

DOTTORATO DI RICERCA in
BIOTECNOLOGIE CELLULARI E MOLECOLARI

Ciclo XX

Settore scientifico disciplinare di afferenza: AGR/12

STUDIO DEI MECCANISMI MOLECOLARI
COINVOLTI NEL DETERMINISMO
SINTOMATOLOGICO DI PIANTE INFETTE
DA VIRUS E VIRUS-SATELLITI

Presentata da: Dr. ssa CONTALDO NICOLETTA

Coordinatore Dottorato

CHIAR. MO
PROF. LANFRANCO MASOTTI

Relatore

CHIAR. MO
PROF. GIANNI FACCIOLI

Esame finale anno 2008

RIASSUNTO

Con il nostro lavoro ci siamo proposti di studiare i meccanismi molecolari coinvolti nell'apparizione dei sintomi di piante inoculate con virus e complessi virus-satellite.

Nel primo caso, abbiamo cercato di mettere a punto un metodo molecolare per una identificazione precoce dei ceppi necrotici del tubero del virus del mosaico grave della patata (PVY^{NTN}) presenti in Italia. Ciò, per prevenire la loro diffusione in campo e le conseguenti gravi perdite nella produzione, specialmente in colture da seme.

Abbiamo cercato di individuare le particolari regioni responsabili del fenotipo necrotico del tubero e, a tale scopo, abbiamo effettuato esperimenti di RT-PCR, utilizzando primers che amplificavano regioni genomiche più ampie di quelle utilizzate dagli autori precedenti.

Come i precedenti ricercatori, però, non siamo riusciti a distinguere molecularmente gli NTN dagli altri ceppi, probabilmente a causa dell'elevata variabilità del genoma del virus, dovuta a mutazioni e ad eventi di ricombinazione genetica tra i diversi ceppi.

Nel secondo caso, abbiamo studiato l'influenza del satellite Y (CARNA5-Y) sui sintomi del virus del mosaico del cetriolo (CMV) in piante di *Nicotiana benthamiana*:

apparizione di forte ingiallimento al posto di semplice mosaico.

Wang et al. (2004), inoculando lo stesso complesso infettivo in piante di tabacco trasformate con un soppressore virale del meccanismo di “post-transcriptional gene silencing” (PTGS) della pianta (HC-PRO), non avevano più osservato i sintomi di ingiallimento. Avevano ipotizzato, perciò, che i cambiamenti nella sintomatologia fossero dovuti a questo meccanismo di PTGS.

Nel nostro caso, invece, usando piante di *N. benthamiana* trasformate con un altro soppressore virale (p19) o piante difettive nella produzione della RNA polimerasi 6 (coinvolta nel silencing sistemico), noi abbiamo visto che i sintomi di ingiallimento persistevano.

Questo, a nostro avviso, suggerisce che nel nostro sistema sia attivo un altro possibile meccanismo.

ABSTRACT

The aim of our work was to study the molecular mechanisms involved in symptoms appearance of plants inoculated either with a virus or with a virus-satellite complex.

In the first case, we tried to set up a reliable method for an early identification of PVY^{NTN} strains present in Italy and causing potato tuber necrosis. This, to prevent their spread in the field and to avoid severe yield losses, especially in seed potato production. We tried to localize the particular genomic region responsible for tuber necrosis. To this purpose, we carried out RT-PCR experiments using various primer combinations, covering PVY genomic regions larger than those previously used by other authors. As the previous researchers, though, we were not able to differentiate all NTN from others PVY strains. This probably because of the frequent virus variability, due to both genomic mutations and possible recombination events among different strains.

In the second case, we studied the influence of Y-sat (CaRNA5 satellite) on symptoms of CMV (Cucumber mosaic virus) in *Nicotiana benthamiana* plants: strong yellowing appearance instead of simple mosaic.

Wang et al (2004), inoculating the same infectious complex on tobacco plants transformed with a viral suppressor of

plant silencing (HC-PRO), did not experience the occurrence of yellowing anymore and, therefore, hypothesized that changes in symptoms were due to plant post transcriptional gene silencing (PTGS) mechanism. In our case, inoculation of *N. benthamiana* plants transformed with another PTGS viral suppressor (p19), and other plants defective for RNA polymerase 6 (involved in systemic silencing), still resulted in yellowing appearance. This, to our opinion, suggests that in our system another possible mechanism is involved.

INDICE:

PREFAZIONE	7
------------------	---

PARTE I: INDIVIDUAZIONE DEI CEPPI DI MOSAICO GRAVE DELLA PATATA CAUSANTI NECROSI DEL TUBERO (PVY^{NTN}).....9

1 -INTRODUZIONE.....	10
----------------------	----

2- MATERIALI E METODI.....	14
----------------------------	----

2.1) RACCOLTA E SCREENING SIEROLOGICO DEL MATERIALE VEGETALE INFETTO	14
--	----

2.2) INOCULAZIONI MECCANICHE	16
------------------------------------	----

2.3) ESTRAZIONE DI RNA TOTALE DALLE PIANTE	17
--	----

2.4) RETROTRASCRIZIONE (RT)	17
-----------------------------------	----

2.5) REAZIONI DI SEMPLICE E MULTIPLEX PCR.....	19
--	----

3 – RISULTATI.....	23
--------------------	----

3.1) DISTINZIONE DEGLI ISOLATI CON SAGGI BIOLOGICI E SIEROLOGICI.....	23
---	----

3.2) DISTINZIONE DEGLI ISOLATI SULLA BASE DI REAZIONI DI SEMPLICE E MULTIPLEX PCR.....	25
--	----

4- DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	33
-----------------------------------	----

PARTE II: RUOLO DEL SATELLITE CARNA5-Y NEL DETRMINISMO DEI SINTOMI DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL CETRIOLO(CMV).....37

1 -INTRODUZIONE.....	38
----------------------	----

2 - MATERIALI E METODI.....	44
-----------------------------	----

2.1) FONTI D' INOCULO	44
-----------------------------	----

2.2) PIANTE OSPITI E INOCULAZIONI MECCANICHE	45
--	----

2.3) ESTRAZIONE DI RNA TOTALE DALLE PIANTE	46
2.4) GELS ELETTROFORESI E NORTHERN BLOTS.....	47
2.5) PREPARAZIONE DELLE SONDE.....	49
2.6) IBRIDAZIONI MOLECOLARI	51
3- RISULTATI	54
3.1) ANALISI SINTOMATOLOGICHE.....	54
3.2) PRESENZA DEL VIRUS E DEL SATELLITE NELLE PIANTE	56
3.3) CARATTERISTICHE DEGLI siRNAs DEL SATELLITE NELLE PIANTE	58
4 - DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	61
RINGRAZIAMENTI	63
BIBLIOGRAFIA	64

PREFAZIONE

I virus ed altri patogeni subvirali (satelliti, viroidi) sono tra gli agenti infettivi più gravi delle piante, incapaci di replicarsi all'esterno della cellula ospite, di cui utilizzano il metabolismo. Sono costituiti da una o più molecole di acido nucleico (RNA o DNA), nei primi racchiuse da un involucro di natura proteica o lipo(-glico-) proteica (capside).

Non possiedono un meccanismo di penetrazione attiva delle pareti cellulari, e la loro trasmissione avviene solo direttamente, attraverso gli organi riproduttivi dell'ospite (seme, innesto, propagazione vegetativa), o indirettamente, attraverso vettori, quali insetti, nematodi, miceti, ecc... (Matthwes et al., 1991; Hadidi et al., 1998; Giunchedi et al., 2007).

Il processo infettivo virale (patogenesi), che ha come risultato finale l'apparizione dei sintomi sulla pianta, è un'interazione complessa tra pianta ospite ed agente fitopatogeno, spesso influenzata dalle condizioni ambientali. I virus raramente uccidono la pianta ospite, e di solito causano malattie a decorso cronico, che compromettono più o meno gravemente lo sviluppo e la produttività degli ospiti. Il contenimento, a livelli ragionevoli, della diffusione delle malattie virali, si ottiene specialmente con misure

profilattiche (ad esempio, uso di piante resistenti attraverso miglioramento genetico o transgenetico, eliminazione delle piante infette, ecc..) e, entro certi limiti, con la lotta ai loro numerosi vettori, soprattutto afidi.

La diagnosi precoce delle malattie virali riveste, perciò, un ruolo fondamentale per la prevenzione della loro diffusione in campo e il danno che ne consegue.

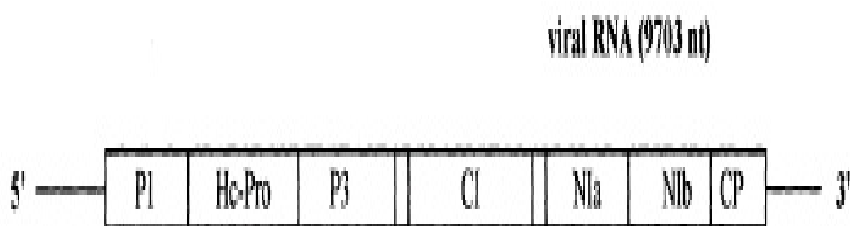
Lo studio dei meccanismi molecolari che regolano l'apparizione dei sintomi, in relazione anche all'ambiente di coltivazione è, a tal fine, di notevole importanza.

Con il nostro lavoro ci siamo proposti, perciò, di studiare il determinismo dei sintomi in due differenti modelli di studio: il virus del mosaico grave (PVY)- patata, e il complesso CMV- satellite CARNA5- *Nicotiana benthamiana*.

PARTE I:
INDIVIDUAZIONE MOLECOLARE DEI
CEPPI DI MOSAICO GRAVE DELLA
PATATA CAUSANTI NECROSI DEL
TUBERO (PVY^{NTN})

1- INTRODUZIONE

Il virus del mosaico grave o nervale della patata (PVY = potato virus Y) appartiene al genere Potyvirus, famiglia *Potiviridae*, ed è costituito da particelle flessuose a simmetria elicoidale, di circa 730-760 x 11-13 nm. Ha un genoma monopartitico di RNA a singolo filamento, di circa 10 kb, che termina al 3' con una sequenza di vari residui di adenine (polyA tail). Al 5' terminale del genoma è covalentemente legata una proteina (VPg), necessaria per la replicazione del virus. L'RNA virale codifica per una singola poliproteina, poi processata da 3 proteasi virali in 9 prodotti (Dougherty and Carrington, 1988).



1. Schema semplificato del genoma del PVY. P1: polimerasi 1; HC-PRO: helper-component proteinasi; P3: polimerasi 3; CI: Cytoplasmatic Inclusion; NIa e NIb: Nuclear Inclusion a e b; CP: coat Protein.

Il PVY si trasmette innanzitutto attraverso tuberi o parti di pianta infetti, e successivamente attraverso afidi (tra cui *Myzus persicae*, *Aphis fabae*, *Myzus certus*; Sigvald, 1984), in maniera non persistente. E' attualmente considerato in tutto il mondo il più economicamente dannoso per le colture di patata (Singh R.P. et al., 2007). La sua alta variabilità e le sue modalità di trasmissione lo hanno reso capace di infettare molte altre colture, tra cui tabacco, pomodoro e peperone.

La difesa tradizionale delle colture in pieno campo nei confronti del PVY risulta, a tutt'oggi, particolarmente difficoltosa, e si basa soprattutto su metodi preventivi, per la mancanza di una lotta diretta efficace. Interventi agronomici possibili sono principalmente l'impiego di tuberi-seme virus-esenti e la scelta di zone a scarsa popolazione afidica, soprattutto per le colture da seme, economicamente più pregiate (Gengotti S., 2005).

Sulla base della sintomatologia manifestata in tabacco e patata, e per le caratteristiche sierologiche distintive, gli isolati del virus furono classificati in diversi gruppi: PVY⁰, causante mosaico leggero in patata e macchie clorotiche in tabacco; il PVY^N, che provocava forte necrosi delle nervature fogliari in tabacco e mosaico in patata; il PVY^C, che induceva striature clorotiche in tabacco, e mosaico leggero o latenza in patata. All'inizio degli anni '80 furono

rinvenuti isolati che causavano necrosi del tubero (PTNRD: potato tuber necrotic ringspot disease; Beczner L. et al., 1984), poi denominati PVY^{NTN} (Kerlan C. and Le Romancer M., 1992; Le Romancer et al., 1994) e risultati essere, a loro volta, un sottogruppo dell' N (van den Heuvel et al., 1994). Le necrosi ad anello del tubero erano presenti prevalentemente su alcune cvs di patata (Nicola, Igor, Hermes); la loro apparizione era anche influenzata dalle condizioni climatiche di allevamento delle piante. Alcuni isolati, ad esempio, risultati di semplice tipo N in campo, provocavano PTNRD in condizioni controllate di serra (Kerlan and Tribodet, 1996; Le Romancer and Nedellec, 1997).

Prima del rinvenimento dei ceppi NTN e dei ricombinanti di tipo N (ad esempio PVY^N-Wilga), i metodi diagnostici più comunemente utilizzati erano quelli biologici, basati cioè sull'inoculazione di piante test quali tabacco e patata. Ciò comportava, però, tempi lunghi, inadatti all' identificazione dei ceppi NTN prima della raccolta dei tuberi, a quel punto non più commerciabili. I metodi sierologici: DAS- o TAS-ELISA (double- o triple- antibody sandwich enzyme immunoassay; Singh et al., 1993; Ellis et al., 1996), basati sulla distinzione dei 3 gruppi di ceppi principali, anche se di veloce esecuzione, non erano in grado di distinguere i ceppi NTN e i ricombinanti (vedi sopra).

La diagnosi molecolare precoce diventava, perciò, essenziale per l'identificazione di questi ceppi e limitarne la diffusione in campo.

A tal fine, i vari ricercatori hanno tentato di individuare le probabili regioni responsabili della necrosi del tubero, sulla base della comparazione delle sequenze di vari ceppi, necrotici e non, presenti in banche dati. Sono stati, quindi, costruiti vari primers per l'individuazione delle regioni genomiche dove più alta era la frequenza di eventi di mutazione e ricombinazione (CP, HC-PRO e NIa e NIb; Boonham N. et al., 1999; Revers F. et al., 1996; Glais L. et al., 2002).

Tuttavia, i vari saggi effettuati, basati su esperimenti di RT-PCR, non hanno permesso, finora, una sicura identificazione di tutti i ceppi NTN, e ciò a causa dell'elevata variabilità del genoma e del rinvenimento di sempre nuove varianti, difficili da classificare (Weidemann and Maiss, 1996; Walsh et al., 2001; Rosner and Maslennin, 2001, 2003; Nie and Singh, 2002; Boonham et al., 2002 a e b; Szemes et al., 2002; Moravec et al., 2003; Moury et al., 2004)

Tenendo conto, perciò, delle esperienze precedenti, abbiamo cercato di identificare i ceppi NTN presenti nel nostro territorio, utilizzando sì la tecnica RT-PCR, ma impiegando primers in grado di amplificare zone più ampie del genoma ed avere, quindi, una maggiore possibilità di individuazione delle regioni genomiche responsabili della necrosi del tubero.

2 - MATERIALI E METODI

2.1) RACCOLTA E SCREENING SIEROLOGICO DEL MATERIALE VEGETALE INFETTO

Negli anni 2003-2004, sono stati fatti, in varie regioni di Italia, campionamenti fogliari su piante di patata (cvs Hermes, Kennebec, Primura, Monalisa, ecc..) aventi sintomi di mosaico fogliare, al fine di monitorare la presenza e distribuzione del virus PVY.

La presenza del virus è stata accertata con saggi immunoenzimatici di tipo DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme-Linked Immunoassorbent Assay), secondo il protocollo di Clark and Adams (1977), utilizzando kit di identificazione, costituiti da anticorpi policlonali, coniugati e non, della ditta Loewe Phytodiagnostica.

A tal fine, piastre di polistirene (ELIA-RIA plate Costar) sono state sensibilizzate con \square globuline specifiche per il PVY (IgGv) diluite 1:200 in tampone Na-carbonato¹ (concentrazione finale 1 μ g/ml), incubate per 4 ore a 37° C e infine lavate 4 volte con tampone fosfato PBSt² a

¹ 1.59 Na₂CO₃ e 2.93 g di NaHCO₃ disciolti in 1l di acqua distillata, pH 9.6

² 8 g di NaCl, 2.9 g di Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 0.2 g DI KH₂PO₄, 0.2 g di KCl, 0.5 ml di tween 20, in 1l di acqua distillata, pH 7.2-7.4

temperatura ambiente. Circa 50 mg di ogni campione prelevato son stati macerati in 1 ml di tampone di estrazione³ e, per ogni campione, son stati riempiti 3 pozzetti, distribuiti in maniera randomizzata, ognuno con 150 µl. In ogni piastra erano inoltre inclusi anche 3 pozzetti riempiti con succo di piante sicuramente infette da PVY (controllo positivo), 3 con succo di piante sane (controllo negativo) e 3 con tampone di estrazione (“bianco”). Le piastre sono state incubate “overnight” a 4°C e, dopo 5 lavaggi in tampone PBSt, i pozzetti venivano riempiti con 150 µl di tampone coniugato⁴ e incubati per 1.30 h a 37°C. Dopo 3 lavaggi con PBSt, i pozzetti son stati riempiti con 150 µl di IgG-PA (immunoglobuline coniugate con fosfatasi alcalina) diluite 1:200 in tampone coniugato (concentrazione finale 1µg/ml). Le piastre son state incubate a 37°C per 3 ore e, dopo 5 lavaggi in PBSt, i pozzetti sono stati riempiti con 150 µl di soluzione substrato⁵. Dopo ulteriori 30 min l’assorbimento delle sospensioni è stato misurato a 405 nm di lunghezza d’onda con fotometro 450 Microplate Reader (Biorad).

³ 20 g di polivinilpirrolidone (K10-K40), in 1l di tampone PBSt.

⁴ 20 g di polivinilpirrolidone, 2 g di albumina, in 1l di tampone PBSt, pH 7.4.

⁵ 1 mg/ml di Na-4-nitrofenilfosfato in tampone per il substrato contenente 97 ml di dietanolammina e 0.2 g di MgCl₂ x6 H₂O, in 1l di acqua distillata, pH 9.8.

2.2) INOCULAZIONI MECCANICHE

L'identificazione di ceppi necrotici PVY^N del virus è stata effettuata mediante inoculazioni meccaniche del succo delle foglie infette dei diversi isolati (diluiti 1:10 p/v in tampone Fosfato pH 7.0) su piante di *Nicotiana tabacum* (cv Samsun) allo stadio di 4-5 foglie. Le piante erano allevate in serra climatizzata a 22±3°C, ed illuminazione naturale, integrata nella stagione invernale da illuminazione artificiale di 3000 lux con fotoperiodo di 15h (tubi Fluora 77R Osram).

Tredici isolati identificati precedentemente come N e due come 0 (non necrotici) son stati successivamente inoculati ciascuno su 10 piante di patata (cv Monalisa) allo stadio di 7 foglie, provenienti da tuberi virus-esenti, allevati in serra non climatizzata ad illuminazione naturale. L'operazione è stata ripetuta l'anno successivo.

A circa 2 mesi dall'inoculo, i tuberi delle piante infette (individuate con test ELISA) son stati raccolti e posti per 20 giorni a 4°C, per favorire l'eventuale apparizione di sintomi necrotici.

2.3) ESTRAZIONE DI RNA TOTALE DALLE PIANTE

Circa 200 mg di foglie di tabacco e patata, inoculate con i vari isolati di PVY, sono state macerate in mortaio con N₂ liquido, addizionate di 3 ml di tampone di estrazione⁶ (Rubino et al., 1992) e di un ugual volume di Fenolo-Cloroformio (1:1). Dopo centrifugazione a temperatura ambiente per 10 min a 15900 g, la fase acquosa è stata addizionata di 0.1 volumi di Na acetato e 2.2 volumi di etanolo assoluto freddo. Dopo 2.30 h a -20°C la fase acquosa è stata centrifugata a bassa velocità (7500 g), il sedimento è stato lavato con etanolo al 75%, disidratato sotto vuoto ed infine risospeso in acqua deionizzata trattata con DEPC (diethylpirocarbonato).

2.4) RETROTRASCRIZIONE (RT)

Il cDNA virale è stato ottenuto dall'RNA delle piante infette, utilizzando 2 diversi metodi:

- a) la tecnica classica di retrotrascrizione (RT);
- b) la tecnica dell'IMMUNOCAPTURE-RT.

⁶ 100 mM di glicina NaOH (pH9), 100 mM di NaCl, 10 mM di EDTA (pH 8), 2% di SDS, 1% di Laurylsarcosina e portati a volume con acqua deionizzata trattata con Dietilpirocarbonato (DEPCW)

a) In questo caso, prima di effettuare la retrotrascrizione, si è proceduto all'eliminazione dell'eventuale DNA residuo presente nei preparati, aggiungendo 1U di DNasi per ogni $\mu\text{g/ml}$ di RNA totale in 10 μl di apposito tampone di reazione (Sigma). Le miscele così ottenute sono state lasciate 15 min a temperatura ambiente, addizionate di 1 μl di EDTA ed incubate per 10 min a 70°C.

Due μg di RNA sono stati retrotrascritti in una miscela contenente 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl_2 , 1.5 mM di ognuno dei dNTPs, 0.12 μM di Oligo p(dT) primer mix, 20 U di inibitore dell'RNAsi, 20 U di trascrittasi inversa di AMV (Avian mieloblastosis virus), in un volume finale di 20 μl . Le miscele sono state incubate 10 min a 27°C, 1 h a 42°C, infine la reazione è stata bloccata con un riscaldamento a 95°C per 5 min.

b) L' IMMUNOCAPTURE-RT è stata effettuata secondo il metodo di Weidemann and Maiss (1996): tubi Eppendorf da 0.5 ml sono stati sensibilizzati con 1 $\mu\text{g/ml}$ di anti-PVY policlonale in tampone Na-carbonato, incubati per 4 ore a 37° C e, successivamente, lavati 4 volte con tampone fosfato PBSt a temperatura ambiente. Circa 25 μg di foglie infette per ogni campione sono stati macerati in mortaio, con tampone PBS-Tween-PVP (1:10 p/v) e 150 μl sono stati aggiunti ai tubi sensibilizzati. Dopo un'incubazione overnight a 4°C, i tubi son stati lavati 2 volte con PBSt e poi

con acqua distillata e, successivamente, addizionati della miscela di retrotrascrizione: AMV buffer, 1 mM dNTPs mix, 20 U RNasin, 1 mM di primers reverse e 40U di AMV trascrittasi inversa (Promega), in un volume di 20 μ l. Le miscele sono state poi incubate per 1h a 42°C.

2.5) REAZIONI DI SEMPLICE E MULTIPLEX PCR

Nelle reazioni di PCR semplice, in cui si utilizzava una sola coppia di primers, le miscele erano composte da 50 μ g di cDNA, tampone di reazione (Fermentas), 1.5 mM di $MgCl_2$, 0.4 μ M di dNTPs mix, 1U DNA Taq polimerasi, in 25 μ l di volume finale.

Nelle reazioni di multiplex PCR, in cui venivano utilizzati più primers, le concentrazioni di $MgCl_2$ e dNTPs mix venivano portate, rispettivamente, a 3mM e 0.6 μ M.

Sono stati utilizzati primers già presenti in letteratura (vedi tabella 1), nelle combinazioni riportate dai vari autori e in altre da noi stabilite, per poter coprire zone più ampie del genoma (vedi fig.2).

Inizialmente abbiamo utilizzato i primers P1, P2 e P3 (rispettivamente 1 forward e 2 reverse, Weidemann and Maiss, 1996) alla concentrazione di 1 μ M, sottoponendoli ad un primo ciclo di PCR, composto da 7 min a 95°C, 2 min a

50°C e 2 min a 72° C, e a successivi 35 cicli costituiti da 1 min a 95°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C.

Nella reazione di multiplex PCR, in cui si utilizzavano 3 coppie di primers (Nie and Singh, 2003; vedi tabella 1) si sono utilizzati 0.1 µg di ogni primer e le miscele sono state denaturate per 7 min a 95°C, poi sottoposte a 35 cicli di 30 sec a 95°C, 30 sec a 52°C, 30 sec 72°C.

Nelle combinazioni Sn-HR, MOR1-3'NTR, S₉₁₃₃-3'NTR, MOR1-MOR3-A₉₄₂₂, (Contaldo, 2007; vedi fig. 2), gli stessi primers sono stati utilizzati alla concentrazione di 1 µM e le miscele di amplificazione erano sottoposte a 35 cicli di 1 min a 95°C, 1 min a 52°C, 1 min a 72°C.

PRIMER	SEQUENZA	POLARITA'	POSIZIONE NEL GENOMA
P2 *	5'TCATCAAACAAACTCTTTC3'	forward	103-125
P3*	5'CAAGACTGATGCCAGAT3'	reverse	402-380
P1*	5'TTCCAAAGTGCCTTTGAG3'	reverse	919-897
Sn **	5'CATGATGGATCTGGCTACA3'	forward	2177-2196
A0**	5'AGTGGGGTACGTTAGATGTAGG3'	reverse	2817-2796
S5585**	5'GATCTCAAGTTGAAGGGGAC3'	forward	5585-5603
A6032**	5'TTGCGGACATCACTAAAGCG3'	reverse	6032-6013
S9133**	5'CGTAATCTGCGGATGGAA3'	forward	9133-9151
A9422**	5'GCCACTGCATATGTAATACT3'	reverse	9422-9402
MOR1°	5'-AGGAGGAAGCACTAAGAAG3'	forward	8594-8611
MOR3°	5'GCACCAAATCAGGAGATTCTACT3'	forward	8359-8383
HR°°	5'TACGCAGTGTGGCTTCTTGAAGAATGGTT3'	reverse	4034-4063
3'NTR°°	5'GTCTCCTGATTGAAGTTTACAGTCACTG(CT)TATGA	reverse	9670-9703

Tabella 1. Primers utilizzati nelle reazioni di RT-PCR.

*Weidemann and Maiss, 1996;

**Nie and Singh, 2002,

°Moravec et al, 2003;

°° Glais et al, 1998.

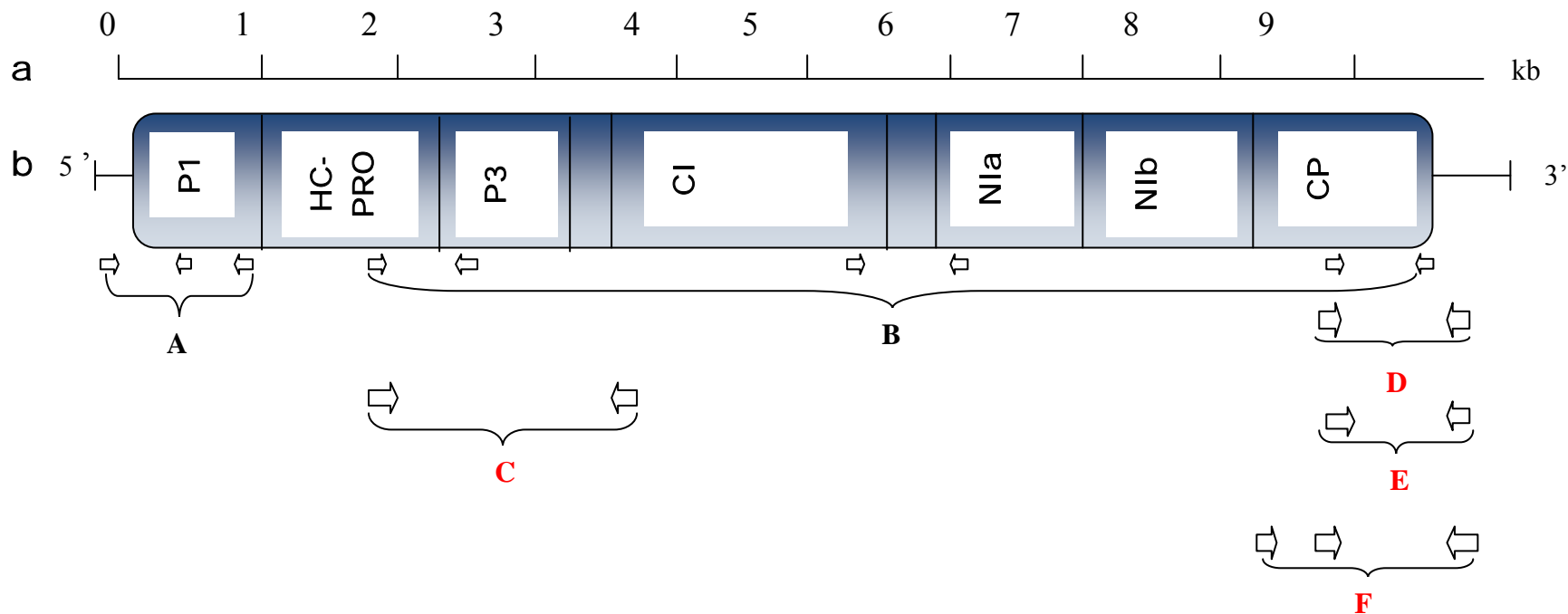


Fig.2. Rappresentazione schematica delle diverse combinazioni di primers utilizzate negli esperimenti di RT-PCR. In A e B, combinazioni tratte da vari autori (rispettivamente, Weidemann and Maiss, 1996; Nie and Singh, 2003). In rosso le nuove combinazioni da noi ideate: C: Sn-HR; D: MOR1-3'NTR; E :S₉₁₃₃- 3'NTR; F: MOR1-MOR3- 3'NTR. In alto, lunghezza del genoma virale in kilobasi (a) e ORFs (b).

3 – RISULTATI

3.1) DISTINZIONE DEGLI ISOLATI CON SAGGI BIOLOGICI E SIEROLOGICI

Nei campionamenti effettuati in varie regioni italiane, e soprattutto in Emilia Romagna, sono state identificate un centinaio di piante di patata virus-infette con manifestazioni di mosaico fogliare. Da test sierologici successivi (DAS-ELISA con anticorpi policlonali) siamo stati in grado di individuare 50 isolati di PVY, di cui, a seguito di inoculazione su tabacco e saggi ELISA con anticorpi monoclonali anti-PVY^N, 30 sono risultati appartenere al gruppo N (vedi foto1).

Dei 13 isolati N che avevamo inoculato su patate sensibili cv Monalisa, 10 si sono dimostrati essere di tipo NTN, poiché causavano anelli necrotici, completi o incompleti, più o meno approfonditi, su circa il 30-40% dei tuberi della progenie (vedi foto 2).



Foto 1. Piante di *Nicotiana tabacum* cv *Samsun* con necrosi sistemiche delle nervature e del fusto, a seguito di inoculazione con isolati di tipo PVY^N.



Foto 2. Anelli necrotici di varia estensione e profondità (*Potato tuber necrotic ringspot disease=PTNRD*) su tuberi di patate *Monalisa* inoculate in precedenza con ceppi NTN.

3.2) DISTINZIONE DEGLI ISOLATI SULLA BASE DI REAZIONI DI SEMPLICE E MULTIPLEX PCR

Impiegando combinazioni di primers utilizzate in precedenza da altri ricercatori, abbiamo potuto constatare che non c'erano differenze permanenti tra i diversi gruppi di isolati, ma diversità esistevano, piuttosto, fra isolati dello stesso gruppo.

I prodotti di PCR relativi alla combinazione di primers usati da Weidemann (1996; vedi tabella 1), ad esempio, evidenziavano la presenza di 2 bande di 835 e 535 bp in ben 11 dei 15 isolati provati, di cui 3 del gruppo N (1, 26, 81) e 8 dell'NTN (2, 8, 24, 47, 49, 64, 65, 93). Solo la banda di 535 bp è stata individuata in 2 isolati del gruppo 0 (3 e 4) e uno del gruppo NTN (51). In un isolato del gruppo NTN (53) era presente solo la banda di 835 bp (foto 3, tab.2).

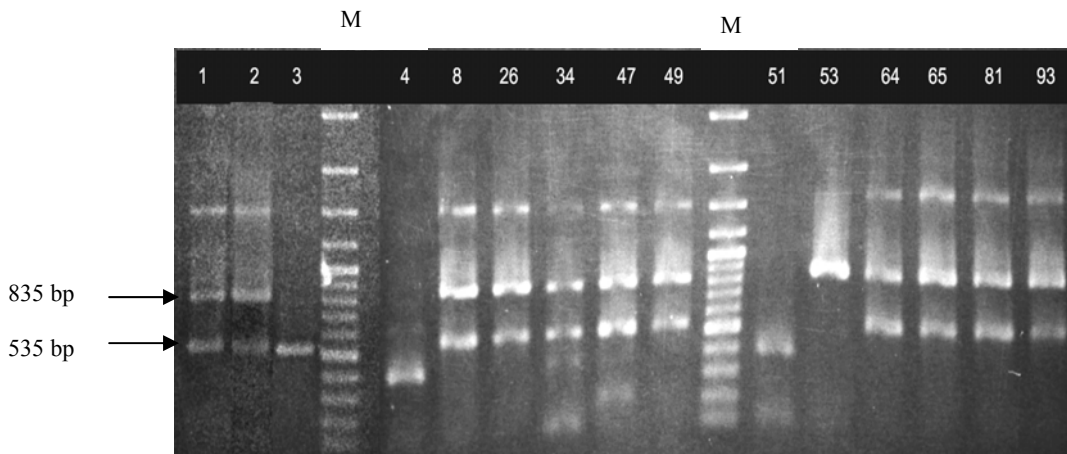


Foto 3. Gel elettroforesi in agarosio 1,2% dei prodotti di PCR, ottenuti con la combinazione di primers usati da Weidemann and Maiss (1996). Le bande di 835 e 535 bp compaiono in 3 isolati del gruppo N (1, 26, 81) e 8 dell'NTN (2, 8, 24, 47, 49, 64, 65, 93). Si noti la presenza di una sola banda di 535 bp negli isolati 3 e 4 (gruppo 0) e nell'isolato NTN 51 e di un'unica banda di 835 bp nell'isolato 53. M= markers di peso molecolare noto.

Quando si sono impiegati primers relativi alle 3 zone di ricombinazione (HC-PRO/P3, 6K2/NIa, C-Term del CP; Nie and Singh, 2002), si sono individuate 3 bande della lunghezza di 641, 448 e 290 bp in 3 isolati del gruppo N (1, 26, 81), in uno del gruppo 0 (4) e in 8 del gruppo NTN (2, 34, 47, 49, 51, 53, 64, 65, 93). Due bande di 448 e 290 bp erano presenti in un isolato 0 (3) e uno del gruppo NTN (34); una sola banda di 448 bp era visibile nell'isolato NTN 8 (foto 4, tab.2).

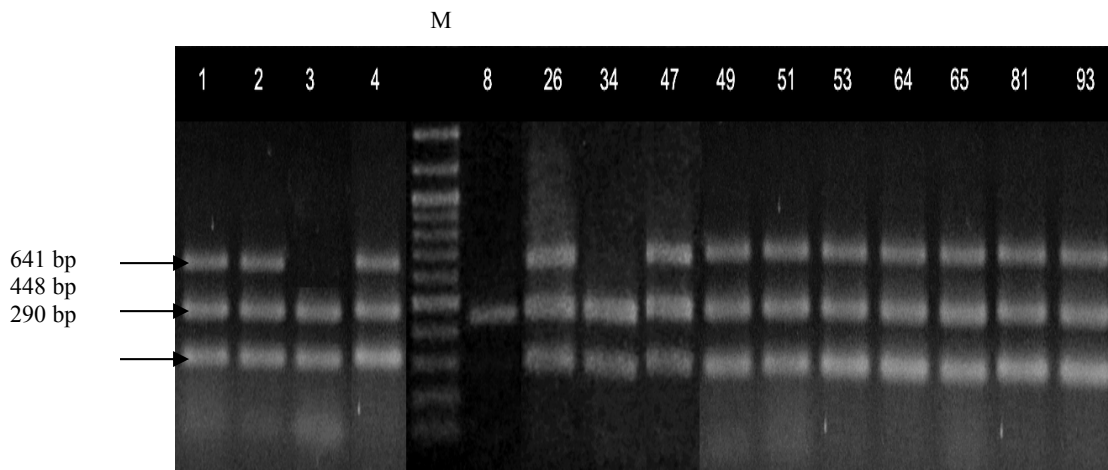


Foto 4. Elettroferogrammi dei prodotti di PCR ottenuti con primers utilizzati da Nie and Singh (2003). In 3 isolati N (1, 26, 81), 8 NTN (2, 34, 47,49, 51, 53, 64, 65, 93) e un isolato 0 (4) si osservava la presenza di 3 bande di 641, 448 e 290 bp. Nell'isolato 8 (NTN) era presente una sola banda di 448 bp, e negli isolati 3 (0) e 34 (NTN) erano visibili le bande di 448 e 290 bp. In M marker di peso molecolare noto.

Anche impiegando primers che permettevano l'esame di regioni più ampie di quelle citate in letteratura, e adiacenti all'HC-PRO e al CP, non abbiamo potuto stabilire differenze significative tra gli isolati dei diversi gruppi. Bande differenziali erano, invece, individuabili per isolati dello stesso gruppo.

Utilizzando, ad esempio, la combinazione di primers MOR1-3'NTR, una banda di 1100 bp era visibile in 9 isolati del gruppo NTN (2, 8, 34, 47, 49, 53, 64, 65, 93), 2 del gruppo N (26 e 81) e 2 (3 e 4) del gruppo 0 (foto 5, tab.2).

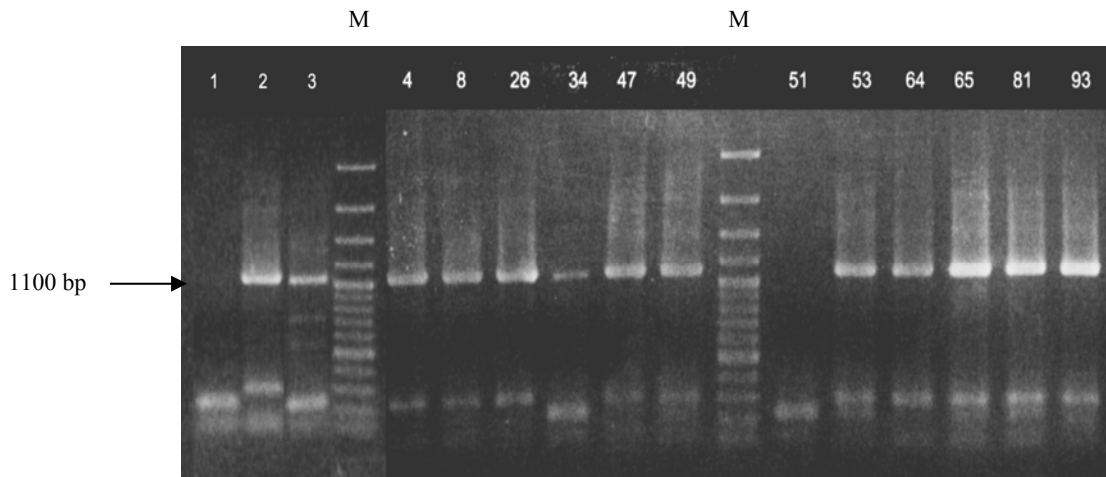


Foto 5. Elettroferogrammi dei prodotti di PCR relativi alla combinazione di primers MOR1-3’NTR (Contaldo, 2007). Si può constatare che la banda di 1100 bp era presente in 9 isolati del gruppo NTN (2, 8, 34, 47, 49, 53, 64, 65, 93), 2 isolati N (26 e 81) e 2 0 (3 e 4). Non erano visibili bande negli isolati 1 (N) e 51 (NTN). M: markers di peso molecolare noto.

Impiegando la coppia di primers Sn-HR, si rilevava la presenza di una banda di 1800 bp in 3 isolati N (1, 26 e 81), 6 isolati NTN (8, 47, 49 53, 65 e 93) e un isolato 0 (4). Non comparivano bande in 4 isolati di tipo NTN (2, 34, 51, 64) e uno (3) di tipo 0 (foto 6, tab.2).

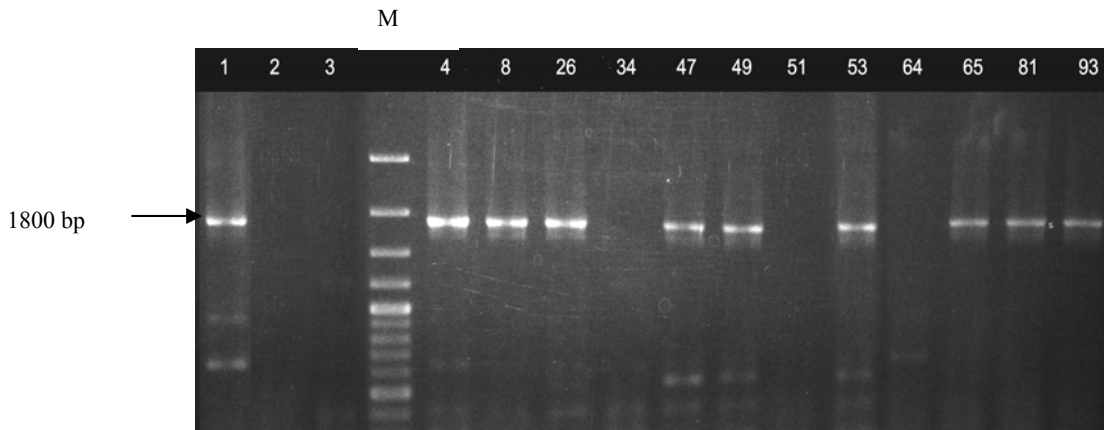


Foto 6. Elettroferogrammi dei prodotti di PCR ottenuti con l' utilizzo della coppia di primers Sn-HR (Contaldo, 2007). Si noti che la banda di 1800 bp è presente in 3 isolati N (1, 26 e 81), 6 NTN (8, 47, 49, 53, 65, 93) e uno del gruppo 0 (4). Bande visibili erano assenti negli isolati 2, 34, 51 e 64 (NTN) e nel 3 (0).

M: marker di peso molecolare noto.

Con i primers S₉₁₃₃-3'NTR, si ottenuto una banda di 600 bp da tutti gli isolati, ad eccezione del 3 (0), degli NTN 34 e del 51 (foto 7, tab.2).

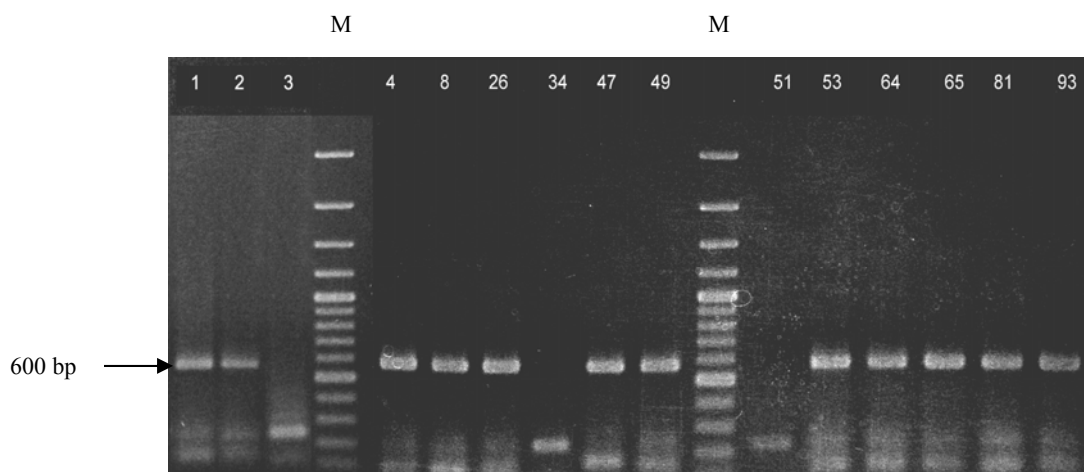


Foto 7. Elettroferogrammi dei prodotti di PCR ottenuti con la coppia di primers S_{9133} -3'NTR. Una sola banda di 600 bp era visibile in 3 isolati N (1, 26 e 81), 8 NTN (2, 8, 47, 49, 53, 64, 65 e 93) e uno 0 (4), ma era assente negli isolati 3 (0), 34 e 51 (NTN).

M: markers di peso molecolare noto.

Impiegando, infine, contemporaneamente (multiplex PCR) 3 primers, di cui 2 “forward” (Mor1-MOR3) e un reverse (A9422), si osservavano 2 bande, di cui una di 828 bp comune a tutti gli isolati dei vari gruppi, e una, di 1063 bp, presente solo nei ceppi N (compresi gli NTN), ma non in quelli (3 e 4) del gruppo 0 (foto 8, tab.2).

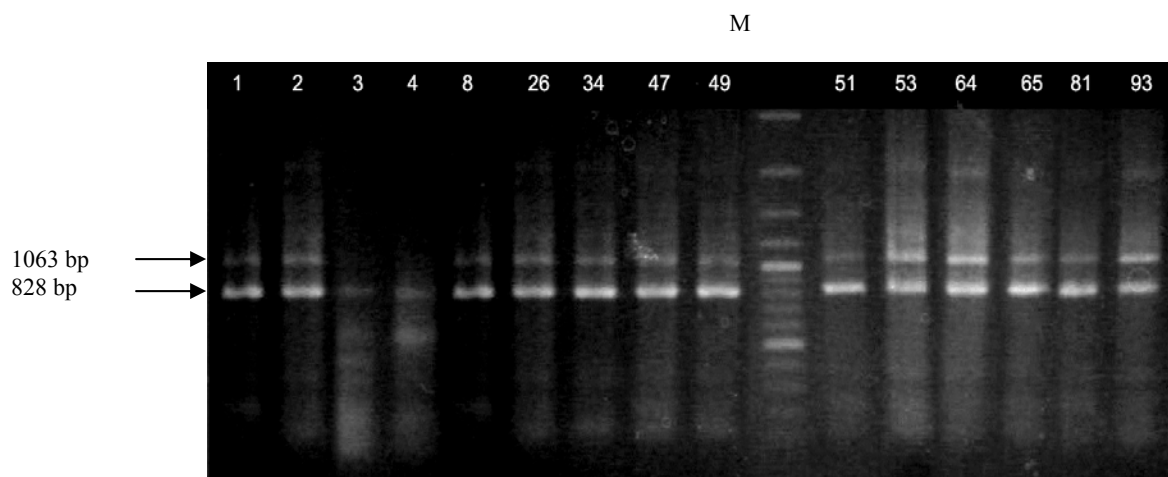


Foto 8. Elettroferogrammi dei prodotti di PCR relativi alle combinazioni di primers MOR1-MOR3-A₉₄₂₂. Una banda di 828 bp era visibile in tutti gli isolati, mentre la banda di 1063bp era presente in tutti gli isolati del gruppo N ed NTN (1, 2, 8, 26, 47, 49, 51, 53, 64, 65, 81, 93), ma non negli isolati 3 e 4 del gruppo 0.

M: marker di peso molecolare noto.

ISOLATI	LOCALITÀ di provenienza	SINTOMI		MULTIPLEX PCR		PCR SINGOLE				
		TABACCO	TUBERO	Weidemann and Maiss, 1996 P1-P2-P3	Nie and Singh, 2003 Sn-A0, S5585-A6032, S9133-A9422	Sn- HR	Mor 3-A9422	MOR1-A9422	Mor 1-3'NTR	S9133- 3'NTR
				(103-402-919 nt*)	(2177-2817; 5585-6032; 9133-9422 nt)	(2177-4032 nt)	(8359-9422 nt)	(8594-9422 nt)	(8594-9703 nt)	(9133- 9703 nt)
1	Bari	N		835, 535 bp**	641, 448, 290 bp	1800 bp	1063 bp	828		600 bp
2	Bari	N	NTN	835, 535 bp	641, 448, 290 bp		1063 bp	828 bp	1100 bp	600 bp
3	Bari	0		535 bp	448, 290 bp			828 bp	1100 bp	
4	Budrio	0		500 bp	641, 448, 290 bp	1800 bp		828 bp	1100 bp	600 bp
8	Budrio	N	NTN	835, 535 bp	448 bp	1800 bp	1063 bp	828 bp	1100 bp	600 bp
26	Tolè	N		835,535 bp	641, 448, 290 bp	1800 bp	1063 bp	828 bp	1100 bp	600 bp
34	Castel d'Alano	N	NTN	835, 535 bp	448, 290 bp		1063 bp	828 bp	1100 bp	
47	Imola	N	NTN	835, 535 bp	641, 448, 290 bp	1800 bp	1063 bp	828 bp	1100 bp	600 bp
49	Imola	N	NTN	835, 535 bp	641, 448, 290 bp	1800 bp	1063 bp	828 bp	1100 bp	600 bp
51	Imola	N	NTN	500 bp	641, 448, 290 bp		1063 bp	828 bp		
53	Imola	N	NTN	835 bp	641, 448, 290 bp	1800 bp	1063 bp	828 bp	1100 bp	600 bp
64	Imola	N	NTN	835, 535 bp	641, 448, 290 bp		1063 bp	828 bp	1100 bp	600 bp
65	Imola	N	NTN	535 bp	641, 448, 290 bp	1800 bp	1063 bp	828 bp	1100 bp	600 bp
81	Ozzano	N		835,535 bp	641, 448, 290 bp	1800 bp	1063 bp	828 bp	1100 bp	600 bp
93	Siracusa	N	NTN	835, 535 bp	641, 448, 290 bp	1800 bp	1063 bp	828 bp	1100 bp	600 bp

Tab2. Schema riassuntivo della provenienza, sintomatologia in tabacco e patata e “patterns elettroforetici” dei prodotti di RT-PCR, ottenuti con le diverse combinazioni di primers, degli isolati di PVY esaminati. In grassetto, i ceppi NTN; *: nucleotidi; **: paia di basi.

4 – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La diffusione in Italia dei ceppi del gruppo PVY^{NTN} è notevolmente aumentata in questi ultimi anni, a partire dal 1997, anno in cui isolati del gruppo furono individuati per la prima volta nel Nord Italia (Tomassoli et al., 1998).

Le analisi sintomatologiche e sierologiche da noi effettuate su campioni fogliari di patata raccolti in varie regioni italiane, e in particolar modo in Emilia Romagna, hanno messo in evidenza l'attuale elevata diffusione dei ceppi necrotici di PVY sul nostro territorio. Su un totale di 50 isolati di PVY campionati, 30 sono risultati, infatti, essere del gruppo N e, di questi, 10 dei 13 inoculati su patata, hanno provocato necrosi sui tuberi.

Dalle analisi effettuate con anticorpi specifici, abbiamo riscontrato che tutti gli isolati NTN da noi rinvenuti erano sierologicamente N, perciò la variante PVY^N- Wilga non sembrerebbe essere presente nelle zone campionate.

Questi dati suggeriscono che, probabilmente, i ceppi necrotici e, in particolar modo gli NTN, abbiano dei vantaggi selettivi, che ne permettono una più rapida diffusione, rispetto a quelli del gruppo 0. Giunti in Italia alla fine degli anni '90 attraverso l'importazione di tuberi infetti

provenienti dalla regione dei Balcani e dall'Europa Orientale, questi ceppi hanno avuto modo di diffondersi rapidamente, perché erano sintomatologicamente latenti su molte cultivars e, quindi, non facilmente identificabili. Inoltre, il gruppo PVY^N, di cui gli NTN rappresentano un sottogruppo, induce di solito sintomi più leggeri del gruppo 0, ma la sua traslocazione all'interno della pianta è più veloce e i suoi sintomi in campo si manifestano più tardivamente. Ciò ha reso più difficile l'attuazione di misure profilattiche tempestive, come l'estirpamento delle piante visibilmente ammalate (Goidanich et al., 1976).

Altra possibile causa della rapida diffusione dei ceppi NTN in Italia, potrebbe consistere, inoltre, nel fatto che, non essendo state ancora individuate le sequenze virali responsabili della necrosi del tubero, ciò ha reso impossibile la messa a punto di un metodo molecolare adatto alla distinzione precoce di questi ceppi dagli N (Tribodet et al., 2005; Balme-Sinibaldi et al., 2006; Schubert et al., 2007).

Anche i risultati da noi ottenuti con l'utilizzo, in esperimenti RT-PCR, di primers che permettevano l'analisi di zone più ampie del genoma virale, non ci hanno consentito di identificare differenze costanti tra gli isolati dei vari gruppi. Abbiamo notato, piuttosto, che bande differenziali erano evidenti negli isolati di uno stesso gruppo. Il solo risultato sicuro ottenuto è stata la distinzione degli isolati N dagli 0,

con l'impiego di una coppia di primers specifica per la regione del CP.

I nostri dati sono in accordo con quanto osservato recentemente da altri autori. Tutte le classificazioni dei vari gruppi di PVY basate su RT-PCR sono risultate, infatti, solo parzialmente valide, poiché anche le bande differenziali (markers molecolari) individuate da questi autori non erano strettamente associate alla sintomatologia necrotica del tubero (Glais et al., 2005; Jacquot, 2005; Lorenzen et al., 2006; Singh et al., 2007).

Del resto, anche l'individuazione delle zone responsabili delle necrosi fogliari in tabacco nei semplici ceppi N non è ancora del tutto chiara. Sono stati, infatti, individuati 2 aminoacidi differenziali nella regione vicina al C-terminale della proteina HC-PRO coinvolti in tale fenotipo (Tribodet et al., 2005), ma rimane ancora da stabilire se tutti gli isolati N abbiano questi 2 aminoacidi e se questi siano i soli responsabili del fenotipo necrotico (Singh et al., 2007).

Molto recentemente è stato sviluppato un nuovo metodo molecolare (SNaPshot; Rolland et al., 2008), che ha permesso di distinguere i ceppi di PVY finora provati, in accordo al fenotipo. La distinzione era basata sull'individuazione di un polimorfismo legato ad un singolo nucleotide in 4 posizioni delle regioni HC-PRO, NIB e CP.

Gli stessi autori ammettono, però, che la distinzione dei ceppi del virus correlata ai vari fenotipi, è stata solo

parzialmente raggiunta, per la probabile insorgenza di sue nuove varianti o ricombinanti.

La cosa, comunque, non ci sorprende del tutto, poiché, in generale, il fenotipo sintomatologico dei virus è influenzato non solo dalla sua sequenza e struttura genomica, ma anche dal rapporto virus/cv(specie di pianta) e dalle condizioni ambientali di coltivazione dell'ospite.

**PARTE II:
RUOLO DEL SATELLITE
CARNA5-Y NEL
DETERMINISMO DEI
SINTOMI DEL VIRUS DEL
MOSAICO DEL CETRIOLO
(CMV)**

1 – INTRODUZIONE

Il virus del mosaico del cetriolo (CMV, genere *Cucumovirus*, Famiglia *Bromoviridae*) è un patogeno particolarmente diffuso in tutto il mondo, in grado di infettare circa 1000 specie di piante (Roossinck, 2001), provocando generalmente mosaico con distorsioni fogliari e clorosi.

Ha un genoma tripartitico, con RNA a singolo filamento positivo: RNA1 ed RNA2 codificano le subunità 1A e 2A della replicasi (Hayes and Buck, 1990), RNA2 codifica, inoltre, una seconda proteina (2b), che viene tralata da un RNA subgenomico. RNA3 codifica la proteina 3A (MP= proteina di movimento), necessaria per il trasporto da cellula a cellula, e il CP (*coat protein*), che è traslato dall'RNA subgenomico 4 (Ding et al., 1994; Guo and Ding, 2001).

I ceppi del CMV sono stati suddivisi in 3 differenti sottogruppi: IA, IB, II, sulla base delle loro caratteristiche sierologiche e sulle differenze di sequenza di particolari regioni del genoma, quali il CP e il 5'NTR (*not translated region*) dell'RNA3 (Roossinck et al, 1999).

In aggiunta agli RNA genomici, molti ceppi di CMV contengono nelle loro particelle degli RNA satelliti, costituiti da piccole molecole di RNA lineari, della

lunghezza di 330-400 nt, prive di capacità codificante: non contengono, infatti, “open reading frames”, ORFs (Roossinck et al., 1992; Garcia-Arenal and Palukaitis, 1999). Per la loro replicazione, incapsidazione e diffusione dipendono, perciò, dal virus principale (helper; Collmer and Howell, 1992; Roossink et al., 1992).

Gli RNA satelliti delle particelle virali possono avere, o meno, effetti sull'espressione dei sintomi indotti dal virus helper, peggiorandoli o attenuandoli, a seconda del ceppo virale a cui sono associati e del tipo di ospite interessato (Francki, 1985; Kaper, 1992; Wu et al., 1993). In pomodoro, ad esempio, la presenza del satellite CARNA5 (CMV- associated RNA5), uno dei meglio caratterizzati (Kaper et al., 1990; Devic et al, 1990), è spesso causa di necrosi letale dei fusti e dei piccioli (Gallitelli, 2000). D'altro canto, altri ceppi di CARNA5 possono attenuare i sintomi del virus, entrando in competizione con lo stesso per la replicasi (Gal-On et al., 1995; Simon et al., 2004).

Il determinismo dei sintomi è legato alla sostituzione di uno o pochi nucleotidi nel genoma del satellite, che è la causa di cambiamenti nella struttura secondaria (Masuta and Takanami, 1989; Palukaitis and Roossinck, 1996).

Il satellite CARNA5 del ceppo Y di CMV (Ysat; Takanami, 1981 ; Masuta et al., 1988) dava luogo a clorosi sistemica, se inoculato su tabacco, ma ciò non accadeva in piante trasformate con un forte soppressore virale (HC-PRO di

TEV; Wang et al., 2004). Questi autori ipotizzarono, quindi, che causa dei sintomi di ingiallimento fosse la formazione di siRNAs (“small interfering RNAs”) derivanti dalla degradazione del satellite ad opera del complesso DICER della pianta. Questi siRNAs, a loro volta, avrebbero ridiretto il meccanismo di silenziamento (PTGS) della pianta contro gli mRNAs dell’ospite (vedi fig.3).

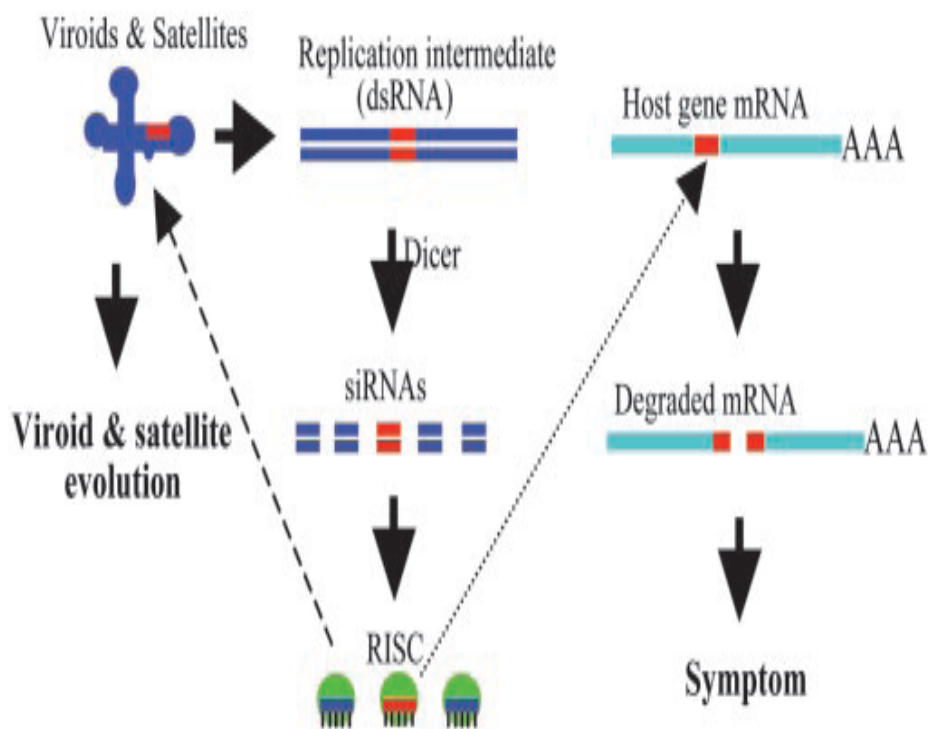


Fig.3. Modello proposto per spiegare il ruolo del meccanismo di RNA silencing nella patogenesi degli agenti subvirali (Wang et al., 2004). Si può vedere come gli siRNAs derivanti dalla degradazione del satellite vengano incorporati nel complesso RISC e lo ridirigano contro mRNAs della pianta, degradandoli, e provocando in questo modo i sintomi.

Come noto, l'RNA silencing rappresenta un complesso sistema di difesa delle piante nei confronti di RNA esogeni, inclusi quelli virali. Nel caso dei virus, il VIGS (virus-induced gene silencing) messo in atto dalla pianta a seguito dell'infezione, degraderebbe con particolari enzimi (ribonucleasi di tipo III, DICER) le forme replicative virali (dsRNAs) in frammenti di 21-25 nt (siRNAs). Successivamente, i duplex siRNA si legherebbero al complesso nucleasico RISC (RNA-induced silencing complex) e verrebbero degradati a singolo filamento (Nykanen et al., 2001; Schwarz et al., 2002; Matranga et al., 2005). Il complesso RISC verrebbe poi indirizzato alla degradazione degli mRNAs complementari agli siRNAs (Baulcombe, 2004; Pantaleo et al., 2007).

Gli siRNA complementari all'mRNA bersaglio funzionano, inoltre, da innesco per una RNA polimerasi-RNA dipendente (RdRP) che polimerizza gli mRNAs non ancora degradati a dsRNAs, che verrebbero, a loro volta, attaccati da Dicer (vedi fig.4).

D'altro canto, i virus hanno sviluppato diverse strategie per poter eludere o contrastare il meccanismo di silencing della pianta, tramite codificazione di proteine soppressori che si legherebbero agli siRNAs (Kasschau and Carrington, 1998; Voinnet et al., 1999; Voinnet, 2005; Lakatos et al., 2006; Merai et al., 2006).

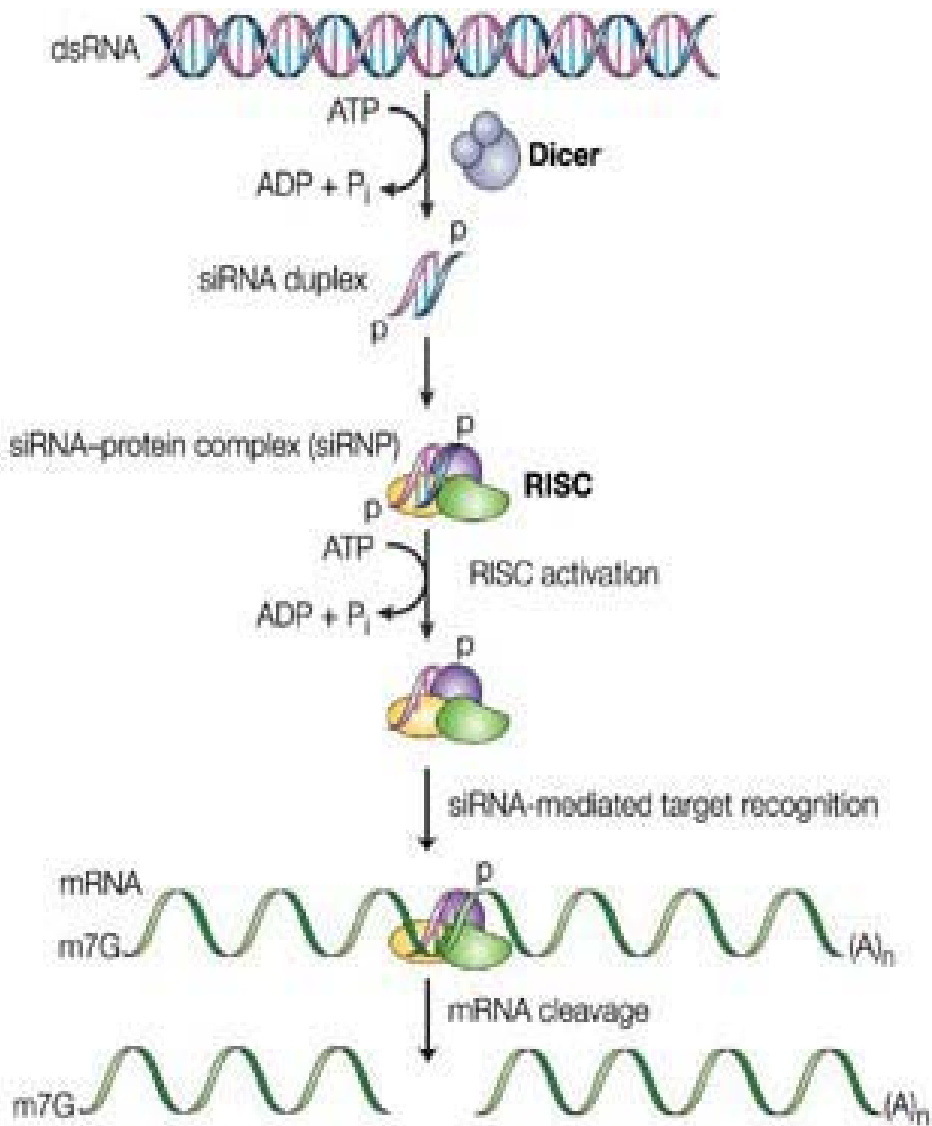


Fig.4. Esempificazione schematica del meccanismo di silencing mediato da siRNAs. Le forme replicative virali (dsRNA,) degradate dal complesso enzimatico DICER in siRNAs duplex di 21-25 nt, si legano al complesso RISC e vengono degradati a singolo filamento. Il RISC usa questi siRNAs come inneschi per la degradazione dei mRNAs ad essi omologhi.

Per verificare se il modello prima citato potesse essere applicabile in un contesto più generale, abbiamo usato piante di *Nicotiana benthamiana* normali, piante costitutivamente silenziate nella produzione della polimerasi 6 (RDR6), e piante trasformate con un soppressore virale del silencing (P19 da CymRSV= Cymbidium Ring Spot Virus), inoculandole con 3 differenti ceppi di CMV.

2 – MATERIALI E METODI

2.1) FONTI D' INOCULO

Per i nostri esperimenti abbiamo utilizzato 3 diversi ceppi di CMV: CMV-Y, contenente il satellite Y-sat (Takanami, 1981), appartenente al sottogruppo IA, Fny, appartenente al sottogruppo IB, e TRK7 compreso nel sottogruppo II (Owen and Palukaitis, 1988), che sono stati moltiplicati con inoculo meccanico su foglie di *N. benthamiana* impiegando succo cellulare di piante infette.

Per ottenere la sonda molecolare relativa al virus, è stato utilizzato il clone (pF309) di cDNA relativo all'RNA3 del ceppo Fny (Rizzo and Palukaitis, 1990).

Il satellite Y-satRNA (Masuta *et al.*, 1988) è stato ricavato dal plasmide pUT118GG-S (Kuwata *et al.*, 1988), tramite PCR, in cui si sono utilizzati 0.5 μ M dei primers sat-for1⁷ e sat-rev1⁸, in 50 μ l di volume finale di una miscela contenente tampone di amplificazione (Fermentas), 1.5 mM di MgCl₂, 0.4 μ M di dNTPs mix, 1U DNA Taq polimerasi. La miscela è stata sottoposta a 35 cicli di amplificazione costituiti da 1 min a 95°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C.

⁷ 5'TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTTTGTTTGATGGAGAATT3' (il sito del promotore della T7 RNA polimerasi è sottolineato)

⁸ 5' AATTAACCCTCACTAAAGGGGAGACCCGGTCCTGTAGAGGAATGTA3' (il sito del promotore della T3 RNA polimerasi è sottolineato)

Per eliminare i nucleotidi in eccesso e i sali presenti in soluzione, i prodotti di PCR sono stati addizionati di un ugual volume di isopropanolo e, dopo 30 min a -20°C, sono stati centrifugati a 15900 g per 15 min a 4°C. Il sedimento è stato infine lavato con etanolo al 75%, disidratato sotto vuoto ed infine risospeso in acqua deionizzata trattata con DEPC (dietilpirocarbonato).

Successivamente, 50 µg di cDNA ottenuto sono stati trascritti impiegando 10µM NTPs mix, 10U di inibitore dell'RNasi, 20 U di T7-RNA polimerasi, tampone di trascrizione relativo (Roche), in un volume finale di 50 µl, per 1 ora a 37°C.

2.2) PIANTE OSPITI E INOCULAZIONI MECCANICHE

Gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando piante di *Nicotiana benthamiana* normali (WT), piante transgeniche difettive per la produzione della RNA polimerasi 6 (linea RDR6i; Schwach et al., 2005) e piante trasformate con un soppressore virale del silencing (P19 del virus CymRSV; Silhavy et al., 2002). Le suddette piante sono state allevate in camera climatizzata (fitotrone) con temperatura costante

di $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e illuminazione artificiale di 3000 lux (fotoperiodo di 16h).

Gruppi di 3 piante RDR6 e 3 WT, allo stadio di 2 foglie, sono state inoculate ciascuno con una sospensione di circa $100\ \mu\text{g/ml}$ dei 3 ceppi virali in tampone di inoculo⁹ e $10\ \mu\text{g/ml}$ di Y-sat, nelle seguenti combinazioni: Fny; Fny con aggiunta di Y-sat; TRK7; TRK7 con aggiunta di Y-sat; CMV-Y con Y-sat; solo tampone (“mock inoculation”). Un ulteriore gruppo di 3 piante p19 sono state, infine, inoculate con CMV-Y-Ysat alla concentrazione sopra indicata.

Tredici e 21 giorni dopo l’inoculo, sono stati esaminati i sintomi manifestati dalle varie piante e da ogni pianta è stato estratto l’RNA totale.

2.3) ESTRAZIONE DI RNA TOTALE DALLE PIANTE

Da ogni pianta sono stati prelevati circa 200 mg di foglie, che sono state macerate in mortaio con N_2 liquido, addizionate di $600\ \mu\text{l}$ di tampone di estrazione¹⁰ e di un ugual volume di Fenolo. Dopo centrifugazione a bassa velocità ($15900\ \text{g}$) a temperatura ambiente per 5 min, è stata

⁹ 0,375 g di Glicina, 0,522 g di K_2HPO_4 , 1g di bentonite e 1 g di celite, in 100 ml di acqua deionizzata, pH 9.2.

¹⁰ 2% SDS, 1x EB (1M di Glicina, 100 mM EDTA, 1M NaCl, pH 9.5, in un volume finale di 100 ml di acqua deionizzata sterile).

prelevata la fase acquosa che, a sua volta, è stata addizionata di 600 µl di Fenolo-Cloroformio (1:1) e ricentrifugata a bassa velocità. La fase acquosa risultante è stata addizionata di 600 µl di cloroformio, centrifugata come sopra, e, dopo separazione delle fasi, è stata addizionata di 0.1 volumi di Na-acetato e 2.2 volumi di etanolo assoluto freddo. Dopo 20-30 min a 6°C, la sospensione è stata centrifugata a 15900 g alla medesima temperatura per 20 min. Il sedimento ottenuto è stato lavato con etanolo al 75%, disidratato sotto vuoto ed, infine, risospeso in 50 µl di acqua deionizzata trattata con DEPC (dietilpirocarbonato).

La qualità degli RNA estratti è stata verificata con elettroforesi per 2 h su gel di agarosio 1,2% a 60 V e colorazione con etidio bromuro (concentrazione finale 0.5-1 µg/ml).

2.4) GELS ELETTROFORESI E NORTHERN BLOTS

Per separare e distinguere gli RNA 3 e 4 virali e quello del satellite, è stato utilizzato 1 µg di RNA totale per pozzo, per ogni campione fogliare, dopo denaturazione con un'apposita miscela¹¹ a 65° per 15 min (Webster e Barker,1998).

¹¹ 1 µl 10X MOPS (0.2M MOPS pH 7.0, 20 mM Sodio acetato, 10 mM EDTA pH 8.0), 3.5 µl formaldeide 37%, 10 µl formammide deionizzata, in un volume finale di 20 µl.

L'elettroforesi su gel denaturante¹² di agarosio 1,5% era effettuata per circa 2.30 h a 40V impiegando tampone TBE¹³.

La separazione degli siRNAs è stata effettuata utilizzando, per ciascun campione, 5 µg di RNA totale disciolti in 20 µl di acqua deionizzata sterile e addizionati di 20 µl di colorante apposito¹⁴. Dopo incubazione di 20 min a 65°C e raffreddamento in ghiaccio, la miscela veniva sottoposta ad elettroforesi di circa 3.30-4 h a 350 V su gel denaturante di poliacrilamide¹⁵ 17%, impiegando tampone TBE.

Nello stesso gel veniva inclusa anche una miscela di RNAs radioattivi della lunghezza di 100- 20 nt. La marcatura era stata precedentemente effettuata unendo ad RNA sintetici (Decade Marker RNA, Ambion) una miscela di reazione contenente 10 pmol di oligonucleotidi, 20 U T4 kinasi, γ -³²P ATP (0.4 MBq), in un volume finale di 10 µl di tampone specifico per la chinasi (ROCHE). Dopo incubazione di 1h a 37°C, le sospensioni sono state liberate dai nucleotidi in eccesso per centrifugazione a bassa velocità su colonna (Quick spin column; Roche), da cui sono state ottenute, per eluizione, con tampone TE¹⁶.

¹² 1.4 g di agarosio sono stati disciolti in 72 ml di acqua distillata sterile, e aggiunti di 10 ml di 10X MOPS e 18 ml di formaldeide 37%.

¹³ 90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH 8.0.

¹⁴ 10 ml di formammide deionizzata, 200 µl 0.5 M EDTA (pH 8.0), 10 mg xylene cianolo, 10 mg bromofenolo blue.

¹⁵ 42.5 ml di soluzione 40% acrilamide/bis acrilamide (19:1), 10 ml 10 X TBE, 50 g di urea, 600 µl 10% Ammonio persolfato, 40 µl TEMED, 10 ml di acqua deionizzata sterile.

¹⁶ 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0.

Gli RNA sono stati trasferiti “overnight” dai gel di agarosio e acrilamide a membrane di nylon carica positivamente (Hybond N+, Amersham International), per capillarità, usando tampone 20X SSC¹⁷, secondo il protocollo di Maniatis et al. (1989).

Gli RNA sono stati successivamente fissati alle membrane per esposizione di 2 min a raggi ultravioletti di 315 nm di lunghezza d’onda.

2.5) PREPARAZIONE DELLE SONDE

La sonda di riconoscimento del virus è stata ottenuta per PCR degli ultimi 200 nt a partire dal 3’ del cDNA relativo all’RNA3 del ceppo Fny (clone pF309, vedi paragrafo 2.1). A tal scopo si sono utilizzati i primers vir-for¹⁸ e vir-rev¹⁹, alla concentrazione di 0.5µM, in una reazione contenente tampone di amplificazione (Fermentas), 1.5 mM di MgCl₂, 0.4 µM di dNTPs mix, 1U DNA Taq polimerasi, in 50 µl di volume finale. La reazione è stata sottoposta a 35 cicli di PCR ognuno di 1min a 95°C, 1 min a 52°C, 1 min a 72°C.

La sonda di riconoscimento del satellite è stata ottenuta per PCR come già descritto in precedenza (vedi paragrafo 2.1).

¹⁷ 3M NaCl, 0.3M Na-citrato x2H₂O, pH 7.0.

¹⁸ 5’ ATG TTG ACA TCG AGC ACC AAC GC3’

¹⁹ 5’ TGG TCT CCT TTT GGA GGC CCC CA3’

Per la marcatura delle due sonde, 100 ng di cDNA relativo al virus e al satellite, sono stati dapprima denaturati per 5 min a 96°C in 20 µl di tampone Klenow (Hexalabel Kit, Fermentas) e, successivamente, addizionati di 3 µl α -³²P-dCTP (1.85 MBq), 1.5 µl Mix C²⁰, 5U di Klenow polimerasi, e incubati a 37°C per 1h. La miscela di reazione è stata infine addizionata di 2 µl di dNTPs mix (10 µM), incubata 10 min a 37°C e successivamente a 95°C per 5 min.

Per la preparazione, tramite PCR, delle ribosonde relative all'intero genoma del satellite e alle regioni 1-95 nt; 95-182 nt; 182-369 nt del satellite stesso, da impiegare per il riconoscimento degli siRNAs, abbiamo utilizzato 4 differenti coppie di primers (sat-for1/sat-rev1, sat-for1/ sat-rev2, sat-for2/sat-rev3, sat-for3/ sat-rev1; vedi tab.3).

Le miscele utilizzate nelle reazioni di amplificazione sono state preparate come già detto in precedenza (paragrafo 2.1), e sottoposte a 35 cicli di 1 min a 95°C, 1 min a 52°C, 1 min a 72°C.

Per la marcatura, 50 µg di ogni cDNA ottenuto, sono stati trascritti in una reazione contenente NTPs mix (5mM ATP, 5mM CTP, 5mM GTP, 0.5 mM UTP), α -³²P-UTP (1.85 MBq), 10U di inibitore dell'RNasi, 20 U di T7-RNA polimerasi, tampone di trascrizione, in un volume finale di

²⁰ 0.33mM dGTP, 0.33mM dATP, 0.33mM dTTP.

10 µl. La miscela di reazione è stata incubata a 37°C per 1h e, successivamente, è stata denaturata a 95°C per 5 min.

2.6) IBRIDAZIONI MOLECOLARI

Per le ibridazioni molecolari, sono stati seguiti due differenti protocolli, a seconda del tipo di sonda impiegata (DNA o RNA).

Le membrane usate per l'identificazione del virus e del satellite sono state ibridate in appositi tubi separati, contenenti 15 ml di tampone di preibridazione²¹ a 65°C, ed incubate per circa 1,30 h con rotazione, in apposito fornetto di ibridazione (Mini-Hyb). Il liquido di preibridazione è stato poi sostituito per 12h da quello di ibridazione contenente la sonda radiomarcata di DNA (1:1000).

Dopo una serie di lavaggi a 65°C (2 in soluzione 2XSSC-0.1% SDS, 2 in soluzione 0.5X SSC -0.1% SDS, e 1 in soluzione 0.1X SSC - 0.1% SDS), le membrane sono state poste in cassetta autoradiografica su pellicola piana (Kodak BioMax Light Film) a -80°C. Dopo alcune ore di esposizione (5-12 h, a seconda dell'intensità del segnale), la

²¹ 50 ml di 20X SSC, 20 ml di soluzione 50X di Denhart's (1% Ficoll 400, 1% polivinilpirrolidone, 1% siero albumina bovina) e 130 ml di acqua deionizzata sterile.

pellicola veniva sviluppata per 30 sec con Kodak GBX developer e fissata con Kodak GBX fixer.

L'ibridazione con gli siRNAs è stata effettuata ponendo le membrane in tubi contenenti 15 ml di tampone di preibridazione specifico²², ad una temperatura di 37°C con rotazione per 1h. Dopo incubazione “overnight” alla stessa temperatura, con tampone di ibridazione contenente la ribosonda (1:1000), la membrana è stata lavata 2 volte con tampone 0.1X SSC -0.1% SDS e posta in cassetta radiografica su pellicola piana come precedentemente descritto.

Per l'ibridazione delle membrane con le 4 ribosonde relative al satellite, queste ultime sono state impiegate in successione, previa rimozione di quella precedente per “stripping”²³ di 1 h a 65°C.

²² 50 ml di formammide, 25 ml 20 X SSPE, 10 ml 50X Denhardt's, 5 ml 10% SDS, 1 ml 2mg/ml DNA di sperma di salmone, 9 ml di acqua deionizzata sterile.

²³ 5 ml EDTA, 5 ml 10%SDS, 490 ml acqua sterile.

PRIMER	SEQUENZA	POLARITÀ	POSIZIONE NEL GENOMA
SAT-FOR1	5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAG</u> TTTTGTTTGAT GGAGAATT3'	Senso	1-21 nt
SAT-REV1	5'AATTAACCCTCACTAAAGGGGAGACCCGGTCCTGTAG AGGAATGTA3'	Antisenso	369-348 nt
SAT-FOR2	5' <u>TAATACGACTCACTAATAGGGAGT</u> GTATCTCGGAC TGGAGG3'	Senso	96-115 nt
SAT-REV2	5' TCAACCCGCCTTAGCAGGGAG3'	Antisenso	94-74 nt
SAT-FOR3	5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAT</u> CAGCTCTGCAT TTCTCATTG3'	Senso	181-202 nt
SAT-REV3	5'AAAAGTCACCCCTTGGGTGAC3'	Antisenso	180-160 nt
VIR-FOR	5' ATG TTG ACA TCG AGC ACC AAC GC3'	Senso	1861-1883 nt
VIR-REV	5' TGG TCT CCT TTT GGA GGC CCC CA3'	Antisenso	2217-2194 nt

Tabella 3. Primers (*sat-for1/sat-rev1*) utilizzati per amplificare l'intero genoma del satellit e primers (da *sat-for2* a *sat-rev3* in tabella) relativi all'amplificazione del le 3 regioni in cui era stato diviso il genoma del satellite. *vir-for/vir-rev* = primers relativi agli ultimi 200 nt al 3' terminale dell'RNA3 del CMV ceppo Fny. E' stato sottolineato il sito del promotore della T7 RNA polimerasi e in corsivo è evidenziato il sito del promotore della T3 RNA polimerasi.

3 – RISULTATI

3.1) ANALISI SINTOMATOLOGICHE

Le piante inoculate con i ceppi Fny e TRK7 mostravano i primi sintomi di mosaico fogliare a circa 5 gg dall'inoculo, mentre in quelle inoculate con i 3 ceppi di virus (CMV-Y, Fny e TRK7) addizionati del satellite, a circa 7-8 gg dall'inoculo era visibile un ingiallimento fogliare.

La comparazione dei sintomi tra piante WT e transgeniche, non metteva in evidenza differenze significative, sia nell'intensità che nel momento della comparsa dei sintomi (foto 9).

Dall'accurata analisi effettuata a 13 e a 20 gg dall'inoculo, si è rilevato, inoltre, che i sintomi causati dai 3 complessi virus-satellite erano qualitativamente simili tra loro, e ciò faceva supporre che il satellite si fosse attivamente replicato con il ceppo omologo CMV-Y oltre che con gli eterologhi Fny e TRK7.

1

2

3

4

5

6

A



B



MOCK

CMV-Y-YSAT

FNY

FNY-YSAT

TRK7

TRK7-YSAT

Foto 9. Piante di *Nicotiana benthamiana* WT (A) e RDR6 (B) infette da i 2 ceppi virali Fny (A3, B3) e TRK7 (A5, B5) e dai 3 complessi CMV-Y-Ysat (A2, B2), Fny-Ysat (A4, B4) e TRK7-Ysat (A6, B6).

L'aggiunta del satellite determinava la comparsa di un accentuato ingiallimento delle foglie invece del semplice mosaico (A2, B2, A4, B4, A6, B6).

A1 e B1: Inoculo con il solo tampone, Mock.

3.2) PRESENZA DEL VIRUS E DEL SATELLITE NELLE PIANTE

Osservando le quantità di RNA virale e del satellite presenti nelle piante WT e RDR6 inoculate con i 2 complessi Fny-Ysat e TRK7-Ysat, risultava evidente che in presenza di Ysat si aveva, in entrambi i casi, la significativa diminuzione della quantità di virus, e ciò probabilmente a causa dell' effetto competitivo del satellite per la replicasi virale. La consistenza delle bande relative agli RNA3 e 4 dei ceppi Fny e TRK7 era, infatti, sensibilmente inferiore in presenza del satellite (foto 10).

Si osservava, inoltre, che, la quantità del satellite si incrementava sensibilmente nell'intervallo 13-20 gg dall'inoculo, mentre la quantità dei due virus rimaneva praticamente costante nello stesso periodo di tempo.

La quantità totale di Ysat a 13 e a 20 gg era, infine, maggiore nelle piante in cui il meccanismo di silencing era in parte compromesso (RDR6i).

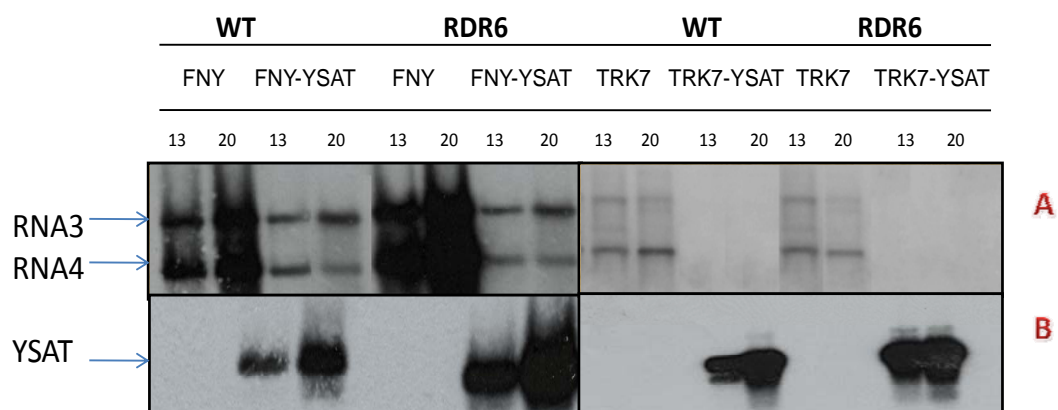


Foto 10. Ibridazioni Northern blot, con sonde di ^{32}P DNA specifiche, degli RNA virali 3 e 4 dei ceppi Fny e TRK7 e del satellite Y, estratti 13 e 20 gg dall'inoculo da piante WT e RDR6. Si noti come la consistenza delle bande relative agli RNA3 e 4 virali (A) era considerevolmente inferiore in presenza del satellite.

3.3) CARATTERISTICHE DEGLI siRNAs DEL SATELLITE NELLE PIANTE

L'utilizzo di sonde diverse, specifiche per le 3 regioni in cui è stato suddiviso il genoma del satellite, ci ha permesso di stabilire le zone di Ysat preferenzialmente degradate dal sistema di silencing della pianta.

Nel caso di CMV-Y-Ysat, la maggior parte dei sat-siRNAs derivavano dalla regione relativa ai primi 95 nt a partire dal 5' del genoma, e ciò sia in piante WT che nelle RDR6 e p19 (vedi foto 11, riquadro 1B).

A proposito del complesso Fny-Ysat, si osservava, invece, che i sat-siRNAs derivavano in egual misura dalle prime due regioni del satellite (1-95 e 96-182 nt) e, in quantità inferiore, dalla terza (foto 11, riquadro 2 D).

Nelle piante inoculate con TRK7-Ysat, infine, gli siRNAs rinvenuti provenivano apparentemente in egual misura da tutte le 3 regioni del satellite (foto 11, riquadri 3 B-C-D).

Ulteriori differenze fra gli siRNAs derivanti dai 3 complessi virus-satellite, riguardavano la loro lunghezza. Con il CMV-Y si osservavano 5-6 bande discrete della lunghezza di 21-30 nt, mentre per gli altri 2 ceppi la maggioranza degli siRNAs erano di circa 21-24 nt.

Nell'ambito dei singoli complessi non erano, inoltre, rilevabili differenze significative nella quantità e lunghezza di sat-siRNAs relativi a piante WT e RDR6.

Nelle piante P19 inoculate con il complesso CMV-Y-Ysat, invece, si notava una quantità inferiore di siRNAs rispetto agli altri tipi di piante e apparentemente si osservavano per lo più bande corrispondenti a 21-22 nt.

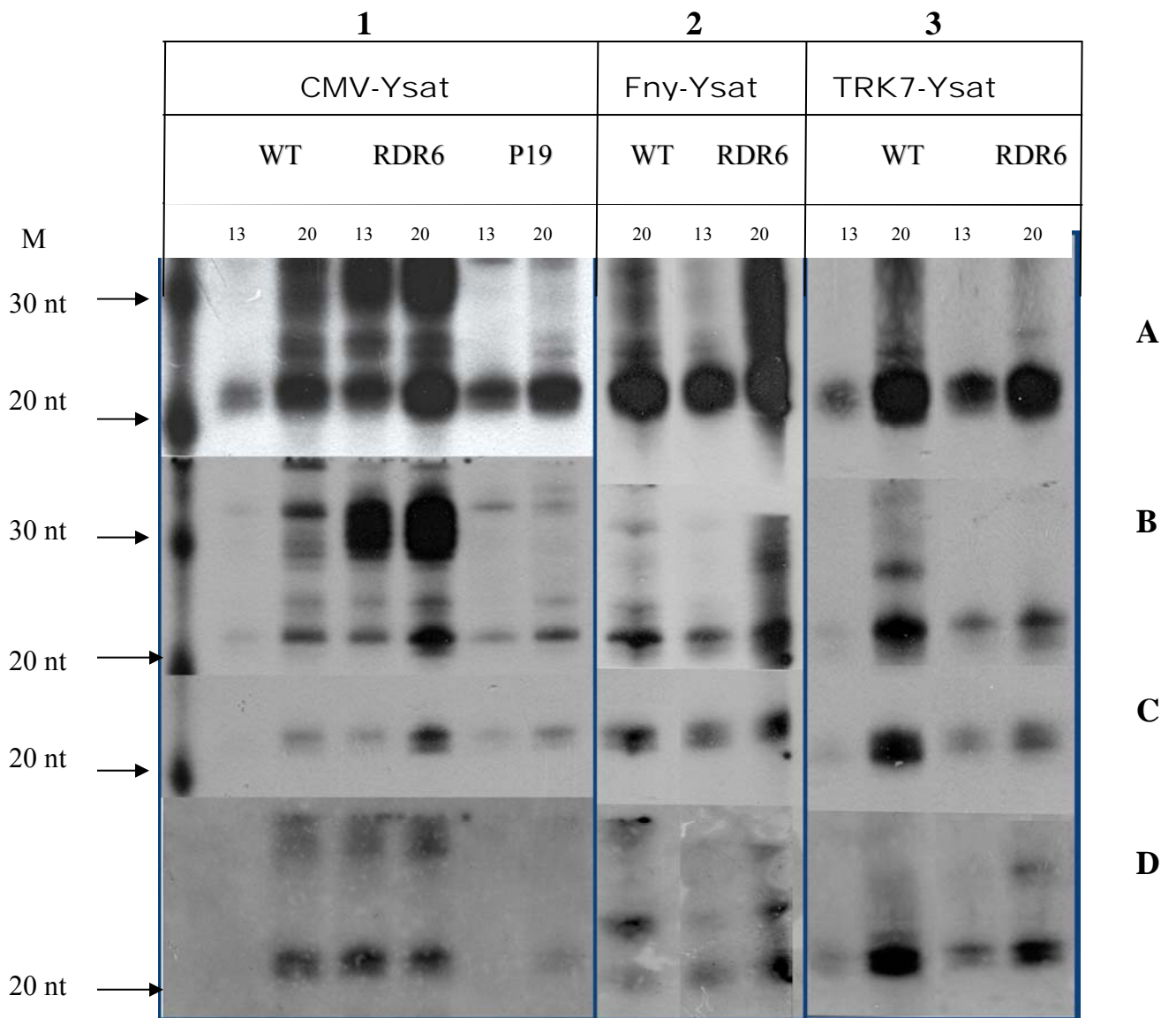


Foto 11. Ibridazione Northern blot, con ribosonde ^{32}P specifiche, dell'intero satellite Y (A) e delle 3 regioni in cui era stato suddiviso il genoma (B: 1-95 nt; C: 96-181 nt; D: 182-369 nt), estratti da piante infette dai 3 complessi virus-satellite a 13 e 20 gg dall'inoculo.

Si noti la diversa quantità degli siRNAs provenienti dalle 3 regioni, nei 3 diversi complessi virus-satellite.

4 – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il lavoro da noi svolto per chiarire il ruolo del satellite CARNA5-Y sulla sintomatologia del virus helper, permette di trarre alcune interessanti conclusioni.

Innanzitutto, che il manifestarsi dei sintomi di ingiallimento, al posto del semplice mosaico, sia indipendente dal tipo di ceppo virale preso in considerazione. Poi, che tale effetto si manifesti sia in piante normali (WT) che in quelle in cui il possibile sistema di PTGS è, almeno in parte, compromesso dall'azione del soppressore p19 (linea P19) o dalla presenza del gene difettivo della polimerasi 6 (linea RDR6i).

Wang et al. (2004), per piante di tabacco, normali e trasformate con il soppressore del silencing HC-PRO, avevano, però, osservato che i sintomi di ingiallimento non si manifestavano nelle piante HC-PRO+, che avevano anche quantità superiori di siRNAs derivanti dal satellite, rispetto ai controlli. Avevano, perciò, ragionevolmente ipotizzato che causa dei sintomi di ingiallimento fossero gli siRNAs del satellite, che ridirigevano il complesso RISC della pianta contro gli mRNAs endogeni, degradandoli.

Nel nostro caso sembrerebbe, però, che i due “soppressori” del silencing utilizzati non abbiano impedito l’ “effetto”

satellite, l'ingiallimento. Pur non potendo certamente contestare il risultato degli autori citati, ci pare di poter affermare che nelle combinazioni piante- virus- Ysat saggiate possa essere attivo anche un altro meccanismo, anche tenendo in considerazione che i “soppressori” da noi utilizzati abbiano un'azione solo parziale sul PTGS delle piante.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia in modo particolare il dr. Jozsef Burgyan (Plant Virology Group, Agricultural Biotechnology Center, Godollo, Ungheria), per la disponibilità con cui mi ha accolto nel suo laboratorio e per le competenze professionali con cui mi ha supportato, soprattutto nella parte II del mio lavoro. Si ringrazia, inoltre, la dott.ssa Chiara Colalongo per l'aiuto fornito nella realizzazione del corredo fotografico.

BIBLIOGRAFIA

- Balme-Sinibaldi V., Tribodet M., Croizat F., Lefeuvre P., Kerlan C., Jacquot E., 2006. Improvement of Potato Virus Y (PVY) detection and quantitation using PVYN- and PVY0-specific real-time RT-PCR assays. *Journal of Virological Methods* **134**: 261-266.
- Baulcombe D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature* **431**: 356-363.
- Beczner L., Horvath J., Romhanyi I., Forster H., 1984. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research* **27**: 339-352.
- Blanco-Urgoiti B., Sanchez F., Dopazo J., Ponz F., 1996. A strain-type clustering of potato virus Y based on the genetic distance between isolates calculated by RFLP analysis of the amplified CP gene. *Archives of Virology* **141**: 2425-2442.
- Boonham N., Hims M., Barker I., Spence N., 1999. Potato virus Y from petunia can cause symptoms of potato tuber

- ringspot disease (PTNRD). *European Journal of Plant Pathology*, **104**: 617-621.
- Boonham N., Walsh K., Hims M., North J., Barker I., 2002a. Biological and sequence comparison of Potato virus Y isolates associated with potato tuber necrotic ringspot disease. *Plant Pathology* **51**: 117-126.
 - Boonham N., Walsh K., Preston S., North J., Smith P., Barker I., 2002b. The detection of tuber necrotic isolates of Potato virus Y, and the accurate discrimination of PVY0, PVYN and PVYC strains using RT-PCR. *Journal of Virological Methods* **102** (1-2), 103-112.
 - 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.
 - Collmer C.W. and Howell S.H., 1992. Role of satellite RNA in the expression of symptoms caused by plant viruses. *Annual Review Phytopathology* **30**, 419-422.
 - Devic M., Jaegle M., Baulcombe D., 1990. Cucumber mosaic virus satellite RNA (strain Y): analysis of sequences

- which affect systemic necrosis on tomato. *Journal of General Virology*, **71**: 1443-1449.
- Ding S.W., Anderson B.J., Haase H.R., Symons R.H., 1994. New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology* **198**: 593-601.
 - Dougherty W.G. and Carrington J.C., 1988. Expression and function of potyviral gene virus. *Annual Review Phytopathology* **26**, 123-143.
 - Ellis P., Stace-Smith R., Bowler G., Mackenzie D.J., 1996. Production of monoclonal antibodies for detection and identification of strains of potato virus Y. *Canadian Journal Plant Pathology* **18**. 64-70.
 - Francki, R. I. B., 1985. Plant virus satellites. *Annual Review of Microbiology* **39**, 151-174.
 - Gallitelli D., 2000. The ecology of cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Virus research* **71**: 9-21.
 - Gal-On A., Kaplan I., Plukaitis P., 1995. Differential effects of satellite RNA on the accumulation of cucumber mosaic virus RNAs and their encoded proteins in tobacco vs zucchini squash with two strains of CMV helper virus. *Virology* **208**: 58-66.

- Garcia-Arenal F., Palukaitis P., 1999. Structure and functional relationship of satellite RNAs of cucumber mosaic virus. In: *Vogt PK, Jakson AO, eds. Satellites and defective Viral RNAs. Berlin: Springer-Verlag Press 1999: 37-63.*

- Gengotti S., 2005. La difesa della patata dalle principali avversità fitosanitarie. *Phytomagazine*, 40.

- Giunchedi L., Conti M., Gallitelli D., Martelli G.P., 2007. *Elementi di virologia vegetale*. Edizioni Piccin, 2007.

- Glais L., Tribodet M., Gauthier J.P., Astier-Manifacier S., Robaglia C., Kerlan C., 1998. RFLP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of different biological groups of potato virus Y. *Archives of virology* **143**, 2077-2091.

- Glais L., Tribodet M., Kerlan C., 2002. Genomic variability in potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY⁰ and PVY^N isolates. *Archives of Virology* **147**: 363-378.

- Glais L., Tribodet M., Kerlan C., 2005. Specific detection of the PVYN-W variant of Potato Virus Y. *Journal of Virological Methods*, **125**: 131-136.

- Goidanich G., Faccioli G., Canova A., 1976. Miglioramento fitosanitario della patata. *Giornata di studio sulla produzione e commercializzazione della patata*, Vergato (Bologna), 25-06-1976.

- Guo H.S., Ding S.W., 2001. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO Journal*, **226**: 354-361.

- Hadidi A., Khetarpal R.K., Koganezawa H., 1998. *Plant virus disease control*. APS Press, St Paul, Minnesota.

- Hayes R.J., Buck K.W., 1990. Complete replication of a eukaryotic virus RNA *in vitro* by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* **63**: 363-368.

- van der Heuvel J.F.J.M., van der Vlugt R.A.A., Verbeek M., DeHaan P.T., Huttinga H., 1994. Characteristics of a resistance breaking isolate of Potato virus Y causing potato tuber necrotic ringspot disease. *European journal of Plant Pathology* **100**: 347-356.

- Himber C., Dunoyer P., Moissiard G., Ritzenthaler C., Voinnet O., 2003. Transitivity- dependent an –independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO Journal*, **22**: 4523-4533.

- Jacquot E., Tribodet M., Croizat F., Balme-Sinibaldi V., Kerlan C., 2005. A single nucleotide polymorphism- based technique for specific characterization of Y⁰ and Y^N isolates of Potato virus Y (PVY). *Journal of Virological Methods* **125**: 83-93.

- Kaper J.M., 1992. Satellite-induced viral symptoms modulation in plants, a case of nested parasitic nucleic acids competing for genetic expression. *Research of Virology* **143**: 5-10.

- Kasschau K.D., Carrington J.C., 1998. A counter defensive strategy of plant viruses: suppression of post-transcriptional gene silencing. *Cell* **95**: 461-470.

- Kerlan C., 2004. Evolution in Potato virus Y: from recombination in the genome to emergence and spreading of variants. *Proceedings 12Th EAPR Virology Section Meeting*, Rennes, France, 2004.

- Kerlan C. and Le Romancer M., 1992. Potato tuber necrotic ringspot disease. *Proc. EAPR Meeting, Virology Section, Vitoria-Gasteiz (Spain)* pp77-79.

- Kerlan C. and Tribodet M., 1996. Are all PVY^N isolates able to induce potato tuber necrotic ringspot disease? *Proceedings EAPR Virology section Meeting, Veldhoven, The Netherlands, July 1996*, pp 65-66.

- Kuwata S., Masuta C., Takanami Y. (1988). Construction of novel transcription vectors for production of biologically active transcripts from viral cDNAs. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **54**: 510-515.

- Lakatos L., Csorba T., Pantaleo V., Chapman E.J., Carrington J.C., Liu Y.P., Dolja V.V., Calvino L.F., Lopez-Moya J.J., Burgyan J., 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressor. *EMBO Journal* **25**: 2768-2780.

- Le Romancer M., Kerlan C., and Nedellec M., 1994. Biological characterization of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathology*, **43**: 138-144.

- Le Romancer M., Nedellec M., 1997. Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of

- the potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). *Plant Pathology*, **46**: 104-111.
- Lorenzen J.H., Piche L.M., Gudmestad N.C., Meacham T., Shiel P., 2006. A multiplex RT-PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures. *Plant Disease* **90**: 935-940.
 - Maniatis T., Frish E.F., Sambrook J., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor laboratory Press USA.
 - Masuta C., Kuwata S., Takanami Y. (1988). Disease modulation on several plants by cucumber mosaic virus satellite RNA (Y strain). *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **54**: 332-336.
 - Masuta C. and Takanami Y., 1989. Determination of sequence and structural requirements for pathogenicity of a cucumber mosaic virus satellite RNA (Y-satRNA). *Plant Cell* **1**: 1165-1173.
 - Matranga C., Tomari Y., Shin C., Bartel D.P., Zamore P.D., 2005. Passenger- strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **123**: 607-620.

- Matthews R.E.F. et al, 1991. Plant Virology, Third edition. Academic Press, Inc.
- Merai Z., Kerényi Z., Kertész S., Magna M., Lakatos L., Silhavy D., 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology* **80**: 5747-5756.
- Moravec T., Cerovská N., Boonham N., 2003. The detection of recombinant tuber necrotizing isolates of Potato virus Y (PVYNTN) using a three-primer PCR-based in the coat protein gene. *Journal of Virological Methods* **109(1)**: 63-68.
- Moury B., Ayme V., Soche S., Jacquemond M., Johansen E., Jacquot E., Kerlan C., 2004. Potato virus Y: Which role for the host plants? *Proceedings 12th EAPR Virology Section Meeting*, Rennes, France, 2004.
- Nie X. and Singh R.P., 2002. A new approach for simultaneous differentiation of biological and geographical strains of Potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods* **104(1)**: 41-54.
- Nie X. and Singh R.P., 2003. Evolution on North American PVY^{NTN} strain Tu660 from local PVY^N by mutation rather than recombination. *Virus Genes* **26**: 39-47.

- Nie X., Singh R.P., Singh M., 2004. Molecular and pathological characterization of N:0 isolates of the Potato virus Y from Manitoba, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* **26**: 573-583.
- Nykanen A., Haley B., and Zamore P.D., 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* **107**:309-321.
- Owen J., Palukaitis P., 1988. Characterization of cucumber mosaic virus I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology* **166**: 495-502.
- Palukaitis P., Roossinck M.J., Shintaku M.H. and Sleat D.E., 1991. Mapping functional domains in cucumber mosaic virus and its satellite RNAs. *Canadian Journal of Plant Pathology* **13**: 155-162.
- Palukaitis P., Roossinck M.J., 1996. Spontaneous change of a benign satellite RNA of cucumber mosaic virus to a pathogenic variant. *Nature Biotechnology* **14**: 1264-1268.
- Pantaleo V., Szittyá G., Burgyan J., 2007. Molecular bases of viral RNA targeting by viral small interfering RNA-programmed RISC. *Journal of Virology* **81**: 3797-3806.

- Rao A.L.N., 1999. Symptomatology. *Molecular Biology of Plant Viruses*. Edited by C.L. Manahar, 1999.

- Revers F., Le Gall O., Candresse T., Le Romancer M., Dunez J., 1996. Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *Journal of General Virology*, **70**: 935-947.

- Rizzo T.M. and Palukaitis P., 1990. Construction of full-length cDNA clones of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2 and 3: generation of infectious RNA transcripts. *Molecular Gene Genetic*, **222 (2-3)**: 249-256.

- Rolland M., Glais I., Kerlan C., Jacquot E., 2008. A multiple single nucleotide polymorphism interrogation assay for reliable Potato virus Y group and variant characterization. *Journal of Virological Methods* **147**: 108-117.

- Roossinck M.J., Sleat D., Palukaitis P., 1992. Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. *Microbiological Review* **56**: 265-279.

- Roossinck, M. J., L. Zhang, and K.-H. Hellwald, 1999. Rearrangements in the 5'-nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3

- indicate radial evolution of three subgroups. *Journal of Virology* **73**:6752–6758.
- Roossinck M.J., 2001. Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution. *Molecular Plant Pathology* **2**: 59-63.
 - Rosner A. and Maslenin L., 1999. Differentiating PVYNTN by unique single-restriction cleavage of PCR products. *Potato research* **42**, 215-221.
 - Rosner A. and Malenin L., 2001. Differentiating PVYNTN from PVYN by annealing to reference RNA transcripts. *Journal of Virological Methods* **97(1-2)**: 125-131.
 - Rosner A. and Maslenin L., 2003. Tagging of viral RNA transcripts with strain-specific oligonucleotides: characterization and application. *Journal of Virological Methods* **110(1)**: 105-109.
 - Rubino L., J. Carrington and M. Russo, 1992. Biologically active Cymbidium Ringspot Virus satellite RNA in transgenic plants suppressed accumulation of dsDNA. *Virology* **188**: 429–437.
 - Schubert J., Fomitcheva V., Sztangret-Wisniewska J., 2007. Differentiation of potato virus Y strains using improved sets

- of diagnostic PCR-primers. *Journal of Virological Methods* **140**: 66-74.
- Schwach F., Vaistij F.E., Jones L., Baulcombe D., 2005. An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiology* **138**: 1842-1852.
 - Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Haley, B. & Zamore, P. D., 2002. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Molecular Cell* **10**: 537–548.
 - Sigvald R., 1984. The relative efficiency of some aphid species as vector of potato virus Y. *Potato Research*, **27**: 285-290.
 - Silhavy D., Molnar A., Lucioli A., Szittyá G., Hornyik C., Tavazza M., Burgyan J., 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO Journal* **21**: 3070-3080.
 - Simon A.E., Roossinck M.J., Havelda Z., 2004. Plant virus satellite and defective interfering RNAs. New paradigms for a new century. *Annual Review Phytopathology* **42**: 415-437.

- Singh R.P, Boucher A., Somerville T.H., Dhar A.K., 1993. Selection of monoclonal antibody to detect PVY^N and its use in ELISA and DIBA assays. *Canadian Journal Plant Pathology* **18**, 209-224.
- Singh R.P., J.P.T. Valkonen, S.M. Gray, N. Boonham, R.A.C. Jones, C. Kerlan, J. Schubert, 2007. Discussion paper: The naming of Potato virus Y strains infecting potato. *Archives of Virology*, **153(1)**: 1-13.
- Szemes M., Klerks M.M., van den Heuvel J.F., Schoen C.D., 2002. Development of multiplex AmpliDet RNA assay for simultaneous detection and typing of potato virus Y isolates. *Journal of Virological Methods* **100(1-2)**: 83-96.
- Takanami, Y., 1981. A striking change in symptoms on cucumber mosaic virus-infected tobacco plants induced by a satellite RNA. *Virology* **109**: 120-126.
- Tomassoli L., Lumia V., Cerato C., Ghedini R., 1998. Occurrence of Potato Necrotic Ringspot Disease (PTNRD) in Italy. *Plant Disease* **82**: 350.
- Tribodet M, Glais L., Kerlan C., Jacquot E., 2005. Characterization of Potato virus Y (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom

- induced by PVY^N isolates infected *Nicotiana tabacum* cv Xanthi. *Journal of General Virology*, **86**: 2101-2105.
- Voinnet O., Pinto Y.M., Baulcombe D.C., 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses. *PNAS*, **96**: 14147-14152.
 - Voinnet O., 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature reviews*, **6**: 206-221.
 - Walsh K., North J., Barker I., Boonham N., 2001. Detection of different strains of Potato virus Y and their mixed infections using competitive fluorescent RT-PCR. *Journal of Virological Methods* **91(2)**: 167-173.
 - Wang M.B., Bian X.Y., Liu L.X., Smith N.A., Isenegger D., Wu R.M., Masuta C., Vance V.B., Watson J.M., Dennis E.S., Waterhouse P., 2004. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *PNAS* **101**: 3275-3280.
 - Whitman S.A., Yang C., Goodin M.M., 2006. Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *MPMI* **19**: 1207-1215.
 - Webster K.D., Barker H., 1998. Detection and quantification of transcript RNA in transgenic plants using

digoxigenin-labeled cDNA probes. *Plant Virology protocols*, Humana Press.

- Weidemann H.L., Maiss E., 1996. Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVY^{NTN}) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. *Journal of Plant Disease Protection*, **103**: 337-345.

- Wu G., Kaper J.M., Tousignant M.E., Masuta C., Kuwata S., Takanami Y., Pena L., Diaz-Ruiz J.R., 1993. Tomato necrosis and the 369 nucleotide Y satellite of cucumber mosaic virus, factors affecting satellite biological expression. *Journal of General Virology*, **74**: 161-168.