complessivo di 50 µl sono stati impiegati i seguenti reagenti: 1 µl di template, 1,5 µl mix di oligonucleotidi “forward-reverse” (Tabella 2.1), 5 µl di tampone 10X, 5 µl 2mM dNTPs, 2,5 µl 50 mM MgCl₂, 0,5 µl Taq polimerasi 10 U/µl, 37,5 µl acqua sterile. Per la reazione è stato usato un termociclatore “PT-200 Peltier Thermal Cycler-MJ Research” programmato secondo il seguente schema: 5 minuti a 99° C, una serie di 30 cicli in cui si ha denaturazione dei filamenti del DNA (94° C per 30 secondi), appaiamento dei “primers” (52° C per 30 secondi), sintesi della nuova catena di DNA (72° C per 30 secondi); dopo i 30 cicli, si lascia incubare a 72° C per 10 minuti.

Il DNA estratto da foglie di *N. benthamiana* sana è stato amplificato mediante PCR, in un volume complessivo di reazione di 50 µl. Un µg di template è stato aggiunto ad una miscela contenente: 2 µl mix di oligonucleotidi “forward-reverse” (Tab. 2.1), 5 µl di tampone 10X, 5 µl 2mM dNTPs, 2,5 µl 50 mM MgCl₂, 0,5 µl Taq polimerasi (10 U/µl), 30 µl acqua sterile. La reazione è stata effettuata con lo stesso termociclatore aumentando il tempo per l’appaiamento dei “primers” (52° C per 1 minuto) e per la sintesi della nuova catena di DNA (72° C per 1 minuto).

Per l’amplificazione di un tratto del gene codificante per la CP di PPV, sono state scelte due diverse combinazioni di oligonucleotidi disegnati in corrispondenza di una regione conservata fra diverse sequenze nucleotidiche disponibili in banca dati (accessioni: D13751, X81081, X57975, X81074, AF401296, AF354269, X81083, M21847, AF360579, AF440745) e comprendenti i siti di riconoscimento per le endonucleasi di restrizione utilizzate per il clonaggio all’interno dei vettori di espressione (Tab. 2.1).

Per il gene magnesio chelatasi si è amplificato un frammento della sequenza nucleotidica che codifica per la subunità H (*ChlH*; accessione AF014052).

Frammento amplificato	Oligonucleotidi	Sequenza 5'-3'	Amplicone (bp)	Orient.
CP	PPV-19- <i>Xho</i> I-F PPV- 475- <i>Bg</i> /II-R	aaactc <u>gag</u> tcatacagcctgcaccc aaa <u>agatc</u> tttctctatgcaccaaacca	356	Forcina
CP	PPV-19- <i>Xho</i> I-F PPV-435- <i>Bg</i> /II-R	aaactc <u>gag</u> tcatacagcctgcaccc aaa <u>agatc</u> ttcatttcacgtccgtga	316	
<i>ChlH</i>	<i>ChlH</i> - <i>Xho</i> I-F <i>ChlH</i> - <i>Bg</i> /II-R	aaactc <u>gag</u> agccagaagacc aaa <u>agatc</u> ttgccaacaccag	230	Senso
<i>ChlH</i>	<i>ChlH</i> - <i>Xho</i> I-F <i>ChlH</i> - <i>Bg</i> /II-R	aaactc <u>gag</u> tgccaacaccag aaa <u>agatc</u> tagccagaagacc	230	Antisens o

Tab. 2.1. Coppie di oligonucleotidi utilizzate in PCR e relative sequenze nucleotidiche; le sequenze riconosciute dalle endonucleasi di restrizione sono sottolineate.

2.2.5 Controllo dei frammenti amplificati

Il controllo dei frammenti di DNA amplificati è stato effettuato mediante separazione degli acidi nucleici con elettroforesi su gel di agarosio all'1% in tampone 1X TBE (100mM Tris, 90mM Acido borico, 2 mM EDTA). Cinque µl di prodotto di PCR sono stati sottoposti a corsa elettroforetica a voltaggio costante pari a 100 V per circa 30 minuti. Le bande sono state osservate al transilluminatore a raggi UV dopo aver tenuto il gel per 15 min in una soluzione di etidio bromuro (EtBr 0,4 µg/ml). Il peso molecolare dei frammenti visualizzati è stato determinato per confronto con un marcatore per DNA di pesi molecolari noti (1 kb DNA ladder – Gibco).

2.2.6 Purificazione dei prodotti di PCR

I prodotti della reazione di PCR sono stati purificati utilizzando "Zymoclean Gel DNA Recovery kitTM" (Zymo Research Corp.). Il principio alla base di tale sistema è l'adsorbimento dei frammenti amplificati su una membrana silicea in condizioni di alta concentrazione salina. Si è seguito il protocollo della ditta produttrice e il DNA è stato eluito in 7 µl di acqua distillata sterile.

2.2.7 Clonaggio dei prodotti di PCR nel vettore pGEM[®]-T-Easy

I prodotti di PCR purificati sono stati clonati nel vettore pGEM[®]-T-Easy Vector System I (Promega Corp., Madison, WI, USA). Per la reazione di ligasi si è seguito il protocollo suggerito dalla ditta produttrice (pGEM[®]-T and pGEM[®]-T-Easy Vector Systems Technical Manual). Per il clonaggio del gene codificante per la CP di PPV si sono inseriti in successione nello stesso vettore pGEM[®]-T Easy i due frammenti di 356 bp e 316 bp ottenuti in PCR. I due frammenti sono stati clonati in direzioni opposte (senso e antisenso) in modo da ottenere un costrutto a forcina. Per *ChlH* è stato clonato in pGEM[®]-T Easy un frammento di 230 bp. Il prodotto di ligasi è stato usato per la trasformazione di cellule batteriche (vedi paragrafo 2.2.11) e le colonie sono state valutate per la presenza dell'inserto mediante PCR con gli oligonucleotidi M13 forward e reverse (vedi paragrafo 2.2.12). In questo modo sono stati ottenuti i plasmidi intermedi pGEM-CP-PPV e pGEM-*ChlH*.

2.2.8 Digestione del DNA

I plasmidi così ottenuti sono stati trattati con le endonucleasi di restrizione specifiche per il clonaggio all'interno dei vettori di espressione TBSV. In un volume finale di 50 µl, sono stati digeriti 2 µg di DNA con 5 µl di tampone 10X, 1 µl BSA (Albumina di siero bovino 100mM), 1,5 µl di ciascun enzima (*XhoI* e *BglII*) (10 U/µl). La reazione è stata lasciata in incubazione a 37° C per 3-4 ore e i frammenti sono stati purificati da gel come descritto nel paragrafo 2.2.6.

2.2.9 Preparazione dei vettori di espressione TBSV (privati del CP)

Per il clonaggio e l'espressione dei geni codificanti la proteina capsidica virale di PPV e l'enzima magnesio chelatasi di *N. benthamiana* è stato utilizzato un vettore derivante da TBSV, disponibile in due versioni, una che esprime la proteina p19, e una che invece non la esprime (Scholthof *et al.*, 1996).

Il vettore contiene l'intera sequenza del genoma di *Tomato bushy stunt virus* privata del gene della proteina capsidica (p41) che non è necessaria per l'infezione locale in *N. benthamiana*, al cui posto possono essere inserite sequenze esogene di dimensioni limitate (Scholthof *et al.*, 1993); all'estremità 5' terminale del genoma è stato aggiunto il

promotore della RNA polimerasi del fago T7 per la produzione *in vitro* di RNA virale infettivo. Il vettore di partenza utilizzato è stato gentilmente fornito da T. Sit, dell'Università del Nord Carolina (Department of Plant Pathology); si tratta di un vettore derivato da TBSV che contiene il gene GFP al posto del gene della proteina capsidica (Appendice I).

Per il clonaggio del costrutto a forcina del gene della CP di PPV sono stati sfruttati i siti di riconoscimento per le endonucleasi di restrizione *XhoI* e *BglII*, introdotti per PCR in corrispondenza della regione 5' terminale del gene della proteina capsidica virale. Gli stessi siti di taglio sono stati utilizzati per clonare separatamente un frammento del gene magnesio chelatasi in direzione 5'-3' e 3'-5'.

Per la reazione di digestione sono stati miscelati 5 µl di tampone 10X , 1,5 µl di ciascun enzima (10 U/µl), 2,5-3 µg di plasmidio, acqua distillata sterile con BSA (1:100) per un volume finale di 50 µl. Il campione è stato lasciato in incubazione a 37° C per 3 ore e in seguito il DNA è stato purificato come descritto al paragrafo 2.2.6.

2.2.10 Reazione di ligasi

Il cDNA digerito è stato legato direttamente nel vettore plasmidico in proporzione 1:3 (rapporto molare; ~100 ng di vettore), 2 µl di tampone 10X (300mM Tris-HCl pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100mM DTT, 10 mM ATP), 1 µl di T4 DNA ligasi (3 U/µl) (Promega), acqua distillata sterile fino a 20 µl. La reazione di ligasi è stata incubata per tutta la notte alla temperatura di 14 °C.

2.2.11 Trasformazione delle cellule competenti

La trasformazione è stata effettuata tramite shock-termico. Cellule batteriche competenti di *Escherichia coli*, ceppo DH-5α (100 µl), preparate secondo un protocollo standardizzato (Sambrook *et al.*, 1989), sono state incubate in ghiaccio per 10 minuti; si sono aggiunti i 20 µl di prodotto di ligasi e la sospensione è stata nuovamente incubata in ghiaccio per 20 minuti. Lo shock termico è avvenuto a 42° C per 1 minuto, seguito da immediato raffreddamento in ghiaccio. Alla sospensione sono stati aggiunti 900 µl di substrato per crescita di batteri LB [10 g/l triptone (Difco), 5 g/l estratto di lievito

(Difco), e 10 g/l di NaCl]. Le cellule sono state lasciate crescere a 37° C per 45 min e quindi inoculate su substrato agarizzato LB con aggiunta di 15 g/l bactoagar (Difco) e ampicillina 100 µg/ml. Nel caso della trasformazione con il plasmidio pGEM[®]-T Easy Vector, al substrato è stato aggiunto X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-tiogalactopiranoside) (80 µg/ml) e IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranoside) (0,5 mM) per permettere una prima discriminazione fra colonie bianche (trasformate con il plasmide contenente l'inserto) e blu (trasformate con il plasmide senza inserto) (pGEM[®]-T and pGEM[®]-T-Easy Vector Systems Technical Manual).

2.2.12 Analisi dei cloni positivi

Le singole colonie venivano saggiate mediante PCR per discriminare eventuali falsi positivi dovuti al rilegamento del vettore senza inserto. In una prima fase, le cellule della singola colonia, accuratamente prelevate con un puntale sterile, sono state inoculate in una miscela di 12 µl acqua distillata sterile e 3 µl tampone PCR 10X (descritto precedentemente) e mantenute a temperatura elevata (99° C per 5 minuti) per provocarne la lisi e permettere la liberazione dei vari componenti cellulari nella miscela di reazione.

Nella seconda fase è stata aggiunta una miscela con i reagenti necessari per la reazione di amplificazione [3 µl 10mM dNTPs, 1,5 µl 15 mM MgCl₂, 0,5 µl di miscela degli oligonucleotidi “forward - reverse” 10 µM, enzima *Taq* polimerasi (5 U/µl - Promega); acqua distillata sterile fino a 30 µl]; seguivano 25 cicli di amplificazione in ciclatore termico secondo il seguente programma: 30 cicli a 94° C 30 secondi, 54° C 30 sec, 72 ° C 30 secondi, preceduti da una fase di incubazione a 94°C per 5 minuti e seguiti da una finale a 72° C per 7 minuti.

Gli oligonucleotidi utilizzati nella reazione di “screening” sono TBSV-2600F (5'-cctcgactccgcgtagc-3') e TBSV-3841R (5'-ccatgaactggctctgttc-3'). La lunghezza del frammento amplificato in PCR era 872 bp nel caso di CP di PPV e di 430 bp per *ChlH*.

La successiva analisi del prodotto di PCR (8 µl) mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1% in TBE e visualizzazione delle bande ai raggi UV, permetteva di selezionare le colonie di interesse.

2.2.13 Coltura in substrato liquido delle colonie ed estrazione del DNA plasmidico (miniprep)

Le colonie trasformanti selezionate sono state usate per inoculare 2 ml di substrato LB contenente ampicillina (100 µg/ml) e fatte crescere a 37° C in agitazione per 16 ore. Il DNA plasmidico è stato purificato con il kit “QIA prep Spin Miniprep” (Qiagen Inc., Valencia, CA, U.S.A.), seguendo il protocollo suggerito dalla ditta produttrice, eluito in 50 µl di acqua distillata sterile e conservato a -20° C.

2.2.14 Conferma mediante mappa di restrizione dell'individuazione dei cloni di interesse

Il DNA plasmidico è stato sottoposto a digestione con endonucleasi di restrizione *XhoI* e *BglII*, in modo tale da confermare la presenza dell'inserto di interesse all'interno del vettore. Per la reazione di digestione sono stati uniti 0,5 µg di DNA purificato, 0,5 µl di ciascun enzima (10 U/µl), 2 µl di tampone 10X (50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT pH 7,9), 15 µl di acqua distillata sterile con BSA (1:100). Il campione è stato lasciato in incubazione a 37° C per 1 ora; i frammenti digeriti sono stati evidenziati ai raggi UV dopo separazione elettroforetica in gel di agarosio all'1% in TBE e colorazione con bromuro di etidio, come precedentemente descritto.

2.2.15 Sequenziamento dei cloni

Per confermare ulteriormente la presenza dell'inserto e la sua integrità, i cloni sono stati sequenziati con gli oligonucleotidi usati nella reazione di "screening" (paragrafo 2.2.12).

Complessivamente sono stati ottenuti 6 vettori virali ricombinanti con l'intento di esprimere transientemente un frammento di CP di PPV e *ChlH*, a cui si aggiunge il clone di controllo esprimente la proteina GFP (Tab. 2.2).

Vettore	CP	p19	Inserto	Posizione
TBSV sGFP	N	N	GFP (~750-bp)	CP repl.
pD-a	N	S	CP PPV (~672-bp)	
pD-b	N	N		
pPD-1	N	S	<i>ChlH</i> senso (~230-bp)	
pPD-2	N	N		
pPD-3	N	S	<i>ChlH</i> antisenso (~230-bp)	
pPD-4	N	N		

Tab. 2.2. In tabella sono elencate le sigle di ciascun clone utilizzato. L'espressione della CP e della p19 viene indicata con la lettera S (=sí) o N (=no).

Ciascun vettore è stato rappresentato graficamente in Appendice I.

2.3 Sintesi *in vitro* di RNA infettivo

I vettori TBSV ricombinanti sono stati inoculati sulle piante test come RNA infettivo prodotto *in vitro*.

2.3.1 Linearizzazione dei vettori di espressione

Per essere utilizzato come template per la reazione di trascrizione *in vitro* il DNA plasmidico purificato deve essere linearizzato esattamente in corrispondenza del nucleotide 3' terminale della sequenza genomica, sfruttando l'attività di endonucleasi di restrizione che riconoscano siti unici all'estremità 3' del cDNA dei genomi virali.

Per la reazione di digestione sono stati miscelati 20 µl di tampone 10X (20mM Tris-acetato, 10 mM magnesio acetato, 50mM potassio acetato, 1mM DTT pH 7,9), 3 µg di DNA, 2 µl BSA 10 mg/ml (Promega), 2 µl dell'enzima di restrizione *Sma*I (10 U/µl), acqua distillata sterile fino a raggiungere un volume complessivo di 200 µl. La reazione è stata incubata a 25 °C per tutta la notte. Il DNA è stato in seguito purificato dai residui di reazione utilizzando il kit 'QIAquick PCR purification' (Qiagen Inc., Valencia, CA, U.S.A.) seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice ed infine risospeso in 40 µl di acqua distillata sterile.

2.3.2 Reazione di trascrizione *in vitro*

L'RNA virale infettivo è stato ottenuto attraverso la reazione di trascrizione *in vitro* effettuata utilizzando il kit MEGAscript[®] (Ambion Inc., TX, U.S.A.), seguendo il protocollo della ditta produttrice. Un µg di DNA linearizzato è stato unito ad una miscela di reazione composta da 2 µl di tampone 10X, 2 µl di ciascun nucleotide (ATP-, CTP-, GTP-, UTP-solution), 2 µl di "enzyme mix" (T7 RNA polimerasi) e portato a volume di 20 µl con acqua distillata sterile. La reazione è stata incubata a 37° C per 3-4 ore e successivamente è stata addizionata di 1 µl di Dnasi 1 per rimuovere il template di DNA.

Dopo 15 minuti di incubazione a 37° C, la reazione è stata fermata con l'aggiunta di 30 µl di acqua distillata sterile e 30 µl di Litio Cloruro "precipitation solution" (7,5 M litio cloruro, 50 mM EDTA), per rimuovere i nucleotidi non incorporati nell'RNA sintetizzato e le proteine presenti. Dopo 30 minuti d'incubazione alla temperatura di -20° C, si è precipitato l'RNA con centrifugazione per 15 minuti a 4° C a 14000 rpm. Il surnatante è stato rimosso ed il pellet è stato lavato con etanolo al 70%. Infine l'RNA è stato risospeso in 20 µl di acqua distillata sterile e la sua concentrazione misurata allo spettrofotometro (BioMate™ 3 Series Spectrophotometers, ThermoSpectronic, NY, U.S.A.) in modo da poter inoculare le piante con la stessa quantità di RNA. Il controllo degli RNA sintetizzati è stato effettuato per elettroforesi su gel di agarosio all'1% preparato in tampone TAE (40mM Tris-acetato, 2mM EDTA) e 0,4 µg/ml di etidio bromuro (EtBr); 2 µl del prodotto di reazione uniti a 10 µl di tampone 1X TE pH 7,4 (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica a voltaggio costante (100 V) per circa 30 minuti. Le bande sono state osservate al transilluminatore a raggi UV.

I trascritti ottenuti sono stati miscelati a 100 µl di tampone per l'inoculazione di RNA ("FES Buffer": 1% sodio pirofosfato, 1% bentonite, 1 % celite in 0,1 M glicina, 0,06 M potassio fosfato dibasico) quindi inoculati meccanicamente su piante di *N. benthamiana* tenute 12 ore al buio completo. Per ogni vettore sono state inoculate cinque piante (2 foglie con 2,5 µg di RNA ciascuna).

Nel caso dei vettori ricombinanti per il gene della CP di PPV le piante di *N. benthamiana* sono state infettate con il virus della sharka a tre giorni dall'inoculo. La trasmissione è avvenuta per via meccanica, come descritto al paragrafo 2.1.1, sulle foglie già inoculate con il vettore ricombinante oppure sulle foglie sviluppatasi successivamente per valutare una possibile differenza nella risposta della pianta.

2.4 Analisi delle proteine

Campioni di proteine estratte da foglie inoculate con i vettori virali ricombinanti sono stati sottoposti ad analisi "western blot" seguendo i protocolli descritti da Scholthof *et al.* (1995a). Dischi fogliari (0,03-0,06 g) prelevati a distanza di 2-3 giorni dall'inoculazione venivano omogeneizzati in mortaio con tampone TE (5 volte V/P). Il succo così estratto è stato mescolato ad un ugual volume di tampone di denaturazione

Tris-Tricina (4 ml H₂O, 1 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,8 ml glicerolo, 1,6 ml 10% SDS, 0,4 ml 2-βmercaptoetanol e 0,2 ml 0,05% coomassie R250), sonicato per 5 secondi e fatto bollire per 5 minuti. I residui vegetali sono stati precipitati mediante centrifugazione per 1 minuto a 14.000 rpm in microcentrifuga Eppendorf. Dieci µl di surnatante sono stati sottoposti a elettroforesi in minigel discontinuo denaturante di poliacrilamide (10% stacking gel, 12.5% resolving gel, vedi tabella sottostante) contenente SDS (SDS-PAGE) in tamponi per elettroforesi (tampone anodo: Tris base 0,2 M pH 8,0; tampone catodo: 12,1g Tris base, 17,92 g tricina, 1 g SDS, diluire a 1 l con H₂O) preparati secondo Shagger e von Jagow (1987).

Composizione di Stacking e Resolving Gel utilizzati in SDS-PAGE.

	Stacking gel	Resolving gel
H ₂ O	6.5 ml	
Glicerolo 30 %		5 ml
Tampone 3 M Tris pH 8.45 + SDS 0.3 %	2.5 ml	5 ml
Acrilamide-Bisacrilamide 30%	1.35 ml	5 ml
Ammonio persolfato (10 %)	100 µl	150 µl
Temed	10 µl	10 µl

Le proteine del gel sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (MSI) mediante trasferimento elettroforetico a corrente costante (200 mA) in tampone di trasferimento (25 mM Tris, 150 mM glicina, 20% metanolo) (Towbin e Gordon, 1984) con apparecchiatura BIORAD; la temperatura nel corso del trasferimento è stata mantenuta a 4° C. La membrana è stata poi sottoposta a colorazione Ponceau S (Sigma) (0.5% in 1% acido acetico) per visualizzare la concentrazione relativa delle proteine totali dei campioni. Il bloccaggio dei siti aspecifici di legame è stato eseguito tenendo immersa la membrana per 20 minuti in TBS Tween [0,05 M Tris (pH 7,4), 0,2 M NaCl e 2 ml/l di Tween 20] contenente il 7% di latte magro in polvere aggiunto di Na-azide. Per il riconoscimento della proteina capsidica di PPV è stato usato l' antisiero A279 preparato presso l'Istituto di Virologia Vegetale del CNR di Torino, diluito 1:1000 in TBS-Tween-

latte e incubato a 4° C tutta la notte. Sono stati effettuati 5 lavaggi della membrana con TBS Tween per 5 minuti ciascuno a temperatura ambiente.

L'anticorpo secondario coniugato con perossidasi di ravenello (Sigma) preparato in capra contro anticorpi di coniglio, è stato disciolto in TBS-Tween contenente latte magro in polvere ad una diluizione 1:5000 e incubato a 37 ° C per 60 minuti; seguivano 5 lavaggi da 5 minuti in TBS-Tween. Le bande che reagivano specificamente con l' anticorpo sono state evidenziate mediante reazione chemiluminescente usando il substrato "SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate" (Pierce) variando i tempi di esposizione della pellicola fotografica "Kodak" da 1 a 30 minuti.

2.5 Clonaggio del gene che codifica per la proteina capsidica di PPV nel vettore di espressione pBin61 e agroinfiltrazione in *N. benthamiana*

2.5.1 Preparazione del vettore di clonaggio

Come vettore di clonaggio per il gene che codifica la proteina capsidica di PPV è stato utilizzato il plasmide binario pBin61 di circa 12900 bp (Ratcliff *et al.*, 2001). Il marcatore di selezione presente conferisce resistenza all'antibiotico kanamicina. Il plasmidio è stato linearizzato mediante reazione di restrizione a 37° C per 3 ore con l'enzima *Bam*HI (Promega), che taglia in corrispondenza del nucleotide in posizione 20, tra promotore 35S e terminatore Nos rilasciando estremità non coesive. La miscela di reazione è stata così preparata, per un totale di 100 µl: 40 µl plasmidio (174 ng/µl), 10 µl tampone 10X, 43 µl acqua distillata sterile aggiunta di BSA 1:100, 2 µl enzima di restrizione *Sma*I (10 U/ µl).

Per evitare il rilegamento spontaneo del vettore digerito, il plasmidio è stato defosforilato utilizzando l'enzima "shrimp alkaline phosphatase" (Promega), che rimuove il gruppo fosfato dall'estremità 5'. La miscela è stata incubata per 30 minuti a 37°C. Successivamente l'enzima è stato inattivato per shock termico a 70° C per 15 minuti.

Si è proseguito con la purificazione del vettore, utilizzando il kit “GeneClean kit II” (qBiogene) seguendo le indicazioni suggerite dalla ditta. Il plasmidio è stato diluito in 50 µl di acqua ultrapura sterile e conservato a -20° C fino al momento dell’uso.

2.5.2 *Reazione di ligasi*

Nel vettore pBin61 linearizzato con *SmaI* è stata inserita la banda purificata da gel ottenuta dal vettore pGEM-CP-PPV (paragrafo 2.2.7) digerito con l’enzima *EcoRI* e sottoposto a reazione di Klenow in presenza di dNTPs (al fine di rendere le estremità “blunt”). La reazione è avvenuta nelle seguenti proporzioni: 10 µl banda, 5 µl di plasmidio digerito, 3 µl di tampone 10X (50 mM acetato di potassio, 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato di magnesio, 1 mM DTT, pH 7,9) e 1 µl di T4 DNA ligasi 3 U/µl (Promega). La reazione di ligasi è stata incubata in acqua e ghiaccio per una notte.

2.5.3 *Trasformazione di cellule competenti di E. coli*

La trasformazione è stata effettuata tramite shock-termico come riportato al paragrafo 2.2.11.

2.5.4 *Analisi delle colonie derivate dalla trasformazione*

Di ciascuna colonia è stato analizzato il DNA plasmidico per la presenza dell’inserito mediante reazione di restrizione con l’enzima *EcoRI*, presente in due siti del plasmide pBin61 a cavallo del sito di inserzione *SmaI*. Ulteriore conferma dell’avvenuto inserimento della banda corrispondente all’“hairpin” di PPV nel vettore è stata ottenuta mediante sequenziamento con l’oligonucleotide pBin-F (5’-tgatgtgacatctccactg-3’).

2.5.5 *Coltura delle colonie ed estrazione del DNA plasmidico*

Le colonie trasformanti selezionate sono state usate per inoculare 2 ml di substrato LB contenente kanamicina (50 µg/ml) e fatte crescere a 37° C in agitazione per 16 ore.

Il DNA plasmidico è stato purificato con il kit “QIA prep Spin Miniprep” (Qiagen), seguendo il protocollo suggerito dalla ditta, risospeso in 50 µl di acqua sterile e conservato a -20° C.

Il DNA purificato è stato sottoposto a digestione enzimatica per confermare la presenza del segmento. La reazione è stata allestita in un volume finale di 20 μ l: 3 μ l di DNA (~ 2 μ g) sono stati uniti a 2 μ l 10X tampone (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1mM DTT pH 7,9), 15 μ l acqua, 0,5 μ l di *Bam*HI. La miscela è stata incubata per tutta la notte a 37° C, i prodotti analizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1% in TBE e visualizzazione delle bande ai raggi UV.

2.5.6 Trasformazione di cellule competenti di *A. tumefaciens*

La trasformazione è stata effettuata tramite shock-termico. Cellule competenti del ceppo C58C1 di *Agrobacterium tumefaciens*, preparate secondo il protocollo descritto da Hofgen (1998) e conservate a -80 °C, sono state incubate in ghiaccio per 2-3 ore; sono stati aggiunti 1-2 μ g di DNA plasmidico e la sospensione è stata incubata per 5 minuti in ghiaccio, per 5 minuti in azoto liquido, quindi per altri 5 minuti a 37° C. Dopo l'aggiunta di 1 ml di substrato YEB [5 g/l triptone (Difco), 1 g/l estratto di lievito (Difco), 5 g/l estratto di carne (Difco), 5 g/l saccarosio, 2 mM MgSO₄], sono state fatte crescere a 28° C per 3 ore. Si procedeva quindi all'inoculazione su substrato agarizzato, YEB con aggiunta di 15 g/l bactoagar (Difco), contenente kanamicina (50 μ g/ml) e tetraciclina (5 μ g/ml).

2.5.7 Agroinfiltrazione

L'infiltrazione del clone ricombinante di *A. tumefaciens* nei tessuti fogliari di *N. benthamiana* permette l'espressione transiente *in vivo* dei geni di interesse; di seguito è illustrata la metodologia utilizzata.

Le cellule batteriche conservate a -80° C sono state utilizzate per inoculare 5 ml di mezzo liquido [YEB + kanamicina (50 μ g/ml) e tetraciclina (5 μ g/ml)] tenuto in agitazione per 16 ore a 28° C e in seguito trasferite in 50 ml dello stesso mezzo addizionato dei due antibiotici, di 10 mM MES (acido 2-N-morfolinoetansulfonico) pH 6,3 e 100 μ M acetosiringone, componenti necessari all'induzione dei geni *vir*. I batteri sono stati coltivati a 28° C mantenendoli in agitazione per 16 ore e quindi precipitati

mediante centrifugazione per 10 minuti a 10000 rpm in centrifuga Sorvall RC5B; il pellet è stato risospeso in 50 ml di una soluzione contenente 10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 1 mM acetosiringone; la sospensione è stata lasciata per 3 ore a temperatura ambiente prima dell'infiltrazione.

Le cellule batteriche sono state infiltrate nel tessuto fogliare con l'ausilio di una siringa da 5 ml senza ago; esercitando una leggera pressione sulla pagina inferiore della foglia si ottiene una distribuzione uniforme della sospensione all'interno del mesofillo, fino ad occupare una superficie pari al 60-70% dell'intera area fogliare. Per l'agroinfiltrazione sono state scelte piante di *N. benthamiana* a distanza di 15-20 giorni dalla semina.

Come controllo negativo è stato usato il plasmide pBin61 con all'interno il segmento S di TSWV isolato Br01 gentilmente messo a disposizione dal Dott. Turina dell'Istituto di Virologia Vegetale (IVV)-CNR di Torino.

Le piante di *N. benthamiana* sono state infettate con PPV a 2 giorni dall'agroinfiltrazione. La trasmissione è avvenuta per via meccanica, come descritto al paragrafo 2.1.1, sulle foglie già agroinfiltrate.

2.6 Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)

I campioni, provenienti dalle foglie infiltrate e non-, sono stati collezionati a 6 giorni dall'infezione con PPV e sottoposti ad analisi DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA) secondo il metodo diretto, utilizzando il protocollo indicato da Clark e Adams (1977). I campioni sono stati macinati in sacchetti di polietilene con tampone di estrazione (Tab. 2.3) in rapporto 1/10 p/V. Le piastre di polistirene a 96 pozzetti (Costar, high binding) sono state sensibilizzate con le IgG specifiche per PPV (Bioreba) diluite in tampone Na-carbonato pH 9,6 (Tab. 2.3) ed incubate a 37 °C per 3 ore. Le piastre sono state successivamente lavate per tre volte con tampone-fosfato PBSt (Tab. 2.3) lasciato agire per 3 minuti. Dopo aver addizionato il succo estratto dai campioni, le piastre sono state incubate tutta la notte a 4 °C e sottoposte a lavaggio come descritto sopra. Sono state addizionate le IgG coniugate con fosfatasi alcalina e diluite in tampone PBSt (1:1000) e la reazione è stata incubata a 37°C per 3 ore. Ancora una volta si è provveduto

al lavaggio delle piastre come sopra. Infine si è aggiunta la soluzione substrato: 1 mg/l di p-nitrofenilfosfato in tampone substrato pH 9,8 (Tab. 2.3).

Ogni campione è stato ripetuto in 2 pozzetti, distribuiti nelle piastre ELISA. In ogni piastra è stato posto il materiale vegetale infetto (controllo positivo), il succo vegetale esente da virus (controllo negativo) e il tampone d'estrazione. La valutazione dell'intensità di colorazione dei pozzetti è stata effettuata con un fotometro Dynatech MR 700 a 405 nm di lunghezza d'onda. Sono stati considerati infetti i campioni con un valore medio di assorbanza a 405 nm di almeno tre volte superiore al valore medio del controllo sano.

Tampone fosfato salino (PBS)	NaCl 8 g, KH ₂ PO ₄ 0,2 g/l, Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O, KCl 0,2 g in acqua distillata; pH 7,4
Tampone PBSt	0,5 ml Tween 20 ogni l tampone PBS
Tampone d'estrazione	Na ₂ SO ₃ 1,3 g, PVP 25000 20 g, ovoalbumina 2 g in tampone PBS
Tampone carbonato	Na ₂ CO 1,59 g, NaHCO ₃ 2,93 g in acqua distillata; pH 9,6
Tampone substrato	97 ml dietanolamina in acqua distillata; pH 9,8

Tab. 2.3. Composizione dei tamponi usati per il test ELISA. Le quantità si riferiscono ad un volume finale di un litro.

2.7 Quantificazione dell' mRNA di *ChIH* tramite Real-Time RT-PCR

2.7.1 Estrazione dell'RNA da foglie di *N. benthamiana*

L'RNA virale è stato estratto da ~75 mg di tessuto proveniente dalle foglie non inoculate, mostranti i sintomi del silenziamento genico, utilizzando il kit RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. L'RNA è stato eluito in 100 µl di acqua distillata sterile.

2.7.2 Digestione del DNA

Ciascun campione di RNA (2 µl) è stato incubato per 30 minuti a 37° C con 2 µl Dnasil (Fermentas, Hanover, MD, USA), 2 µl di buffer 10X (100mM Tris-HCl pH 7,5, 25mM MgCl₂, 1mM CaCl₂) e 14 µl di acqua distillata sterile. La reazione è stata addizionata con 1 µl di EDTA 25 mM e incubata per altri 15 minuti a 37° C.

2.7.3 Sintesi della catena di DNA complementare

La catena di DNA complementare (cDNA) all'RNA virale è stata ottenuta con una reazione di trascrizione inversa. Cinque µl di RNA trattato con DNAsi sono stati uniti a 3,5 µl di acqua sterile e 1,5 µl di una miscela di "random primer" (0,5 µg/µl) ed incubati a 65° C per 5 min, per eliminare eventuali strutture secondarie presenti all'interno della singola elica di RNA, e quindi trasferiti prontamente in ghiaccio. Successivamente sono stati aggiunti 10 µl di una soluzione con 4 µl di tampone 5X (250 mM Tris-acetato pH 8,4, 375 mM acetato di potassio, 40 mM acetato di magnesio), 1,25 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTPs, 2 µl di acqua sterile, 0,1 µl di RNaseOUT (40 U/µl) e 0,1 µl di M-MLV (15 U/µl). La reazione è stata incubata per 1 ora a 37° C.

2.7.4 Real-Time PCR

Per la quantificazione relativa dell'RNA messaggero codificante per *ChlH* si è impiegata la tecnica di Real-Time PCR che misura la quantità di acidi nucleici presenti nel campione durante la fase esponenziale della reazione a catena della polimerasi. Durante tale fase c'è infatti una correlazione diretta fra la quantità di template iniziale e la fluorescenza derivante dal prodotto di PCR e rilevata dalla macchina. Come controllo endogeno si è utilizzato il gene ribosomiale 18s di *N. benthamiana* rispetto al quale è stato calcolata la quantità di *ChlH* mRNA.

E' stata impiegata la chimica del SYBR[®] GREEN, colorante fluorescente che si intercala in modo aspecifico alle molecole a doppia catena di DNA e quindi ai prodotti di PCR. La coppia di primers per la quantificazione di *ChlH* mRNA è stata disegnata al di fuori della regione clonata all'interno del vettore virale per assicurarsi che il cDNA amplificato derivasse dal solo mRNA di *N. benthamiana*, usando il programma Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Una serie di sei diluizioni (in

duplicato) di campioni di RNA di *N. benthamiana* è stata usata per ottenere una curva standard per le due coppie di primers. L'efficienza di amplificazione di ciascuna coppia di primer è stata calcolata dalla pendenza della curva standard usando la formula $E=10^{1/s-1}$ (s, slope = pendenza). Il fatto che entrambe le coppie di primers avessero la stessa efficienza di reazione ha permesso di usare il metodo comparativo ($\Delta\Delta C_t$ method) per l'analisi dei dati ottenuti (User Bulletin #2, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, pag. 11-15). Per le reazioni di Real-Time PCR sono state utilizzate piastre con 96 pozzetti (Applied Biosystems) in cui è stata aliquotata (20 μ l) una miscela di reazione così composta: 12,5 μ l di 2X SYBR[®] GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1 μ l di ciascun primer (7,5 nmol/ml) (Tab. 2.4), 5,5 μ l di acqua distillata sterile. Alla miscela sono stati aggiunti 5 μ l di cDNA (diluito 1:200). Per la reazione si è impiegato il termociclatore ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con le seguenti condizioni standard di amplificazione: 10 minuti iniziali per l'attivazione della Taq polimerasi e denaturazione del DNA seguiti da 40 cicli di 15 secondi di denaturazione a 95 °C e 1 minuto a 60°C per l'appaiamento dei primers ed elongazione. Al termine della reazione si è eseguita la caratterizzazione del prodotto di PCR tramite l'analisi della curva di melting. Essa permette di discriminare tra il segnale fluorescente derivante dai prodotti di PCR specifici ed eventuali prodotti secondari (dimeri di primer o altri artefatti della PCR) a cui il SYBR[®] GREEN potrebbe essersi intercalato.

Frammento amplificato	Oligonucleotidi	Sequenza 5'-3'	Amplicone Bp
<i>ChlH</i>	Forward	agcgtgaccttggtaggaa	94
	Reverse	tggaggttcaccaatgatgtga	
18s rRNA	Forward	tacgccccgccaaa	65
	Reverse	cactggcagtccttcgtgagt	

Tab. 2.4. Coppie di oligonucleotidi utilizzate in Real-Time PCR e relative sequenze nucleotidiche.

2.8 Analisi statistica

Per dimostrare la validità statistica dei risultati ottenuti in Real-Time PCR i dati sono stati elaborati in Excel con il test di Tukey-Kramer HSD ($p=0,05$). Per ciascun vettore sono stati analizzati cinque diversi campioni biologici in duplicato.

2.9 Inoculazione di pesco

2.9.1 Vettore TBSV con promotore T7e trascrizione *in vitro*

La prova di trasmissione di TBSV a piante di pesco (GF305) è stata effettuata in due fasi: inizialmente sono state inoculate piante di *N. benthamiana* come descritto nel paragrafo 2.3.2 con il vettore TBSV (pTBSV-100), derivante dalla sequenza completa del virus (Appendice I) (Hearne *et al.*, 1990). Le foglie di *N. benthamiana* infette sistemicamente sono state raccolte dopo 3-4 giorni e sono state usate come fonte di inoculo per le piante di pesco. Il tessuto infetto di *N. benthamiana* è stato omogeneizzato in mortaio con tampone fosfato 0,01 M pH 7, ottenendo una sospensione usata per l'inoculazione meccanica delle foglie di pesco, preventivamente cosparse di polvere abrasiva (Carborundum).

2.9.2 Vettore TBSV con promotore 35S e transfezione biolistica

Per questa prova si è usato un vettore TBSV a cDNA, anch'esso derivante dalla sequenza nucleotidica completa di TBSV ma con promotore 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV, Cauliflower mosaic virus) (Appendice I). Grazie a tale promotore, l'RNA infettivo viene prodotto direttamente *in planta*, facilitando il protocollo di infezione e diminuendo il costo dell'allestimento di ciascun esperimento.

Il DNA è stato inoculato tramite transfezione biolistica. Tale metodica comporta, in questo caso, il bombardamento delle foglie con particelle d'oro colloidale cui viene coniugato il vettore a DNA che si intende introdurre nelle cellule. Le particelle d'oro vengono quindi accelerate con un getto di elio ad alta pressione (400 psi) in maniera tale da attraversare la parete e la membrana cellulare e penetrare all'interno della cellula. La procedura di transfezione è stata eseguita tramite un sistema di tipo commerciale (Helios

Gene Gun System, BIORAD, USA) seguendo la procedura descritta dalla ditta produttrice.

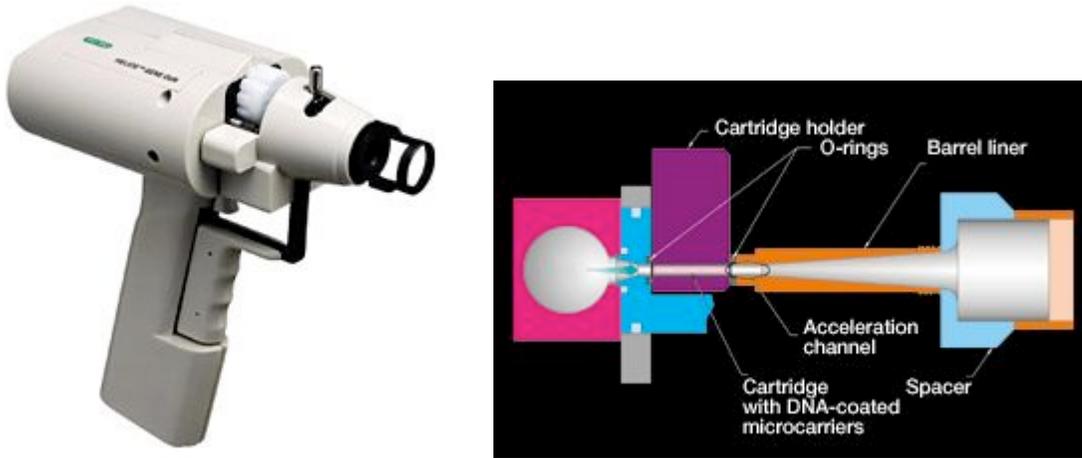


Fig. 2.1. Fotografia di Helios gene gun (a sinistra); rappresentazione schematica di come le particelle d'oro vengono accelerate all'interno del sistema (a destra).

Ad una settimana dall'inoculo le foglie di pesco ancora in fase di sviluppo e non direttamente infettate sono state raccolte e si è estratto l'RNA come descritto al paragrafo 2.7.1. L'RNA è stato sottoposto ad analisi RT-PCR come ai paragrafi 2.2.3 e 2.2.4, con l'uso degli oligonucleotidi indicati in tabella:

Frammento amplificato	Oligonucleotidi	Sequenza 5'-3'	Amplicone (bp)
Replicasi	TBSV1-F TBSV1335-R	gaaattctccaggatttctcg cctcctgaggaagtaacaca	1134

Successivamente l'RNA estratto è stato usato per infettare nuovamente piante sane di *N. benthamiana*. Ogni foglia è stata inoculata con 10 µl di RNA (200-300 µg/ml) miscelati a 10 µl di FES Buffer come descritto al paragrafo 2.3.2. Ad una settimana dall'inoculo le piante di *N. benthamiana* sono state nuovamente saggate tramite RT-PCR per verificare la presenza di TBSV.

3. Risultati

3.1 Resistenza alla sharka mediante VIGS

L'RNA infettivo ottenuto *in vitro* dai cloni ricombinanti del vettore TBSV é stato inoculato meccanicamente su piante di *N. benthamiana* per l'induzione del silenziamento genico del virus della sharka. Le piante, inoculate a quattro settimane dalla semina, sono state tenute sotto osservazione per esaminare le reazioni sintomatologiche indotte dall'inoculo.

Nel caso delle piante di *N. benthamiana* inoculate con il vettore di controllo TBSV sGFP non esprime p19, l'infezione virale non induce la necrosi sistemica tipica dell'infezione da TBSV "wild type", che raggiunge gli apici vegetativi e provoca il collasso della pianta a quattro giorni dall'inoculo (Scholthof *et al.*, 1995a). I sintomi sono infatti molto più lievi, limitandosi ad una leggera bollosità delle foglie inoculate, permettendo alle piante lo sviluppo di fiori e semi (Fig. 3.1).



Fig. 3.1. Infezione da TBSV sGFP (-p19) su *N. benthamiana* 7 dpi.

Anche sulle piante di *N. benthamiana* infettate coi vettori con il gene della CP di PPV i sintomi sono in generale non gravi; nel caso del vettore esprime p19 le foglie sviluppano tuttavia un leggero mosaico e arricciamento (Fig. 3.2).



Fig. 3.2. Infezione da TBSV- CP su *N. benthamiana* 7 dpi: p19 (+) a sinistra, p19 (-) a destra.

A tre giorni dall'inoculo con i vettori ricombinanti, le piante di *N. benthamiana* sono state infettate con il virus della sharka sulle foglie già inoculate oppure sulle foglie sviluppatesi successivamente, per valutare una possibile differenza nella risposta della pianta. Le piante infettate preventivamente con TBSV-CP p19 (-) (pD-b) e il controllo TBSV sGFP hanno sviluppato un lieve mosaico a livello sistemico, con nessuna differenza osservabile a livello fenotipico (Fig. 3.3).



Fig. 3.3. Piante di *N. benthamiana* inoculate con TBSV sGFP(a sinistra) e pD-b (a destra) e infettate con PPV dopo 4 giorni.

Anche nel caso dell'infezione da TBSV-CP p19 (+) (pD-a), a seguito dell'inoculo con PPV si é osservato un mosaico diffuso a livello sistemico ma più accentuato e accompagnato da bollosità su alcune foglie (Fig. 3.4).



Fig. 3.4. *N. benthamiana* inoculata con pD-a ed infettata con PPV dopo 4 giorni. Particolare di una foglia con mosaico e bollosità (a destra).

La presenza di PPV a livello sistemico è stata saggiata mediante analisi “western” di campioni raccolti a distanza di 2-3 giorni dall'inoculazione con PPV. Estratti delle proteine totali ottenuti da piante infettate con i differenti vettori virali sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilammide e le proteine trasferite su membrana di nitrocellulosa. Come antisiero é stato utilizzato l'anticorpo per la proteina capsidica di PPV. Le reazioni sierologiche hanno evidenziato in ogni caso l'accumulo sistemico della proteina capsidica di PPV in quantità fra loro equiparabili (Fig. 3.5).

Tali dati, assieme all'assenza di una significativa differenza riscontrata a livello fenotipico, suggeriscono che i vettori TBSV con la sequenza genica parziale della CP di PPV inserita al posto della propria CP non sono efficaci nel silenziamento genico di PPV.

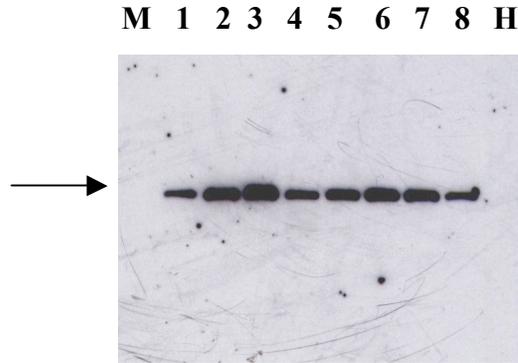


Fig. 3.5. Analisi “western” per la determinazione della presenza di PPV in piante di *N. benthamiana* inoculate con i vettori ricombinanti e successivamente infettate con PPV. Autoradiografia di membrana sviluppata con substrato chemiluminescente per l’espressione della proteina capsidica di PPV. Nelle corsie: M) low molecular weight marker; 1) controllo positivo; 2) TBSV sGFP+ PPV su foglia inoculata; 3) TBSV sGFP+ PPV su foglia sistemica; 4) pD-a + PPV su foglia inoculata; 5) pD-a + PPV su foglia sistemica; 6) pD-b + PPV su foglia inoculata; 7) pD-b + PPV su foglia sistemica; 8) controllo positivo; H) sano. La freccia indica la posizione della proteina capsidica di PPV (36 kDa).

3.2 Espressione del gene che codifica per la proteina capsidica di PPV mediante agroinfiltrazione in *Nicotiana benthamiana*

Allo scopo di verificare il funzionamento del solo frammento genico esogeno di PPV al di là di ogni possibile effetto dovuto al vettore virale, lo stesso frammento è stato clonato in un vettore binario pBin61 e trasferito all’interno di cellule di *Agrobacterium tumefaciens*.

L’infiltrazione del clone ricombinante di *A. tumefaciens* nei tessuti fogliari di *N. benthamiana* ha permesso di ottenere l’espressione transiente in vivo della sola sequenza derivante dalla CP di PPV per verificare l’efficacia del costrutto a forcina nel silenziamento di PPV. Sospensioni cellulari del ceppo C58C1 sono state inoculate in piante di *N. benthamiana* a distanza di 15-20 giorni dalla semina. A distanza di 2 giorni dall’infiltrazione, in corrispondenza del momento di massima espressione dei geni esogeni da parte di *A. tumefaciens* (Voinnet, 2003), le foglie infiltrate sono state inoculate meccanicamente con PPV.

I risultati del test ELISA sono riportati in grafico 3.1. Nel caso delle foglie infiltrate con pBin61-CP e successivamente inoculate con PPV si è registrata una

riduzione (~45%) del titolo virale rispetto alle foglie infiltrate con il controllo negativo pBin61-S. Anche nel caso delle foglie nuove si é registrato un calo sebbene di poco inferiore rispetto al controllo negativo (~23%).

E' opportuno osservare che nel caso del controllo negativo pBin61-S il titolo virale é risultato inferiore rispetto al malato (pianta di *N. benthamiana* infetta con PPV), probabilmente a causa della presenza di numerose cellule batteriche che rendono la pianta meno prona all'infezione virale.

I risultati del test ELISA indicano quindi che il costrutto a forcina realizzato sembra essere di per se' attivo nell'innesco del silenziamento genico di PPV.

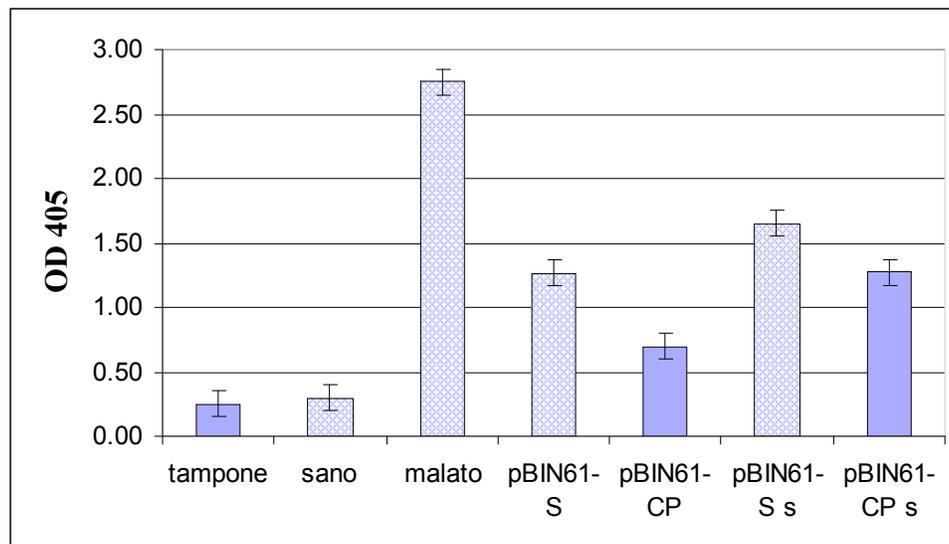


Grafico 3.1. Risultati del test ELISA per PPV. In ascissa sono riportati i campioni (s= foglia sistemica), in ordinata l'assorbanza.

3.3 Silenziamento genico del gene magnesio chelatasi in *N. benthamiana* con vettore ricombinante TBSV

3.3.1 Espressione dei vettori ricombinanti in *N. benthamiana*

L'RNA infettivo ottenuto *in vitro* dai cloni ricombinanti del vettore TBSV é stato inoculato meccanicamente su piante di *N. benthamiana* per l'induzione del silenziamento del gene magnesio chelatasi (*ChlH*). Le piante, inoculate a quattro settimane dalla semina, sono state tenute sotto osservazione per esaminare le reazioni sintomatologiche indotte dall'inoculo.

Per tutti i vettori (pPD-1, pPD-2, pPD-3, pPD-4), il silenziamento di *ChlH* è stato di facile osservazione a livello fenotipico con l'apparire di una clorosi a distanza di 3-4 giorni dall'inoculo. Le piante hanno sviluppato una colorazione giallo-bianca lungo le nervature, diffusa soprattutto nelle nuove foglie sviluppatesi al di sopra di quelle inoculate (Fig. 3.6).

A



B



C



D



Fig. 3.6. Piante di *N. benthamiana* inoculate con i vettori TBSV con *ChlH* (7 dpi).

A) pPD-1; B) pPD-2; C) pPD-3; D) pPD-4.

Tale manifestazione fenotipica non si é tuttavia estesa alle foglie piú giovani, che sono rimaste in ogni caso verdi (Fig. 3.7).

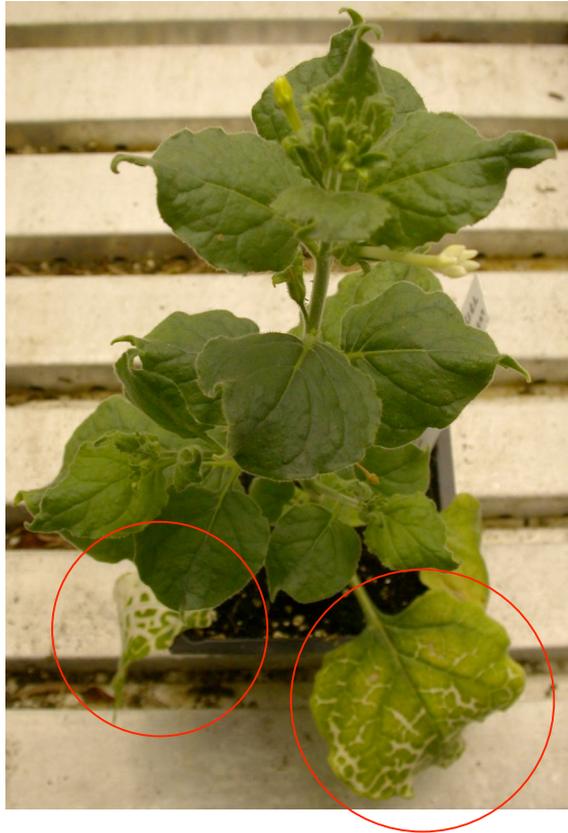


Fig. 3.7. *N. benthamiana* inoculata con pPD-4 (25 dpi). Le foglie con i sintomi del silenziamento di *ChlH* sono cerchiati in rosso.

Dall'analisi RT-PCR dell'RNA estratto da tali foglie e successivo sequenziamento dei prodotti di PCR ottenuti, il vettore TBSV é risultato essere presente, tuttavia privo dell'insero clonato al posto della CP (Fig. 3.8).

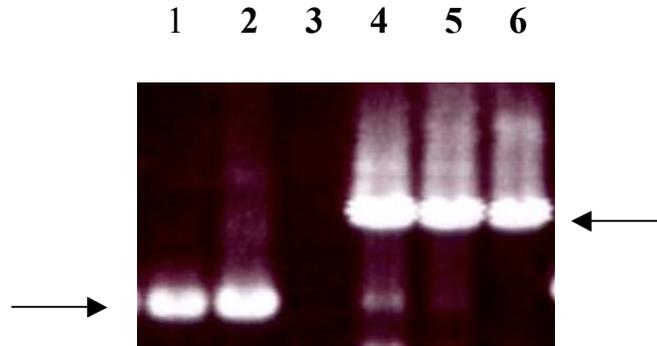


Fig. 3.8. Colorazione con bromurio di etidio di gel di agarosio in tampone TAE di prodotti di RT-PCR ottenuti dall'RNA estratto dalle foglie clorotiche e verdi di *N. benthamiana*. Corsia 1) pPD-1, foglia verde; corsia 2) pPD-2, foglia verde; corsia 3) sano; corsia 4) pPD-1, foglia clorotica; corsia 5) pPD-2, foglia clorotica; corsia 6) controllo positivo. La freccia in alto a destra indica un amplicone di ~420 bp, la freccia in basso a sinistra indica un amplicone di ~190 bp.

Anche nelle foglie interessate da clorosi, la colorazione giallo-bianca non ha interessato l'intera lamina ma si é limitata alle immediate vicinanze delle nervature. Inoltre le foglie, sia clorotiche che verdi, delle piante inoculate con pPD-1 e pPD-3 (entrambi esprimenti p19) apparivano arricciate. Come controllo sono state usate sia piante sane (*N. benthamiana* inoculata con solo tampone) che piante inoculate con TBSV sGFP. Come previsto, in tal caso non si é osservato alcun sintomo riconducibile al silenziamento di *ChlH* (Fig. 3.9). Infatti, le piante inoculate con TBSV sGFP hanno mostrato sintomi lievi e nessuna clorosi, indicando la specificità del silenziamento genico.

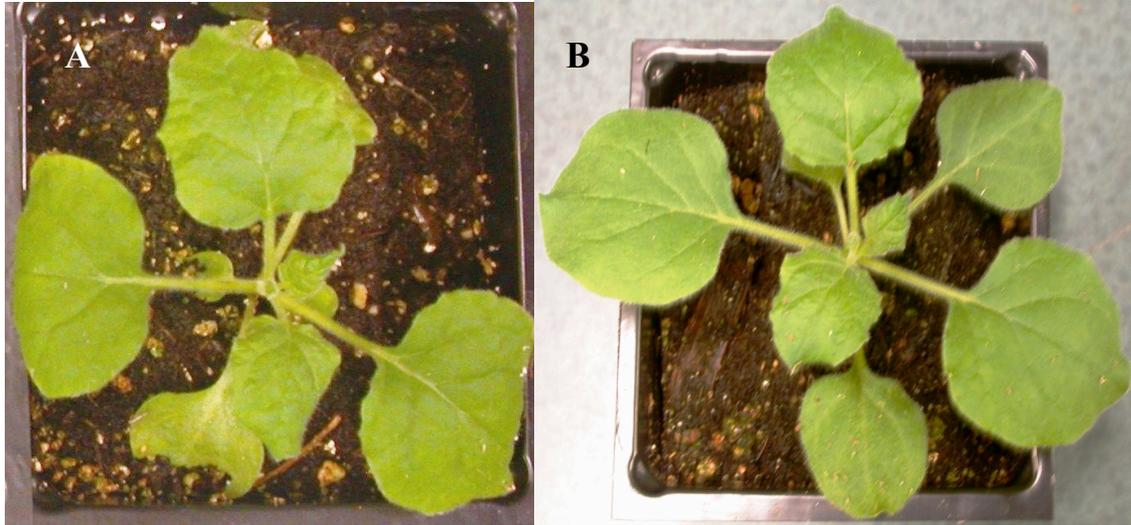


Fig. 3.9. Piante di *N. benthamiana* usate come controllo (7dpi). A) TBSV sGFP; B) sano.

Da queste osservazioni è quindi risultato che i vettori ricombinanti TBSV:

- sono efficaci nel silenziamento di un gene endogeno quale magnesio chelatasi;
- sono in egual misura efficaci se l'inserto esogeno è clonato in direzione senso o antisenso e se p19 è espressa o meno;
- come già osservato per altri costrutti (Scholtof *et al.*, 1996), tendono a ricombinare facilmente, perdendo l'inserto esogeno clonato al posto della sequenza per la CP;
- anche se privi del CP sono in grado di muoversi sistemicamente in *N. benthamiana*. L'efficacia del silenziamento si limita tuttavia alle primissime foglie che si sviluppano al di sopra di quelle inoculate.

3.3.2 Real-Time PCR per la quantificazione relativa dell'RNA messaggero di *ChlH* e analisi statistica dei dati

L'analisi Real-Time RT-PCR dell'RNA estratto dalle foglie clorotiche di *N. benthamiana* ha confermato il silenziamento già osservato visivamente e ha permesso una quantificazione dell'RNA messaggero di *ChlH*. Il silenziamento genico è risultato molto efficace, variando nell'intervallo 89.4-98.4 % (Grafico 3.2).

Nel caso di *N. benthamiana* sana non si è registrata alcuna diminuzione nell'accumulo dell'mRNA di *ChlH*, mentre per TBSV sGFP la percentuale è risultata estremamente bassa (11.3%) (Grafico 3.2).

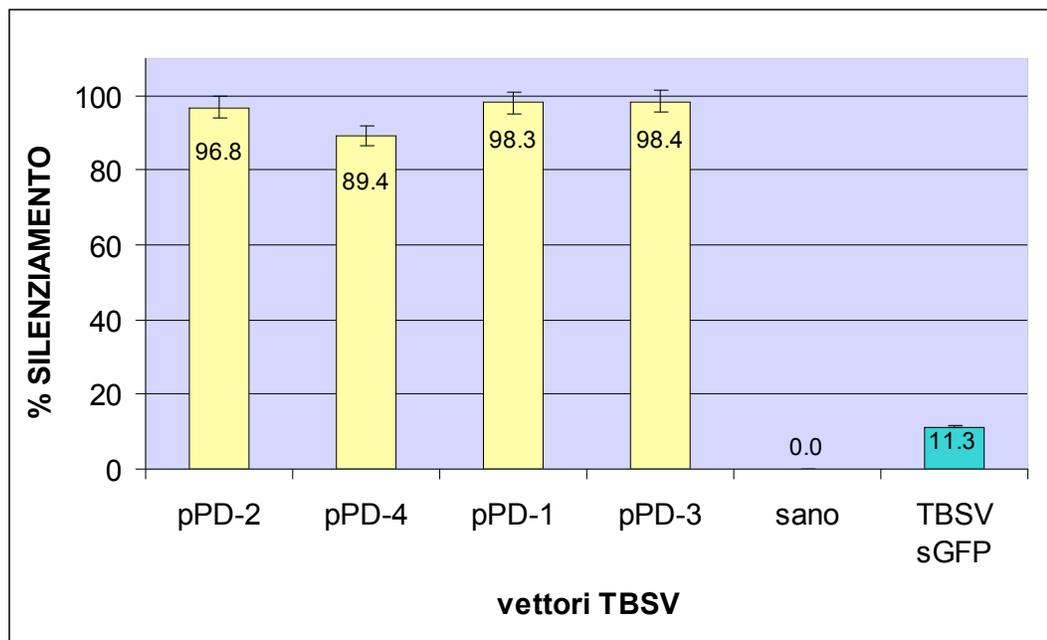


Grafico 3.2. Istogramma raffigurante l'efficacia del silenziamento di *ChlH*. In ascissa: vettori TBSV, in ordinata: silenziamento espresso in percentuale.

I vettori ricombinanti TBSV sono stati raggruppati usando il test di Tukey-Kramer HSD: il gruppo A comprende i controlli negativi (piante sane ed inoculate con TBSV sGFP), mentre i quattro vettori con *ChlH* fanno parte del gruppo B (Tab. 3.1).

Vettore TBSV	Media	Deviazione standard	%	Silenziamento (%)	Gruppo
pPD-2	0.03	0.05	3.2	96.8	B
pPD-4	0.11	0.14	10.6	89.4	B
pPD-1	0.02	0.01	1.7	98.3	B
pPD-3	0.02	0.01	1.6	98.4	B
Sano	1.15	0.22	115.4	-	A
TBSV sGFP	0.89	0.41	88.7	11.3	A

Tab. 3.1. Raggruppamento dei vettori TBSV in base al test di Tukey-Kramer.

L'analisi statistica ha perciò dimostrato che i dati relativi all'accumulo dell'mRNA di *ChlH* per i quattro vettori TBSV sono significativamente diversi da quelli ottenuti per i controlli.

3.4 Inoculazione di TBSV su pesco

3.4.1 *Trascrizione in vitro*

Il succo ottenuto da foglie sintomatiche di *N. benthamiana infettate* con l'RNA virale prodotto *in vitro* è stato utilizzato per trasferire l'infezione su piante di pesco (GF305).

A seguito dell'inoculo le piante di pesco non hanno mostrato alcuna reazione sintomatologica. La presenza di TBSV è stata confermata con analisi RT-PCR.

3.4.2 *Transfezione biolistica*

L'inoculo di TBSV tramite trasfezione biolistica si è dimostrato efficace accelerando le particelle d'oro con un getto di elio alla pressione di 400 psi e ad una distanza di zero centimetri dalla foglia bersaglio. L'area fogliare in cui il bombardamento è stato circoscritto è stata interessata da necrosi per la morte delle cellule colpite direttamente dalle particelle-proiettile. Le lesioni fogliari si sono sviluppate velocemente dopo uno-due giorni dall'inoculo andando a formare un'unica area necrotica (Fig. 3.10).



Fig. 3.10. Pianta di pesco inoculata con TBSV tramite trasfezione biolistica (15 dpi). Le aree fogliari interessate da necrosi sono cerchiare in rosso.

Le piante di pesco non hanno sviluppato alcun altro sintomo riconducibile a TBSV a seguito dell'inoculo.

L'analisi RT-PCR dell'RNA estratto dalle foglie di pesco non direttamente infettate ed in via di sviluppo ha confermato l'infezione da TBSV (Fig. 3.11).

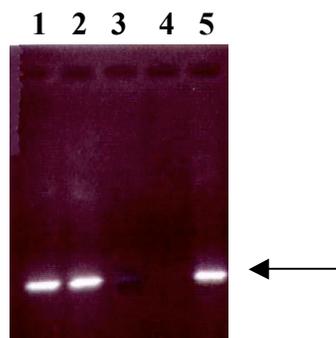


Fig. 3.11. Colorazione con bromurio di etidio di gel di agarosio in tampone TAE di prodotti di RT-PCR ottenuti dall'RNA estratto dalle foglie di pesco. Corsia 1) foglia inoculata; corsia 2) foglia sistemica; corsia 3) sano; corsia 4) controllo negativo; corsia 5) controllo positivo. La freccia a destra indica un amplicone di ~1130 bp.

L'RNA estratto dai peschi infetti sistemicamente é stato utilizzato per trasferire l'infezione su piante di *N. benthamiana* sane. A quattro giorni dall'inoculo tali piante hanno mostrato un lieve mosaico accompagnato da arricciamento fogliare (Fig. 3.12). Tali sintomi si sono aggravati in un collasso fogliare, che ha portato alla morte della pianta ad una decina di giorni dall'inoculo.

I risultati delle due prove di inoculazione suggeriscono che il pesco può fungere da pianta ospite per TBSV e che quest'ultimo potrebbe essere usato con successo come vettore virale anche in questo ospite arboreo.



Fig. 3.12. Pianta di *N. benthamiana* inoculata con l'RNA estratto da pesco (7 dpi).

4. Discussione

Scopo fondamentale di questo lavoro è stato lo sviluppo di un vettore virale che potesse essere impiegato come mezzo per la lotta alla sharka, la più grave affezione virale per le drupacee coltivate causata dal virus della vaiolatura delle drupacee (PPV).

Negli ultimi quindici anni grazie all'utilizzo di tecniche d'ingegneria genetica ci sono stati risultati positivi nell'ottenimento della resistenza al PPV sia in piante ospiti erbacee che arboree.

Il primo frammento genico virale impiegato per generare la resistenza mediata dal patogeno (Pathogen-Derived Resistance), e allo stesso tempo il più usato, è il gene della proteina capsidica. L'osservazione di una qualche forma di resistenza (o tolleranza) in piante transgeniche di *Nicotiana benthamiana* e *N. clevelandii* è stata inizialmente interpretata formulando due ipotesi fra loro non esclusive. In particolare, la resistenza è stata attribuita all'inibizione del movimento virale dal sito di infezione primaria alle foglie superiori per l'accumulo della CP, o alternativamente all'interferenza diretta con la decapsidazione, con conseguente inibizione del processo infettivo (Regner *et al.*, 1992). Nel caso in questione, tuttavia non si riusciva a giustificare il fatto che la resistenza non è proporzionale alla quantità di proteina transgenica espressa ed accumulata nelle cellule.

Studi successivi hanno dimostrato che il gene per la proteina capsidica non è l'unica sequenza virale capace di conferire resistenza all'infezione da PPV; le sequenze nucleotidiche che codificano per N1b (Guo e Garcia, 1997) e per P1 (Tavert-Roudet *et al.*, 1998) sono state infatti usate con successo.

A livello molecolare, la caratterizzazione della resistenza ha poi mostrato una evidente riduzione dell'RNA transgenico prodotto, che ha suggerito che alla base dei risultati osservati ci fosse un meccanismo mediato dall'interferenza dell'RNA piuttosto che dall'azione di una proteina (Guo e Garcia, 1997; Scorza *et al.*, 2001). Questa interpretazione è stata successivamente confermata dall'ottenimento di resistenza per mezzo di costrutti a forcina, che non esprimono alcuna proteina e che sono in grado di indurre il silenziamento del genoma virale (Pandolfini *et al.*, 2003; Di Nicola-Negri *et al.*, 2005).

Tuttavia, proprio perchè questi studi sono basati sull'ottenimento di piante transgeniche, si è voluto tentare una nuova strategia di difesa efficace e possibilmente compatibile con le normative europee in campo di OGM.

Dagli studi effettuati da diversi laboratori (Scorza *et al.*, 2001; Hily *et al.*, 2005; Di Nicola-Negri *et al.*, 2005) è stato dimostrato come nel caso delle piante transgeniche il meccanismo su cui basa la resistenza sia quello del silenziamento genico post-trascrizionale.

Date queste premesse si è quindi pensato ad una strategia fondata sullo stesso tipo di meccanismo di resistenza, che però fosse stimolato dall'uso di un vettore virale (VIGS) anzichè mediante l'ottenimento di piante transgeniche.

Il vettore virale scelto deriva dal virus del rachitismo cespuglioso del pomodoro (TBSV) perchè, oltre ad essere un ottimo virus modello per lo studio delle interazioni ospite-patogeno (Yamamura e Scholthof, 2005), ha molteplici piante ospiti fra cui specie arboree. Si è quindi pensato ad una sua possibile sperimentazione non solo sulla pianta ospite modello *N. benthamiana*, ma anche su pesco.

4.1 Resistenza alla sharka mediante VIGS

I risultati ottenuti negli esperimenti di espressione eterologa tramite vettore TBSV hanno mostrato l'inefficacia del sistema nel conferire resistenza al PPV in *N. benthamiana*.

Tra le varie ipotesi che si possono formulare per spiegare il mancato funzionamento c'è quella dell'inefficacia del costrutto a forcina nello stimolare il silenziamento genico post-trascrizionale dell'RNA virale. Questa ipotesi è stata testata attraverso gli esperimenti di agroinfiltrazione, che però hanno mostrato come il costrutto sia invece di per sè funzionante. Gli stessi esperimenti hanno mostrato come il costrutto sembra funzionare nelle foglie direttamente infiltrate ed inoculate, mentre nelle foglie sviluppatesi successivamente l'efficacia diminuisce drasticamente. Questa osservazione concorda con il tipo di espressione che è infatti transiente nel caso dell'agrobatterio e indica come il silenziamento genico sia innescato e perduri nel tempo e nello spazio solo fino a quando la molecola induttrice è presente.

In tal senso, un'ulteriore spiegazione del fallimento degli esperimenti di inibizione della replicazione di PPV tramite VIGS nel caso dell'inoculo con l'RNA virale trascritto *in vitro* potrebbe essere il tempo intercorso fra il primo inoculo e il successivo con il PPV (3 giorni). Tale intervallo temporale potrebbe essere risultato infatti troppo lungo per cui il vettore avrebbe perso la sua efficacia prima dell'inoculo con PPV. Questa ipotesi risulta tuttavia improbabile nel caso dell'infezione con un vettore virale in cui lo stimolo nella pianta viene mantenuto nel tempo, a differenza di quanto avviene per l'agroinfezione. Viceversa l'intervallo fra i due inoculi potrebbe essere stato invece non sufficiente per l'iniziazione di un segnale sistemico, che avrebbe dovuto raggiungere i tessuti non inoculati e destinati ad essere infettati con PPV. Inoltre, in quest'ultimo caso bisogna anche considerare l'efficacia di trascrizione dell'inserito a forcina all'interno dell'RNA virale, che non è stata saggiata e che potrebbe non aver raggiunto livelli elevati.

Anche la specie di pianta ospite scelta come modello potrebbe aver influito sui risultati ottenuti. *Nicotiana benthamiana* è infatti una specie particolare all'interno del genere *Nicotiana* per via della sua estrema suscettibilità a molti virus, che può portare alla morte repentina della pianta. La causa di questa sua iper suscettibilità alle infezioni virali può essere ricondotta alla mancanza di attività di una RNA polimerasi RNA-dipendente indotta dall'acido salicilico, dovuta alla naturale mutazione del gene RDR1 (Yang *et al.*, 2004). La presenza di questa forma mutata di RNA polimerasi interferisce negativamente con la resistenza mediata dal silenziamento genico, permettendo al virus di accumularsi in larga quantità.

Un ulteriore fattore da tenere in considerazione nella nostra analisi è l'interazione fra i due virus coinvolti: TBSV e PPV. Questo fenomeno è noto con il nome di sinergismo (plant viral synergism) ed ha come effetto lo sviluppo di sintomi più severi di quelli derivanti dalla somma dei due virus. La maggior parte delle malattie causate da una infezione virale mista vede la presenza di un potyvirus, nel nostro caso rappresentato da PPV. Tali infezioni miste sono accompagnate da sintomi molto gravi, spesso correlati ad un aumento nell'accumulo del solo virus "non-poty" (Vance, 1991), con i geni P1/HC-Pro responsabili dell'attivazione in trans della replicazione del virus eterologo (Pruss *et al.*, 1997). L'interazione fra TBSV e PPV potrebbe avere interferito quindi con il

meccanismo del silenziamento genico post-trascrizionale, mascherando così ogni suo possibile effetto.

Un'altra ipotesi riguarda il vettore TBSV di per sé. Sebbene infatti sia stato dimostrato che tale vettore privato del gene che codifica per la proteina capsidica sia in grado di muoversi sistemicamente in alcuni ospiti fra cui *N. benthamiana*, la sua capacità di movimento risulta inferiore rispetto all'isolato wild-type e i sintomi che ne derivano sono meno gravi (Desvoyes e Scholthof, 2002; Scholthof *et al.*, 1993). E' stato inoltre postulato come la presenza della CP permetta il passaggio del virus dal floema alle cellule del mesofillo come virione (Qu e Morris, 2002). Il vettore da noi usato, non codificando per il CP, potrebbe avere una minore efficienza sulla sua capacità di invasione sistemica della pianta, lasciando così via libera al PPV di colonizzare la pianta nonostante quest'ultimo sia stato inoculato per ultimo.

Un'altra caratteristica peculiare di TBSV e dei vettori virali in generale che deve essere ricordata è la relativa facilità di ricombinazione che porta alla perdita dell'inserito inserito all'interno del loro genoma (Scholthof *et al.*, 1996, Guo *et al.*, 1998, Zhong *et al.*, 2005). Se il vettore virale perde l'inserito rapidamente a seguito della sua inoculazione il silenziamento genico dell'RNA messaggero target con omologia di sequenza può non venire innescato oppure può essere rapidamente superato.

Infine, riguardo alla proteina p19 soppressore del silenziamento genico post-trascrizionale, non sono state osservate differenze rilevanti in termini di efficacia fra il vettore virale esprime o meno questa proteina. A livello fenotipico la presenza della proteina capsidica di PPV potrebbe inoltre aver attenuato i sintomi necrotici che normalmente p19 causa in *N. benthamiana*.

Al di là di queste ipotesi, il silenziamento genico indotto attraverso l'uso di un vettore virale contro un altro virus non è mai stato tentato per cui nell'interazione fra i due agenti infettivi potrebbero esserci ulteriori complicazioni ancora sconosciute. Rimane infatti un punto oscuro il fatto che il silenziamento di PPV funzioni nel caso delle piante transgeniche e dell'agroinfiltrazione con pBin, ma non nel caso di VIGS. E' forse possibile che le vie metaboliche di difesa della pianta vengano alterate con il primo inoculo virale al punto tale da prevenire l'instaurarsi di una qualsiasi forma di silenziamento genico contro PPV (Kasschau *et al.*, 2003).

4.2 Silenziamento del gene endogeno magnesio chelatasi

Una delle ipotesi a giustificazione del mancato funzionamento del vettore TBSV nella resistenza alla sharka riguarda la sua capacità di infezione sistemica della pianta ospite *N. benthamiana* in tempi più lunghi rispetto all'isolato wild-type e seguita da sintomi meno gravi (Desvoyes e Scholthof, 2002; Scholthof *et al.*, 1993).

Per saggiare l'effettiva abilità di movimento *in planta* del vettore TBSV e allo stesso tempo verificarne la capacità di silenziamento genico, si è inserita una sequenza nucleotidica del gene endogeno magnesio chelatasi di *N. benthamiana* (*ChlH*).

Lo stesso vettore virale non esprime p19 è stato utilizzato con successo per il silenziamento del gene GFP in piante transgeniche di *N. benthamiana* (Qiu *et al.*, 2002), mentre in uno studio più recente l'uso dello stesso vettore virale TBSV esprime p19 per il silenziamento di *ChlH* è risultato fallimentare (Zhong *et al.*, 2005).

L'inoculo dei trascritti *in vitro* dei quattro vettori TBSV realizzati in questo lavoro ha portato in ogni caso al silenziamento di *ChlH*, indipendentemente dalla direzione dell'inserito esogeno clonato e dall'espressione della p19.

Il motivo per cui i risultati del nostro studio e quello di Zhong e collaboratori non concordano potrebbe essere dovuto ad alcune differenze fra gli inserti esogeni clonati all'interno dei vettori quali la loro lunghezza e/o la loro sequenza nucleotidica (Burch Smith *et al.*, 2004). Nonostante la lunghezza dell'inserito usato nel nostro studio (230-nt) sia inferiore a quella di 550-nt usata precedentemente, potrebbe essere infatti possibile che i piccoli RNA interferenti (siRNA), generati a seguito della degradazione delle molecole a dsRNA, originati dal nostro costrutto siano più efficaci nel silenziare *ChlH* di quelle originate dal costrutto di Zhong *et al.* (Thomas *et al.*, 2001). E' infatti noto che le proprietà termodinamiche degli siRNA giocano un ruolo importante nell'interferenza dell'RNA, probabilmente facilitando il riconoscimento e l'entrata nel complesso RISC (Khovorova *et al.*, 2003). Questa ipotesi rimane comunque dubbia nel nostro caso perché i due inserti derivano dalla medesima sequenza (stessa accessione) ed il più corto (230-nt) è compreso all'interno di quello di 550-nt per cui gli siRNA generati dal frammento in comune dovrebbero essere i medesimi e con la stessa efficacia.

E' inoltre possibile che la sequenza di ~550-nt usata nello studio precedente al nostro sia maggiormente propensa ad essere eliminata dal genoma di TBSV tramite

ricombinazione rispetto all'inserto di 230-nt da noi usato, permettendo il silenziamento di *ChlH* solamente in quest'ultimo caso. La capacità da parte dei vettori virali di conservare l'inserto esogeno clonato al loro interno è infatti molto importante ai fini del silenziamento, tuttavia essi tendono a ricombinare con facilità a seguito della pressione selettiva che si instaura durante l'infezione *in planta* (Barajas *et al.*, 2006). Nel nostro caso l'inserto è stato escluso dal genoma virale, come è risultato dall'analisi RT-PCR dell'RNA estratto dalle foglie che non sono state interessate dalla clorosi, e la colorazione bianco-gialla è stata osservata solo nelle prime due-tre foglie al di sopra di quelle inoculate e prevalentemente lungo le nervature. Sembra quindi che il silenziamento genico si sia potuto sviluppare limitatamente alle parti di pianta infette dal vettore TBSV contenente l'inserto esogeno. Questa osservazione concorda con quanto osservato nel caso di altri vettori virali usati per VIGS in cui la perdita dell'inserto esogeno da parte del vettore virale si è tradotta nel mancato silenziamento del gene-target (Zhong *et al.*, 2005).

Da queste osservazioni pare quindi che la mancanza della proteina capsidica per TBSV, sebbene non precluda la possibilità di infezione sistemica del vettore stesso, vada ad influire negativamente sulla capacità di movimento del virus nella pianta e conseguentemente sulla sua capacità di stimolare il silenziamento. Inoltre, da uno studio condotto precedentemente è stato suggerito che la proteina capsidica di TBSV permette un efficace trasporto dal sistema vascolare alle cellule del mesofillo sottoforma di virioni (Qu e Morris, 2002). Questo potrebbe spiegare il fatto che la clorosi si sia estesa limitatamente all'intorno delle nervature principali, risparmiando la lamina fogliare fra di esse.

I risultati della quantificazione dell'RNA messaggero di *ChlH* tramite Real-Time PCR hanno mostrato un'elevata percentuale di silenziamento del gene per tutti e quattro i vettori costruiti, indipendentemente dall'orientamento di clonaggio dell'inserto esogeno e dell'espressione o meno di p19 da parte del vettore.

Studi precedenti hanno mostrato come la direzione di clonaggio dell'inserto esogeno rivesta un ruolo importante ai fini del silenziamento limitatamente al caso in cui il frammento genico clonato sia corto (Ruiz *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2001). In entrambi i casi il gene-target era phytoene desaturasi (PDS), anch'esso gene endogeno coinvolto nella sintesi dei carotenoidi, il cui silenziamento porta alla clorosi; nello studio

più recente venivano considerati lunghi i frammenti di 51-52-nt e corti quelli di 33-34-nt, mentre nello studio del 1998 il frammento era di 415-nt. Non sorprende quindi che nel nostro caso, in cui è stato clonato un inserto di 230-nt, la direzione di clonaggio senso o anti-senso non abbia portato a differenze sostanziali.

Stupisce invece come l'espressione di p19, potente soppressore del silenziamento genico post-trascrizionale e determinante patogenetico, non abbia influito sui risultati ottenuti (Voinnet *et al.*, 1999; Turina *et al.*, 2003). Queste proprietà potrebbero influire in modo opposto sul VIGS: da un lato i vettori esprimenti p19 potrebbero muoversi più efficientemente ed avere una maggiore fitness *in planta*, dall'altro la loro capacità di silenziamento potrebbe essere compromessa dall'attività di soppressore di silenziamento esercitata da p19. I vettori non esprimenti p19 invece potrebbero essere meno virulenti, ma poichè non esprimono la proteina soppressore, potrebbero essere più efficaci nel silenziamento. Questi effetti opposti di p19 possono quindi spiegare l'analogo grado di silenziamento raggiunto dai vettori esprimenti e non- la p19.

4.3 TBSV come vettore virale per pesce?

I risultati delle prove d'inoculo effettuate con tecniche diverse indicano che il TBSV potrebbe essere usato come vettore virale anche nel caso di una pianta ospite arborea come il pesce.

Dopo aver ottenuto l'infezione utilizzando i tessuti di *N. benthamiana* già inoculati con i trascritti *in vitro* di TBSV, abbiamo ritenuto opportuno tentare una tecnica d'infezione che fosse di più facile applicabilità a livello pratico e allo stesso tempo economicamente sostenibile se applicata su larga scala.

Abbiamo scelto perciò la transfessione biolistica, che ci ha permesso di usare un vettore TBSV a cDNA. Una caratteristica molto interessante di questa tecnica è la possibilità di trasferire DNA esogeno in qualsiasi tipo di cellula o tessuto attraverso la penetrazione della parete e membrana cellulare. Questo permette di superare l'alta specificità dell'interazione biologica tra specie ospite e batterio patogeno che caratterizza ad esempio la trasformazione mediata da Agrobatterio (Taylor e Fauquet, 2002).

La transfezione biolistica, impiegata con successo per inserire transgeni in un'ampia varietà di tessuti vegetali può venire impiegata, come nel nostro studio, per ottenere un'espressione transiente degli acidi nucleici esogeni.

Se da un lato l'inoculo con TBSV ha avuto successo, non bisogna dimenticare che l'esperimento è stato condotto con l'uso del ceppo "wild-type" che ha quindi tutti i geni necessari per la replicazione, incapsidazione, movimento e patogenesi del virus. E' molto probabile infatti che, per una pianta ospite arborea quale il pesco, TBSV necessiti di tutte le proteine virali.

Per questo motivo e per quanto discusso precedentemente riguardo all'abilità dei vettori TBSV non esprimenti il CP nel silenziamento genico post-trascrizionale, la nostra ricerca verrà concentrata sullo sviluppo di nuovi vettori TBSV che siano il più possibile simili al ceppo "wild-type".

4.4 Sviluppi futuri della ricerca

Lo sviluppo di nuovi vettori TBSV ha due scopi fondamentali:

- Ottenere un vettore che esprima la proteina capsidica ed in grado di assemblare virioni
- Mantenga l'inserto esogeno clonato al suo interno

Un vettore con queste caratteristiche avrebbe infatti le potenzialità per il silenziamento genico sistemico in un'ampia gamma di piante ospiti.

Per la realizzazione di nuovi vettori TBSV ci riferiamo alla struttura secondaria dell'RNA a singola catena a polarità positiva (+ ssRNA) proposta da Lin e White (2004) (Fig. 4.1).

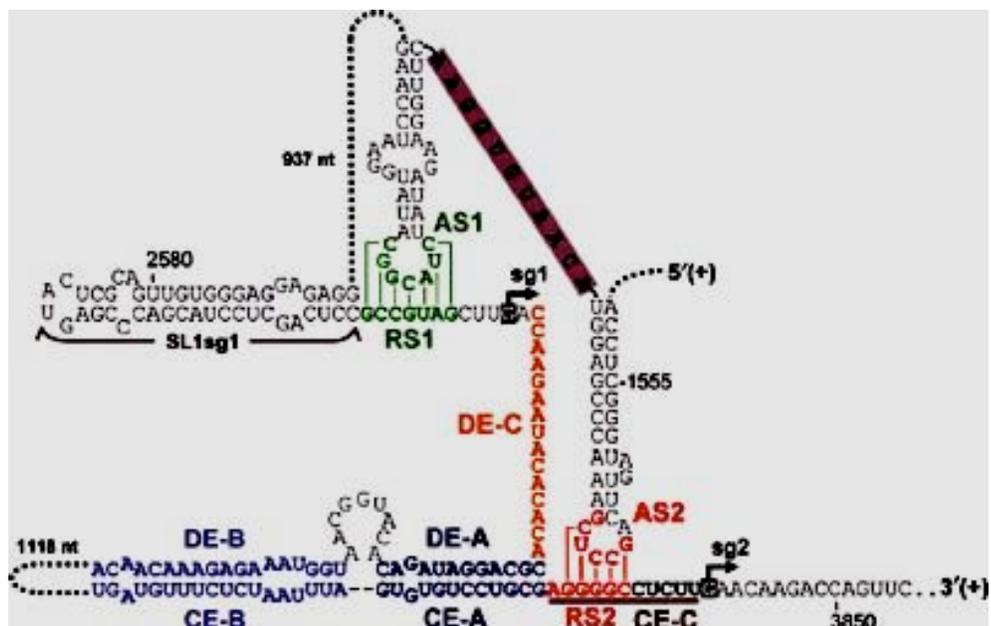


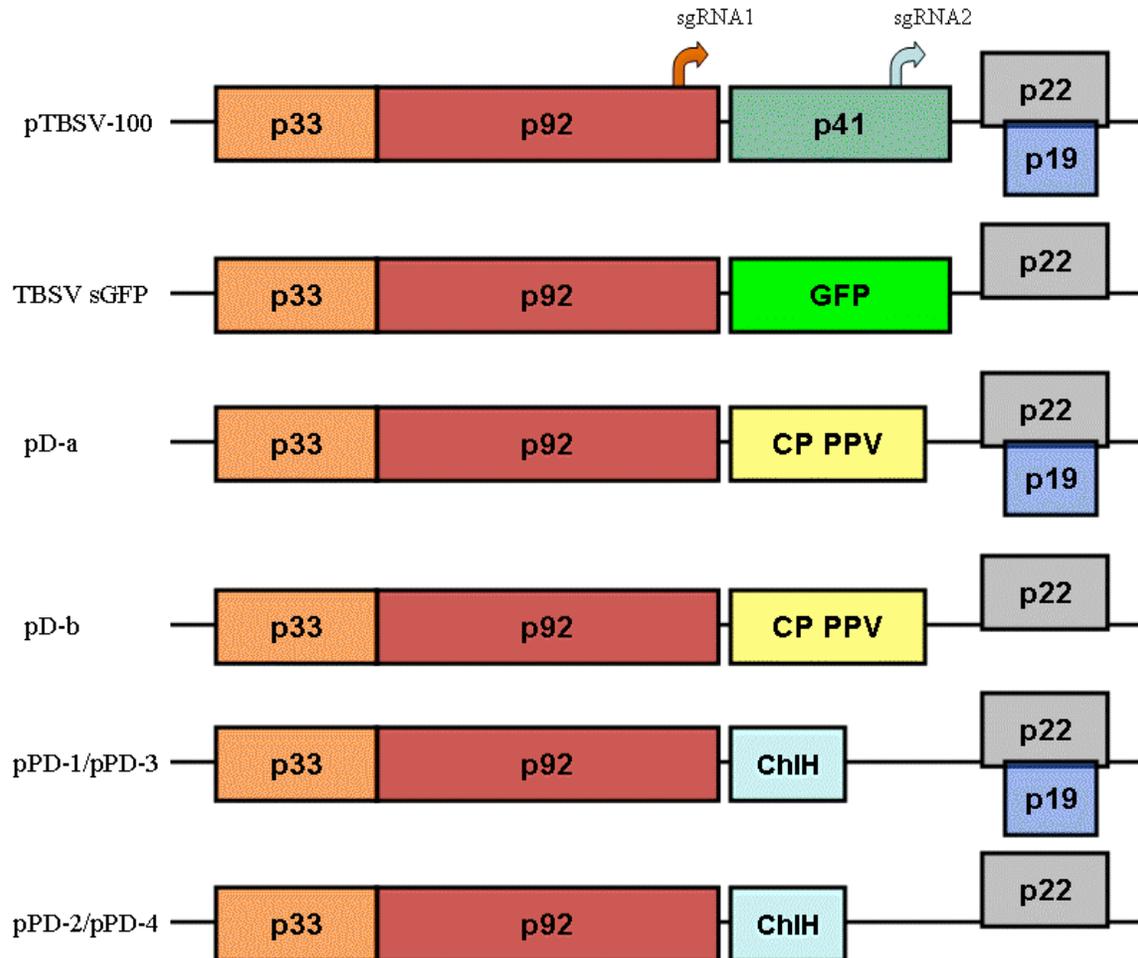
Fig. 4.1. Struttura secondaria dell'ssRNA di TBSV. Gli elementi a RNA coinvolti nella trascrizione dei due RNA subgenomici (sg1 e sg2) sono evidenziati con colori diversi. L'interazione DE-B/CE-B (blu chiaro) stabilizza l'interazione DE-A/CE-A (blu scuro), che è essenziale per la trascrizione dell'RNA sg2. L'interazione AS2/RS2 (rosso) è cruciale per la trascrizione dell'RNA sg2. DE-C (arancione) e CE-C (marrone e sottolineato) sono elementi non complementari. L'interazione AS1/RS1 è importante per la trascrizione dell'RNA sg1. I siti d'inizio della trascrizione degli RNA subgenomici sono indicate da due frecce.

Verrà inserito un unico sito di restrizione *XhoI* nelle due regioni CEB/CEA (Fig. 4.1), che interagiscono con altre regioni dell'RNA originando una complessa struttura

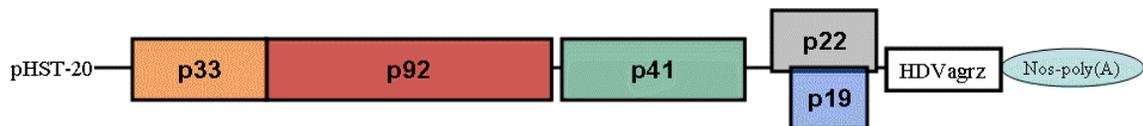
secondaria. La nostra ipotesi è che l'inserimento di un sito di restrizione, e successivamente di un inserto esogeno, in queste regioni non influisca sulla produzione della proteina capsidica e nello stesso tempo vada a diminuire l'espressione della p19. Se da un lato infatti la p19 risulta importante per la patogenesi, dall'altro essa potrebbe contrastare il silenziamento in quanto soppressore del PTGS. Infine, per aumentare la probabilità di ritenzione dell'inserto esogeno all'interno della sequenza genomica virale, la lunghezza del frammento di *ChH* sarà ridotta a ~100-150 bp.

Appendice I

Mappe dei vettori derivati da TBSV con promotore T7:



Mappa del vettore TBSV con promotore 35S (Scholthof, 1999):

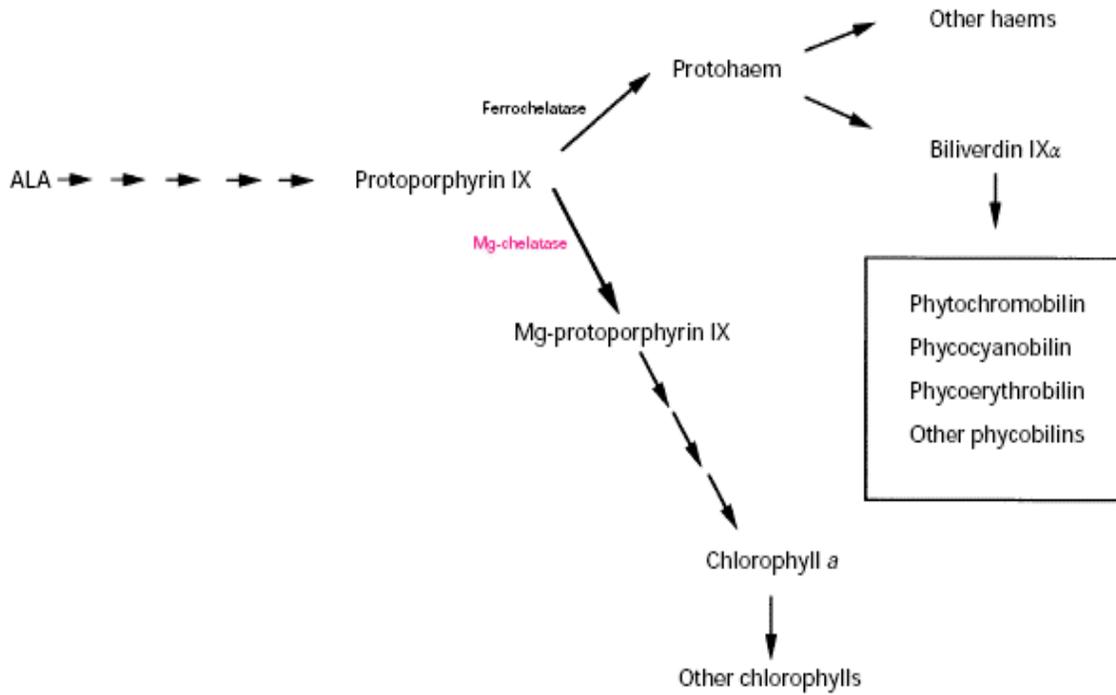


HDVagrz: ribozima antigenomico di hepatitis delta virus per ottenere una regione 3' terminale simile a quella dell'RNA di TBSV.

Nos-poly(A): segnale per nopolina sintasi per la terminazione *in vivo* della trascrizione.

Appendice II

Rappresentazione schematica della via biosintetica dell'enzima magnesio chelatasi (da Walker e Willows, 1997).



Bibliografía

- Alamillo, J. M., Monger, W., Sola, I., Garcia, B., Perrin, Y., Bestagno, M., Burrone, O. R., Sabella, P., Plana-Duran, J., Enjuanes, L. 2006. Use of virus vectors for the expression in plants of active full-length and single chain anti-coronavirus antibodies. *Biotechnol. J.* **1**: 1103-1111.
- Allen, W. R. 1969. Occurrence and seed transmission of tomato bushy stunt virus in apple. *Can. J. Plant Sci.* **49**: 797-799.
- Allen, W. R. and Davidson, T. R. 1967. Tomato bushy stunt virus from *Prunus avium* L. I. Field studies and virus characterization. *Can. J. Bot.* **45**: 2375-2383.
- Barajas, D., Tenllado, F., Diaz-Ruiz, J. R. 2006. Characterization of the recombinant forms arising from a Potato virus X chimeric virus infection under RNA silencing pressure. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 904-913.
- Baulcombe, D. C. 1996. RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **32**: 79-88.
- Benedito, V. A., Visser, P. B., Angenent, G. C., Krens, F. A. 2004. The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes. *Genet. Mol. Res.* **3**: 323-341.
- Burch-Smith, T. M., Anderson, J. C., Martin, G. B., Dinesh-Kumar, S. P. 2004. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal* **39**: 734-746.
- Burton, R. A., Gibeaut, D. M., Bacic, A., Findlay, K., Roberts, K., Hamilton, A., Baulcombe, D. C., Fincher, G. B. 2000. Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. *Plant Cell* **12**: 691-705.
- Candresse, T., Marcquaire, G., Lanne, M., Bousalem, M., Quiot-Douine, Quiot, J. B., Dunez, J. 1995. Analysis of plum pox virus variability and development of strain-specific PCR assays. *Acta Horticulturae* **386**: 357-369.
- Choi, Il-R., and White, K. A. 2002. An RNA Activator of Subgenomic mRNA1 Transcription in Tomato Bushy Stunt Virus. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 3760-3766.

- Chu, M., Desvoyes, B., Turina, M., Noad, R., Scholthof, H. B. 2000. Genetic dissection of tomato bushy stunt virus p19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic invasion. *Virology* **266**: 79-87.
- Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**: 475-483.
- Cogoni, C., Romano, N., Macino, G. 1994. Suppression of gene expression by homologous transgenes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**: 205-209.
- Crescenzi, A., D'Agostino, L., Comes, S., Nuzzaci, M., Piazzolla, P. 1997. Characterization of the sweet cherry isolate of plum pox potyviruses. *Plant Disease* **81**: 711-714.
- D.M. 29 Novembre 1996
- Desvoyes, B., and Scholthof, H. B. 2002. Host-dependent recombination of a Tomato bushy stunt virus coat protein mutant yields truncated capsid subunits that form virus-like complexes which benefit systemic spread. *Virology* **304**: 434-442.
- Di Nicola-Negri, E., Brunetti, A., Tavazza, M., Ilardi, V. 2005. Hairpin RNA-mediated silencing of Plum pox virus P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus. *Transgenic Research* **14**: 989-994.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., Tuschl, T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**: 188-200.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. 2005. Virus taxonomy Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier Academic Press*
- Fire, A., Xu, S. Q., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Garçia, J. A., Riechmann, J. L., Lain, S., Martin, M. T., Guo, H., Simon, L., Fernandez, A., Dominguez, E., Cervera, M. T. 1994. Molecular characterization of plum pox potyvirus. *EPPO Bulletin* **24**: 543-553.
- Giunchedi, L. 2003. Malattie da virus, viroidi e fitoplasmi degli alberi da frutto. *Edagricole* 338 pp.

- Glasa, M., Palkovics, L., Komínek, P., Labonne, G., Pittnerová, S., Kúdela, O., Candresse, T., Šubr, Z. 2004. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of Plum pox virus (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *J. Gen. Virol.* **85**: 2671-2681.
- Guo, H. S. and García, J. A. 1997. Delayed resistance to plum pox potyvirus mediated by a mutated RNA replicase gene: involvement of a gene-silencing mechanism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 160-170.
- Guo, H. S., López-Moya, J. J., García, J. A. 1998. Susceptibility to recombination rearrangements of a chimeric plum pox potyvirus genome after insertion of a foreign gene. *Virus Research* **57**: 195-207.
- Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-952.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G. J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-296.
- Hearne, P. Q., Knorr, D. A., Hillman, B. I., Morris, T. J. 1990. The complete genome structure and synthesis of infectious RNA from clones of tomato bushy stunt virus. *Virology* **177**: 141-151.
- Hily, J-M., Scorza, R., Webb, K., Ravelonandro, M. 2005. Accumulation of the long class siRNA is associated with resistance to *Plum pox virus* in a transgenic woody perennial plum tree. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**: 794-799.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., Voinnet, O. 2003. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.* **22**: 4523-4533.
- Hofgen, R. and Willmitzer, L. 1988. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acid Res.* **16**: 9877.
- Hsu, C., Singh, P., Ochoa, W., Manayani, D. J., Manchester, M., Scheemann, A., Reddy, V. S. 2006. Characterization of polymorphism displayed by the coat protein mutants of tomato bushy stunt virus. *Virology* **349**: 222-229.
- Hull, R. 2002. *Matthew's Plant Virology, Fourth Edition. Academic Press, NY 1001 pp.*

- James, D. and Varga, A. 2005. Nucleotide sequence analysis of Plum pox virus isolate W3174: evidence of a new strain. *Virus Res.* **110**: 143-150.
- Ji, L-H., Ding, S-W. 2001. The suppressor of transgene RNA silencing encoded by *Cucumber mosaic virus* interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 715-724.
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A., Carrington, J. C. 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell* **4**: 205–217.
- Khovorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S. D. 2003 Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**: 209.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., Burgyan, J. 2004. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J.* **23**: 876-884.
- Li, H.W., Lucy, A.P., Guo, H-S, Li, W. X., Ji, L. H., Wong, S. M., Ding, S. W. 1999. Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defense mechanism. *EMBO J.* **18**: 2683–2691.
- Lin, H-X., and White, K. A. 2004. A complex network of RNA-RNA interactions controls subgenomic mRNA transcription in a tombusvirus. *EMBO J.* **23**: 3365-3374.
- López-Moya, J. J., Fernández-Fernández, M. R., Cambra, M., García, J. A. 2000. Biotechnological aspects of plum pox virus. *Journal of Biotechnology* **76**: 121-136.
- Myrta, A., Potere, O., Boscia, D., Candresse, T., Cambra, M., Savino, V. 1998. Production of a monoclonal antibody specific to the El Amar strain of plum pox virus. *Middle European Meeting on Plum Pox*
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *intrans*. *Plant Cell.* **4**: 279–289.
- Nemchinov, L. A., Hadidi, H. 1996. Characterization of the sour cherry strain of plum pox virus. *Phytopathology* **86**: 575-580.

- Oster, S. K., Wu, B., White, K. A. 1998. Uncoupled expression of p33 and p92 permits amplification of tomato bushy stunt virus RNAs. *J. Virol.* **72**: 5845–5851.
- Pandolfini, T., Molesini, B., Avesani, L., Spena, A., Polverari A. 2003. Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the *rolC* promoter confers systemic disease resistance to plum pox virus without preventing local infection. *BMC Biotechnology* **3**: 7.
- Pogue, G. P., Linbo, J. A., Garger, S. J., Fitzmaurice, W. P. 2002. Making an ally from an enemy: plant virology and the new agriculture. *Annu Rev Phytopathology* **40**: 45-74.
- Public Health Security and Bioterrorism Act of 2002. Public Law 107-188.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M, Carrington, J. C., Vance, V. B. 1997. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *The Plant Cell* **9**: 859-868.
- Qiu, W., Park, J.-W., Scholthof, H. B. 2002. Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 269-280.
- Qu, F. and Morris, T. J. 2002. Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 193-202.
- Quiot, J. B., Labonne, G., Boeglin, M., Adamolle, C., Renaud, L. Y., Candresse, T. 1995. Behaviour of two isolates of plum pox virus inoculated on peach and apricot trees: first results. *Acta Horticulturae* **386**: 290-297.
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A. M., Baulcombe, D. C. 2001. Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* **25**: 237-245.
- Ravelonandro, M., Dunez, J., Scorza, R., Labonne, G. 1998. Challenging transgenic plums expressing potyvirus coat protein genes with viruliferous aphids. *Acta Horticulturae* **472**: 413-420.
- Regner, F., da Camara Machado, A., Laimer da Camara Machado, M., Steinkellner, H., mattanovich, D., Hanzer, V., Weiss, H., Katinger, H. 1992. Coat protein mediated

- resistance to plum pox virus in *Nicotiana clevelandii* and *N. benthamiana*. *Plant Cell Reports* **11**: 30-33.
- Rubino, L., Pantaleo, V., Navarro, B., Russo, M. 2004. Expression of tombusvirus open reading frames 1 and 2 is sufficient for the replication of defective interfering, but not satellite, RNA. *Journal of General Virology* **85**: 3115-3122.
- Ruiz, M. T., Voinnet, O., Baulcombe, D. C. 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**: 937-946.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.*
- Scholthof, H. B., Morris, T. J., Jackson, A. O. 1993. The capsid protein gene of tomato bushy stunt virus is dispensable for systemic movement and can be replaced for localized expression of foreign genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 309-322.
- Scholthof, H. B., Scholthof, K.-B. G., Kikkert, M., Jackson, A. O. 1995a. Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology* **213**: 425-438.
- Scholthof, K.-B. G., Scholthof, H. B., Jackson, A. O. 1995b. The tomato bushy stunt virus replicase proteins are coordinately expressed and membrane associated. *Virology* **208**: 365-369.
- Scholthof, H. B., Scholthof, K.-B. G., Jackson, A. O. 1996. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**: 299-323.
- Scholthof, H. B. and Jackson, A. O. 1997. The enigma of pX: a host-dependent cis-acting element with variable effects on tombusvirus RNA accumulation. *Virology* **237**: 56-65.
- Scholthof, H. B. 1999. Rapid delivery of foreign genes into plants by direct rub-inoculation with intact plasmid DNA of a tomato bushy stunt virus gene vector. *J. Virol.* **73**: 7823-7829.
- Scholthof, H. B. 2006. The Tombusvirus-encoded p19: from irrelevance to elegance. *Nature reviews Microbiology* **4**: 405-411.

- Scorza, R., Callahan, A., Levy, L., Damsteegt, V., Ravelonandro, M. 1998. Transferring potyvirus coat protein genes through hybridization of transgenic plants to produce plum pox virus resistant plums (*Prunus domestica*) L.. *Acta Horticulturae* **472**: 421-425.
- Scorza, R., Callahan, A., Levy, L., Damsteegt, V., Webb, K., Ravelonandro, M. 2001. Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. *Transgenic Research* **10**: 201-209.
- Shagger, H. and von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kD. *Anal Biochem* **166**: 368-379.
- Silhavy, D., Molnár, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M., Burgyán, J. 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* **21**: 3070–3080.
- Simon, L., Saenz, P., Garçia, J. A., 1997. Plum pox virus. In : *Recent Research Development in Plant Pathology-Filamentous Viruses of Woody Plants*. Veseley, D. and Monette. P. Eds. Research Signpost, Trivandrum, India Chapter **7**: 75-86.
- Singh, D. P., Moore, C. A., Gilliland, A., Carr, J. P. 2004. Activation of multiple antiviral defence mechanisms by salicylic acid. *Molecular Plant Pathology* **5**: 57-63.
- Sit, T.L., Vaewhongs, A. A., Lommel, S. A. 1998. RNA-mediated trans-activation of transcription from a viral RNA. *Science* **281**: 829–832
- Taylor, N. J., Fauquet, C. M. 2002. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology* **21**: 963-977.
- Tavert-Raudet, G., Ravelonandro, M., Bachelier, J.-C., Dunez, J. 1998. Transgenic *Nicotiana benthamiana* plants containing the P1 gene of plum pox virus are resistant to virus challenge. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 103-107.
- Thomas, C. L., Jones, L., Baulcombe, D. C., Maule, A. J. 2001. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *The Plant Journal* **25**: 417-425.

- Tomlinson, J. A., Faithfull, E., Flewett, T. H., Beards, G. 1982. Isolation of infective tomato bushy stunt virus after passage through the human alimentary tract. *Nature* **300**: 637-638.
- Towbin, H., Gordon, J. 1984. Immunoblotting and dot immunoblotting - Current status and outlook. *J. Immunol. Methods* **72**: 313-340
- Turina, M., Omarov, R., Murphy, J. F., Bazaldua-Hernandez, C., Desvoyes, B., Scholthof, H. B. 2003. A newly identified role for Tomato Bushy Stunt Virus p19 in short distance spread. *Molecular Plant Pathology* **4**: 67-72.
- Urucuqui-Inchima, S., Haenni, A.-L., Bernardi, F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research* **74**: 157-175.
- van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N. M., Stutje, A. R. 1990. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*. **4**: 291-299
- Vance, V. B. 1991. Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y. *Virology* **182**: 486-494.
- Vargason, J. M., Szittyá, G., Burgyan, J., Tanaka Hall, T.M. 2003. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* **115**: 799-811.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M., Baulcombe, D. C. 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 14147-14152.
- Voinnet, O. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* **5**: 949-956.
- Voinnet, O. 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature* **6**: 206-220.
- Walker, C. J. and Willows, R. D. 1997. Mechanism and regulation of Mg-chelatase. *Biochem. J.* **327**: 321-333.
- White, K. A. 2002. The premature termination model: a possible third mechanism for subgenomic mRNA transcription in (+)-strand RNA viruses. *Virology* **304**: 147-154.

- Yamamura, Y., and Scholthof, H. B. 2005. Tomato bushy stunt virus: a resilient model system to study virus-plant interactions. *Molecular Plant Pathology* **6**: 491-502.
- Yang, S. G., Carter, S. A., Cole, A. B., Cheng, N. H., Nelson, R. S. 2004. A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**: 6297-6302.
- Ye, K., Malinina, L., Patel, D. J. 2003. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* **426**: 874–878.
- Yoo, B. C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J., and Lucas, W.J. 2004. A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* **16**: 1979–2000.
- Xie, Z., Fan, B., Chen, C., Chen, Z. 2001. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 6516-6521.
- Zhong, X., Hou, H., Qiu, W. 2005. Integrity of nonviral fragments in recombinant Tomato bushy stunt virus and defective interfering RNA is influenced by silencing and the type of inserts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**: 800-807.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Prof. Luciano Giunchedi e il Dott. Carlo Poggi Pollini per avermi dato la possibilità di far parte del loro gruppo di ricerca.

Un sentito grazie va al Prof. Bryce W. Falk (Università' della California - Davis) per l'indimenticabile esperienza trascorsa nel suo laboratorio.

Grazie al Dott. Massimo Turina (Istituto di Virologia Vegetale – CNR, Torino) per i preziosi consigli e l'aiuto incondizionato.