

ALMA MATER STUDIORUM

Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN:

**“Ecologia Microbica e Resistenza Indotta ad Agenti Fitopatogeni e Colture
Erbacee”**

Pogetto N.2 “Resistenza Indotta ad Agenti Fitopatogeni”

XX CICLO

Settore scientifico disciplinare: Area07 Agr/12

PRODUZIONE DI VIRUS SINTETICI PER LO STUDIO DEI

MECCANISMI DI INTERAZIONE COINVOLTI

NELL’INDUZIONE DI RESISTENZA

Tesi di Dottorato presentata dalla Dott.ssa:

Laura Bianchi

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Paolo Bertolini

Relatore:

Dott.ssa Concepcion Rubies Autonell

Correlatore:

Dott. Claudio Ratti

Esame finale anno 2008

INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE.....	pag. 1
1.1 Importanza della coltura della bietola	pag. 2
1.2 Virus dell'ingiallimento nervale necrotico della barbabietola, la Rizomania.....	pag. 3
1.2.1 Aspetti fitopatologici ed epidemiologici.....	pag. 3
1.2.2 Condizioni di propagazione della malattia in ambiente naturale.....	pag. 7
1.2.3 Misure di controllo della malattia in ambiente naturale.....	pag. 8
1.2.4 Descrizione del BNYVV.....	pag. 9
1.2.5 Organizzazione molecolare del genoma del BNYVV	pag. 9
1.2.5.1 RNA 1	pag. 10
1.2.5.2 RNA 2	pag. 11
1.2.5.3 RNA 3	pag. 12
1.2.5.4 RNA 4	pag. 13
1.2.5.5 RNA 5	pag. 14
1.2.5.6 Omologie e relazioni.....	pag. 15
1.2.6 Caratterizzazione molecolare del BNYVV.....	pag. 17
1.3 Virus del mosaico comune della bietola trasmesso dal terreno	pag. 20
1.3.1 Aspetti fitopatologici ed epidemiologici.....	pag. 20
1.3.2 Organizzazione molecolare del genoma del BSBMV	pag. 21
1.3.2.1 RNA 1	pag. 21
1.3.2.2 RNA 2	pag. 22
1.3.2.3 RNA 3	pag. 23
1.3.2.4 RNA 4	pag. 23
1.4 Confronto BNYVV e BSBMV	pag. 23
1.4.1 Studio della "Cross protection" fra BSBMV e BNYVV.....	pag. 25
1.5 Scopo della ricerca	pag. 27
CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI.....	pag. 29
2.1 Materiale vegetale	pag. 30
2.2 Tecniche molecolari	pag. 30
2.2.1 Estrazione degli ssRNA dai tessuti vegetali	pag. 30

2.2.1.1 Estrazione con CTAB	pag. 30
2.2.1.2 Estrazione con Trizol	pag. 32
2.2.1.3 Estrazione con “Polysome buffer”	pag. 33
2.2.1.4 Estrazione con tampone TM	pag. 34
2.2.2 Reazione di trascrittasi inversa (RT) abbinata alla reazione a catena della polimerasi (PCR)	pag. 35
2.2.3 Protocollo di RT-PCR multiplex per la diagnosi e caratterizzazione di BNYVV, <i>Polymyxa betae</i> , BSBV, BVQ e BSBMV	pag. 36
2.2.4 Estrazione della banda elettroforetica	pag. 39
2.2.5 Purificazione DNA	pag. 39
2.2.6 Procedura di “A-tailing”	pag. 40
2.3 Clonaggio dei prodotti di PCR	pag. 40
2.3.1 Preparazione delle cellule di <i>Escherichia Coli</i> per elettroporazione	pag. 40
2.3.2 Reazione di ligasi	pag. 41
2.3.2.1 Ligasi con kit pGEM-T Easy Vector System (Promega)	pag. 41
2.3.2.2 Ligasi con kit Rapid DNA ligation (Fermentas)	pag. 42
2.3.3 Trasformazione mediante elettroporazione delle cellule di <i>E. Coli</i>	pag. 42
2.3.4 Estrazione del plasmide ricombinante	pag. 44
2.3.5 Sequenziamento degli inserti	pag. 45
2.4 Western Blot	pag. 45
2.4.1 Preparazione dei campioni	pag. 45
2.4.2 SDS-PAGE	pag. 46
2.4.3 Protein blotting	pag. 47
2.4.4 Preparazione della membrana e deposizione anticorpi	pag. 48
2.5 Northern Blot	pag. 49
2.5.1 Estrazione RNA e corsa elettroforetica	pag. 49
2.5.2 Trasferimento RNA su membrana	pag. 50
2.5.3 Sintesi della sonda a DNA con il Kit Ready-To-Go DNA Labelling Beads (Amersham Beads)	pag. 50
2.5.4 Ibridazione della sonda	pag. 51
2.5.4 Sviluppo lastra fotografica	pag. 51
2.6 Trascrizione in vitro	pag. 51
2.6.1 Inoculo	pag. 53

2.7 Tecniche di microscopia	pag. 53
CAPITOLO 3: RISULTATI.....	pag. 54
3.1 ottenimento dei cloni cDNA degli RNA di BSBMV e BNYVV.....	pag. 55
3.1.1 Sintesi dei cloni cDNA degli RNA 1 e 2 di BSBMV	pag. 55
3.1.2 Sintesi dei cloni cDNA degli RNA 1 e 2 di BNYVVV.....	pag. 56
3.1.3 Sintesi di un clone cDNA infettivo dell'RNA3 di BSBMV	pag. 58
3.1.4 Sintesi di un clone cDNA infettivo dell'RNA4 di BSBMV	pag. 58
3.1.5 Analisi delle sequenze	pag. 58
3.2 Trascrizione e inoculo degli RNA di BSBMV e BNYVV	pag. 63
3.2.1 Trascrizione e inoculo degli RNA 1 e 2 di BSBMV e BNYVV	pag. 63
3.2.2 Trascrizione e inoculo dell'RNA3 di BSBMV	pag. 65
3.2.2.1 Sequenze estranee e sono espresse con successo dal replicone basato sull'RNA3 di BSBMV	pag. 68
3.2.3 Trascrizione e inoculo dell'RNA4 di BSBMV	pag. 73
3.2.3.1 Inoculi seriali di BSBMV su <i>C. quinoa</i> hanno portato alla comparsa di una chimera RNA4-RNA3 del BSBMV	pag. 74
3.3 Core Region RNA3 BNYVV	pag. 77
3.3.1 Sintesi di un clone cDNA della Core Region dell'RNA3 di BNYVV	pag. 77
3.3.2 Trascrizione e inoculo della Core Region.....	pag. 77
3.4 Messa a punto di un metodo per l'infezione naturale attraverso il vettore <i>P. betae</i> di radici di barbabietola da zucchero con BSBMV e BNYVV	pag. 78
3.4.1 Protocollo per l'infezione naturale di piante di barbabietola da zucchero mediato da <i>P. betae</i>	pag. 78
3.4.2 Infezione naturale attraverso il vettore <i>P. betae</i> di radici di barbabietola da zucchero con BSBMV e BNYVV.....	pag. 80
CAPITOLO 4: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag. 81
4.1 Discussione.....	pag. 82
4.2 Conclusioni	pag. 92
Appendice A	pag. 94

Appendice B1	pag. 96
B2.....	pag. 101
B3.....	pag. 104
B4.....	pag. 109
B5.....	pag. 113
B6.....	pag. 115
B7.....	pag. 117
B8.....	pag. 118
Bibliografia	pag. 120

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Importanza della coltura della bietola

Le piante saccarifere coltivate nel mondo sono fondamentalmente due: la canna da zucchero (*Saccharum officinarum*) nei climi tropicali e subtropicali, e la barbabietola da zucchero (*Beta vulgaris* var. *saccharifera* della famiglia *Chenopodiaceae*) nei climi temperati.

La produzione mondiale di barbabietola da zucchero è di circa 250 milioni di tonnellate, in massima parte prodotte da Francia, Germania, USA, Federazione Russa. In Europa, i principali produttori di barbabietola da zucchero sono Francia, Germania, Federazione Russa, Polonia, Italia ed Ucraina (Tabella 1.1) (Fao, 2005).

<i>Nazione</i>	<i>Produzione (Mt)</i>	<i>Resa (kg/Ha)</i>
Austria	3.083.790	690.041
Belgio	5.983.170	699.565
Repubblica Ceca	3.495.610	533.111
Francia	31.242.510	823.220
Germania	25.294.700	601.873
Ungheria	3.515.870	570.359
Italia	14.155.680	599.418
Polonia	11.912.440	416.264
Russia	21.420.110	282.319
Spagna	7.275.700	713.304
Ucraina	15.467.800	248.160
Regno Unito	8.687.000	586.959

Tabella 1.1. Produzioni, rese dei principali produttori europei di barbabietola da zucchero riferite all'anno 2005.

L'Italia produce 14,1 milioni di tonnellate di fittoni, gli ettari di terreno coltivati a bietola sono 236.150 e le rese in zucchero sono di 5,99 t/ha (Fao, 2005).

La bietola è una pianta soggetta a numerose fitopatie catalogate sulla base della loro origine batterica, virale o fungina (Whitney e Duffus, 1986). In particolare, vi sono diverse virosi trasmesse dal terreno che colpiscono la coltura sia a livello mondiale che italiano provocando gravi perdite.

I virus sono parassiti obbligatori dei procarioti e degli eucarioti sia vegetali che animali. I virus necessitano della macchina cellulare del loro ospite per moltiplicarsi, hanno patrimonio genetico di tipo a RNA o DNA, singolo filamento (di polarità positiva o negativa) o doppio filamento. I virus delle

Anno	Nazione	Autori
1959	Italia	Canova.
1973	Grecia	Kouyeas.
1974	Francia	Putz e Vuittenez.
1977	Germania	Hamdorf <i>et al.</i>
1978	Iugoslavia	Sutic e Milovanovic.
1981	Austria	Krexner.
1981	Romania	Codrescu <i>et al.</i>
1983	Svizzera	Haeni e Bovey.
1984	Cecoslovacchia	Novak e Lanzova.
1984	Olanda	Heijbroeck <i>et al.</i>
1984	Bulgaria	Jankulova, Gueorguieva e Ivanova.
1989	Svezia	Lindsten
1987	Regno Unito	Asher e Thompson.
1988	Spagna	Cambra e Garcia; Raposo e Mateo-Sagasta.
1989	Belgio	Meulewater <i>et al.</i>
2006	Lituania	Jackeviciene <i>et al.</i>

Tabella 1.2. Cronologia dell'identificazione del BNYVV in Europa.

piante, fitovirus, infettano specie vegetali molto varie, sono suddivisi in una quarantina di famiglie e il loro genoma è nella maggior parte dei casi costituito da RNA singolo filamento di polarità positiva.

La barbabietola da zucchero non è risparmiata da questi parassiti, essenzialmente le malattie ad eziologia virale trasmesse dal terreno che si riscontrano di frequente nei seminati della bietola sono quattro: la più importante, la rizomania, è causata dal virus dell'ingiallimento nervale necrotico della barbabietola (*Beet necrotic yellow vein virus*, BNYVV), seguono il virus della bietola trasmesso dal terreno (*Beet soil-borne virus*, BSBV), il virus Q (*Beet virus Q*, BVQ) e il virus del mosaico comune della bietola trasmesso dal terreno (*Beet soilborne mosaic virus*, BSBMV), attualmente identificato esclusivamente negli Stati Uniti. In Italia sono stati finora identificati il BNYVV, il BSBV e il BVQ (Ratti *et al.*, 2005; Rubies *et al.*, 2006).

1.2 Virus dell'ingiallimento nervale necrotico della barbabietola, la Rizomania

1.2.1 Aspetti fitopatologici ed epidemiologici

In patologia vegetale spesso accade che gli agenti patogeni, soprattutto quelli virali, siano riconosciuti ed identificati con un termine che si rifà alla sintomatologia.

Nel caso delle fitopatie a precisa sintomatologia, che colpiscono la bietola, al primo posto, per danni e diffusione, vi è la rizomania, il nome deriva dal principale sintomo che questa malattia causa che consiste in una abnorme proliferazione delle radici (“*Rhizo*” = radice, “*mania*” = pazzia) (Figura 1.1). La malattia, descritta per la prima volta da Canova (1959), è stata successivamente identificata in diverse aree del mondo dove la bietola è coltivata. In Europa la malattia è stata individuata in diverse nazioni come indicato in tabella 1.2.

La rizomania risulta molto dannosa, può infatti provocare perdite di prodotto fino al 45-50 % in peso del fittone e fino al 60-79 % nel contenuto in zuccheri (Casarini Camangi, 1987). Negli ultimi anni ha raggiunto una vastissima distribuzione geografica, un’intensità e frequenza d’attacco tali da compromettere la coltura saccarifera in molti comprensori bieticoli



Figura 1.1. Abnorme sviluppo del capillizio radicale di *B. vulgaris* infetta da rizomania.



Figura 1.2. Sintomi di rizomania in campo.

dell'Italia settentrionale (Bongiovanni, 1964; Rana *et al.*, 1978, Turina *et al.*, 1996; 1999; Ratti *et al.*, 2005).

La malattia è caratterizzata da un abnorme capillizio radicale distribuito lungo i solchi saccariferi del fittone e di solito anche nelle zone lisce interposte a quelle del capillizio che, in parte, diviene poi sede di processi degenerativi a carattere necrotico.

La pianta, di colore verde-pallido e di sviluppo alquanto ridotto, presenta un apparato fogliare limitato nel quale, alcune volte, si riscontrano anche ingiallimenti più marcati lungo le nervature fogliari. Contemporaneamente cominciano a manifestarsi fenomeni di carenza idrica a carico dell'apparato aereo fino a determinare, nelle giornate più calde, l'avvizzimento di gran parte delle foglie (Canova, 1975) (Figura 1.2).

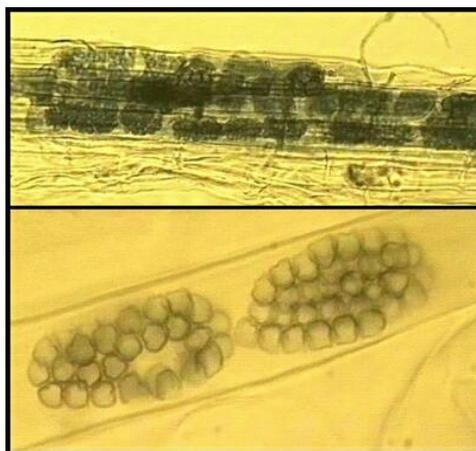


Figura 1.3. Ammassi di spore durevoli (cistosori) di *Polymyxa betae* al microscopio ottico.

L'agente eziologico della rizomania è il virus dell'ingiallimento nervale necrotico della bietola (BNYVV) (Tamada e Baba, 1973) appartenente al genere *Benyvirus* (Koenig e Lesemann, 2005). Questo virus è trasmesso in maniera persistente dal

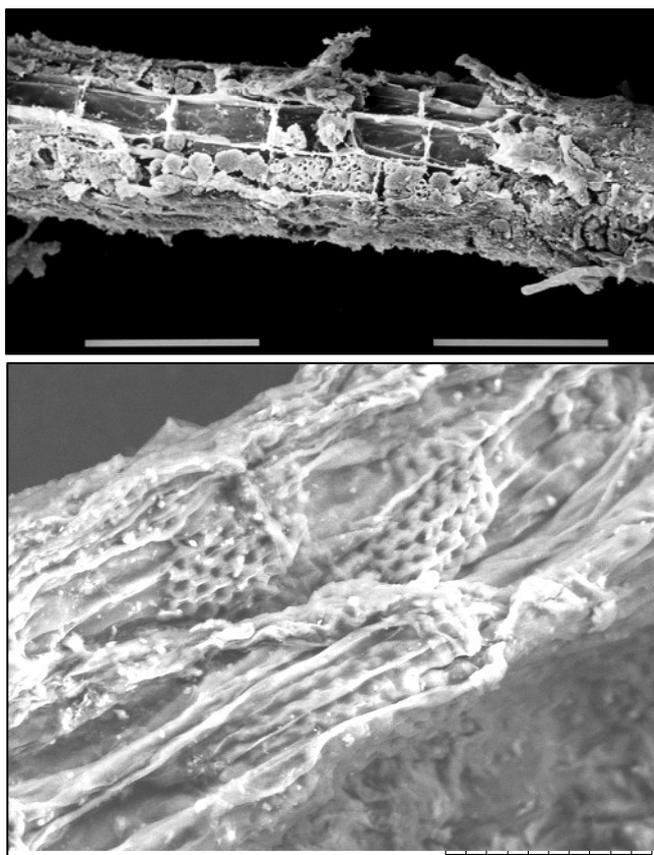


Figura 1.4. Ammassi di spore durevoli (cistosori) di *Polymyxa betae* al microscopio elettronico a scansione.

protozoo *Polymyxa betae* Keskin (Keskin, 1964) parassita obbligato del tessuto radicale di alcune specie vegetali (principalmente *Chenopodiaceae*), inclusa la bietola.

Il ciclo vitale del protozoo, (Figura 1.5), implica almeno quattro forme:

a) spore durevoli (cistosori, Figura 1.3 e 1.4), in grado di restare vitali nel terreno per anni senza perdere la virulenza (Richards e Tamada, 1992), dalle quali si differenziano

b) zoospore mobili, biflagellate che nuotano attraverso la fase liquida finché

entrano nella rizosfera di una radice ospite. Il virus, in genere, aderisce alla guaina del flagello tramite interazioni proteiche ed è portato all'interno delle zoospore in seguito all'assorbimento del flagello. Le zoospore, quindi, s'incistano e per mezzo di uno stiletto riversano il proprio contenuto citoplasmatico nella cellula ospite portando alla formazione di

c) forme plasmodiali multinucleate dentro il citoplasma cellulare.

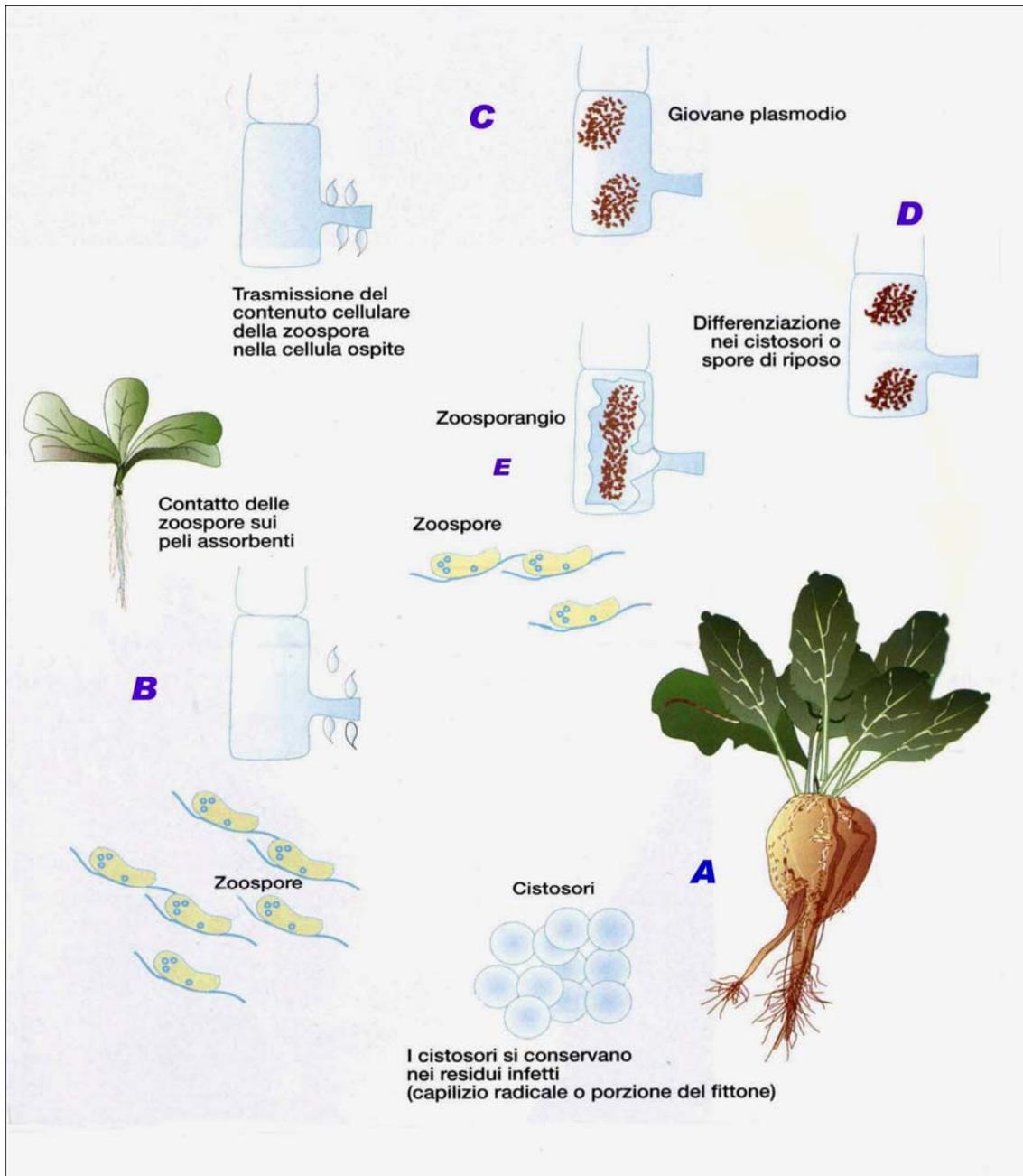


Figura 1.5: Ciclo vitale di *Polymyxa betae* Keskin (Fonte: "Le tecniche di coltivazione delle principali colture agroindustriali". Agronomica 1995).

d) Il plasmodio può, poi, o ricostituire i cistosori (D), o differenziarsi in zoosporangi (E) in grado di formare ed emettere le zoospore nel mezzo extracellulare.

Quando *P. betae* colpisce una pianta infettata con BNYVV, il virus può essere acquisito dal protozoo e trasmesso ad un'altra pianta. Sia le zoospore sia i cistosori possono trasmettere il virus che si localizza al loro interno.

1.2.2 Condizioni di propagazione della malattia in ambiente naturale

Numerosi parametri influenzano l'incidenza e la severità della malattia in campo. La malattia si manifesta abitualmente dopo l'introduzione di terreno infestato (Rush, 2003), in queste condizioni possono ritrovarsi piccole quantità di *P. betae* virulifera. La prima localizzazione della malattia si evidenzia, in pieno campo, in aree con piante dall'aspetto giallastro durante la stagione di coltivazione della bietola. Con il passare degli anni, l'inoculo iniziale cresce in maniera esponenziale, anche 10000 volte per stagione di coltivazione bieticola. La rapida progressione della malattia nei campi è attribuita a una migrazione facilitata delle zoospore virulifere causata dal sistema di irrigazione. È stato dimostrato che le operazioni meccaniche di preparazione del suolo e di raccolta sono le principali responsabili della propagazione della malattia (Harveson *et al.*, 1996).

Dopo l'apparizione della popolazione di *P. betae* infetta, la densità di inoculo è influenzata da diversi parametri, quali, l'aggressività dell'isolato di *P. betae* introdotto, la densità d'inoculo della popolazione di vettore non virulifero e la coltivazione di un ospite sensibile a *P. betae* e al virus.

La pressione di inoculo è il parametro più importante per determinare quale popolazione del vettore può prendere il sopravvento. In effetti, l'isolato che infetta per primo l'apparato radicale dell'ospite avrà un vantaggio nel ciclo infettivo. Se la popolazione originale del vettore avirulento è in densità minore, la popolazione virulenta introdotta avrà la capacità di accrescere considerevolmente la sua densità in una sola stagione di coltivazione.

La severità della malattia e la perdita di rendimento sono massime quando le condizioni di moltiplicazione del vettore sono ottimali (Rush, 2003): temperature fra i 25-30 °C e una elevata umidità del suolo favoriscono la

proliferazione di *P. betae*, che è accentuata notevolmente nei terreni irrigui. Queste condizioni aumentano anche la possibilità di infezione da parte di altri virus trasmessi dallo stesso vettore *P. betae*, BSBV, BVQ e BSBMV (Adams, 2002). È stato dimostrato che la severità della malattia è legata alla quantità del complesso virus-vettore presente nel suolo e dunque alla densità di inoculo. Più le condizioni di moltiplicazione del vettore sono favorevoli più generazioni di zoospore virulifere vengono liberate nel terreno e più la severità della malattia e le perdite di rendimento sono importanti (Rush, 2003).

1.2.3 Misure di controllo della malattia in ambiente naturale

A causa della modalità di trasmissione gli unici metodi di controllo efficaci risultano l'analisi pre-semina del terreno per valutare la presenza di BNYVV (Lewellen e Wrona, 1997) oppure la fumigazione del suolo con il bromuro di metile. Questa misura estrema è efficace per ridurre fortemente la densità dell'inoculo, ma ad un costo e una tossicità proibitivi se utilizzati su larga scala (Rush, 2003).

La semina in condizioni di temperatura basse (<15°C) permette inoltre di evitare un'infezione precoce e lo sviluppo rapido della malattia. La riduzione dei volumi irrigui e un buon drenaggio permettono anch'essi di limitare la proliferazione di *P. betae*.

La miglior strategia per ridurre l'incidenza della rizomania resta comunque l'impiego di varietà resistenti al vettore ed al virus. La resistenza a *P. betae* è stata individuata in una specie selvatica di barbabietola (Scholten e Lange, 2000) e un importante lavoro di selezione è stato intrapreso al fine di ottenere varietà di bietola coltivate che possiedano questa resistenza.

La resistenza a BNYVV è stata introdotta nelle moderne varietà che possiedono il gene *Holly* (Rz1, Rush, 2003, Scholten e Lange, 2000), tali piante presentano una forte resistenza a BNYVV che comunque non è totale. La resistenza alla rizomania, in molte cultivar commerciali di barbabietola, è condizionata dall'allele dominante Rz e da fattori quantitativi che sembrano modificare l'espressione del gene (Lewellen *et al.*, 1987; Lewellen e Biancardi, 1990). In condizioni favorevoli all'infezione da rizomania, il dosaggio genico e la frequenza allelica (rapporto allelico Rz / rz in una cultivar) condizionano il

comportamento delle piante (Wisler *et al.*, 1999). Alcune cultivar, parzialmente resistenti al BNYVV, contenenti i geni Rz 1 e Rz 2, hanno infatti mostrato una risposta variabile in campo quando coltivate in Paesi diversi. Questo potrebbe, però, essere causato anche da differenze riscontrate nel genoma di diversi isolati del virus (Heijbroek *et al.*, 1999).

L'utilizzo di un solo gene di resistenza contro un virus a RNA è però rischioso. In effetti, il forte tasso di mutazione del virus combinato a una forte pressione selettiva può rapidamente favorire l'insorgenza di popolazioni virali che aggirano questa resistenza (Rush, 2003). L'utilizzo di piante che portano due geni di resistenza conferisce perciò alle varietà una maggiore resistenza al BNYVV.

1.2.4 Descrizione del BNYVV

Il BNYVV è un virus a genoma multipartito, a singolo filamento di RNA di polarità positiva. Inizialmente è stato classificato nel genere *Furovirus* che è poi stato ridefinito in cinque generi distinti: *Furovirus*, *Pomovirus*, *Pecluvirus*, *Benyvirus* e *Hordeyivirus*. (Torrance e Mayo, 1997; Shirako *et al.*, 2000). Il BNYVV fa ormai parte del genere dei *Benyvirus*, di cui è il capostipite, e a cui appartiene anche il BSBMV (Koenig et Lesemann 2005). Questa nuova classificazione è stata fatta in base alle proprietà di ciascun virus, al loro vettore di trasmissione, al numero di RNA, al tipo di polimerasi, alla presenza o meno della sequenza poly-A all'estremità 3', alla presenza delle tre griglie di lettura (open reading frame, ORF) costitutive del blocco dei tre geni (triple gene blok, TGB) e alla presenza della proteina di rivestimento (coat protein, CP).

1.2.5 Organizzazione molecolare del genoma del BNYVV

I virioni di BNYVV sono bastoncini rigidi ribonucleoproteici di simmetria elicoidale composti da copie multiple della CP di 21 kDa e da una singola molecola di RNA.

La diffrazione ottica d'immagini, ottenute attraverso microscopia elettronica, ha rilevato che ogni subunità della CP è associata a quattro nucleotidi (nt) (Steven *et al.*, 1981). I bastoncini hanno un diametro costante (20 nm compreso il lume di 2 nm) ma diverse classi di lunghezza (390, 265, 100, 85 nm; Putz, 1977), a seconda dell'RNA incapsidato come riassunto in tabella 1.3.

Gli isolati di BNYVV contengono tipicamente quattro specie di RNA a singola catena ma si è osservata la presenza di una quinta specie di RNA in alcuni isolati giapponesi ed europei (Tamada *et al.*, 1989; Koenig *et al.*, 1995, 1997; Ward *et al.*, 2007).

Lunghezza (nm)	390, 265, 100, 85
Passo (nm)	2.06
Nucleotidi/proteina	4
Proteina di rivestimento (Da)	21.000
Diametro (nm)	20
Nucleotidi/ giro	49
Subunità/ giro	12.05
Numero di giri	4
Elica	Destrogira

I cinque distinti RNA sono stati descritti ed indicati come RNA 1 (6.8 kb), 2 (4.7 kb), 3 (1.8 kb), 4 (1.5 kb) e 5 (1.45 kb).

Tabella 1.3. Caratteristiche degli RNA di BNYVV.

Gli RNA 1 e 2 di differenti isolati sono risultati della stessa dimensione mentre gli RNA 3 e 4 possono variare considerevolmente in lunghezza. Tutti gli RNA possiedono una coda di poli-A all'estremità 3' e possiedono un cappuccio (cap) all'estremità 5' (Putz *et al.*, 1983). Si possono ritrovare delle somiglianze di sequenza a livello dei primi 8-9 nucleotidi all'estremità 5' e negli ultimi 70 nt prima della coda poly-A.

1.2.5.1 RNA 1

L'RNA1 ha una lunghezza di 6746 nt (Bouzoubaa *et al.*, 1987), esclusa la coda poly(A) di 100 nt (Putz *et al.*, 1983) (Figura 1.6).

Contiene un singolo modulo di lettura (ORF) di 2109 codoni da AUG (154), il primo potenziale codone d'inizio, ad UAA (6481). Un secondo potenziale codone d'inizio è AUG (496) collocato più a valle. La sintesi proteica produce due lunghi polipeptidi: p237 (per l'inizio in AUG 154), p220 (per l'inizio in AUG 496) ed un numero di proteine più piccole le quali probabilmente si generano da un termine prematuro della traduzione (Jupin *et al.*, 1988).

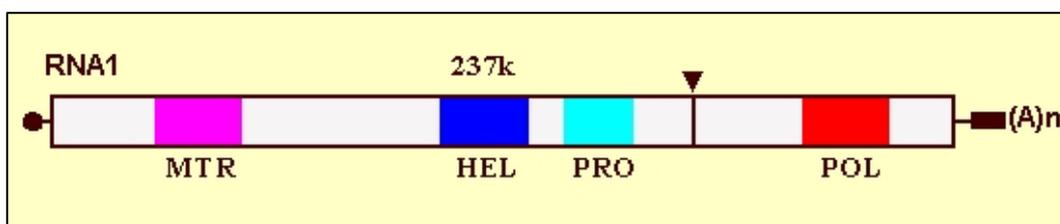


Figura 1.6: Mappa genetica dell'RNA1 del BNYVV.

p237 possiede due domini, omologhi ai domini di proteine non strutturali coinvolte nella replicazione virale. La regione C-terminale di p237 contiene la

sequenza “GDD” e motivi associati comuni a tutte le polimerasi RNA dipendenti (RNA-dependent RNA polymerases, RdRp).

L’altro dominio presenta la sequenza consenso GXXGXGKS-T e motivi associati caratteristici di proteine con attività elicastica (Gorbalenya e Koonin 1988; Hodgman, 1988; Lain *et al.*, 1990; 1991).

1.2.5.2 RNA 2

L’RNA2 ha una lunghezza stimata di 4612 nt (Bouzoubaa *et al.*, 1986),

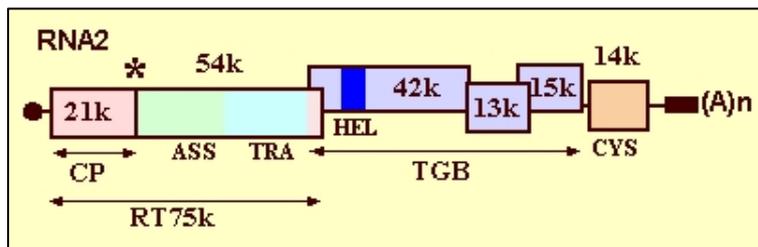


Figura 1.7: Mappa genetica dell’RNA2 del BNYVV.

esclusa la coda poli (A) (Figura 1.7). Il cistrone per la CP è localizzato vicino all’estremità 5’ e termina con un singolo codone UAG (709) che,

circa una volta su dieci, subisce soppressione per produrre una proteina, con un peso molecolare di 75 kDa (p75) (Ziegler *et al.*, 1985, Niesbach-Klosgen *et al.*, 1990). Tale polipeptide contiene la proteina di rivestimento p21 al suo N-terminale. La stessa p75 sarebbe coinvolta nell’assemblaggio virale poiché particolari delezioni nel suo dominio non interferiscono con l’infezione o con la sintesi della proteina di rivestimento ma inibiscono la formazione del virione, portando ad un aumento dell’aggregazione delle particelle virali (Richards e Tamada, 1992), oppure rendono *P. betae* incapace di trasmettere gli isolati virali (Tamada e Kusume, 1991).

Quattro ORF addizionali, nella porzione 3’ terminale, occupano l’RNA2: tre (ORF 3-4-5) codificano le proteine TGB (“triple gene block”: p42, p13, p15) il quarto è necessario per la sintesi della p14 (ORF 6). BNYVV può muoversi da una cellula a quella vicina senza CP, attraverso i plasmodesmi, ma le proteine TGB sembrerebbero essenziali per questo processo (Gilmer *et al.*, 1992a; Erhardt *et al.*, 2000).

p13 contiene un motivo centrale altamente conservato fiancheggiato da un dominio idrofobico potenzialmente in grado di attraversare la membrana ed è associata a frazioni subcellulari di membrana nelle piante infette (Niesbach-Klosgen *et al.*, 1990; Donald *et al.*, 1993).

p42 ha, in vitro, la capacità di legare gli acidi nucleici (Bleykasten *et al.*, 1996) ed è associata a frazioni subcellulari di membrana (Niesbach-Klosgen *et al.*, 1990). Tuttavia l'analisi al computer di P42 non evidenzia alcuna affinità per il plasmalemma. Studi successivi hanno permesso di ipotizzare che le proteine p13 e p15 agiscano contemporaneamente o sequenzialmente per ancorare p42 ai plasmodesmi (Niesbach-Klosgen *et al.*, 1990; Erhardt *et al.*, 2000).

La proteina p15 è risultata idrofobica (Lauber *et al.*, 1998) mentre p14 è principalmente localizzata nel citosol, come proteina solubile. La presenza di residui di cisteina (posizione 68-71), insieme ai vicini residui di istidina (posizione 84-87), evidenzia una similitudine con proteine aventi un dominio "zinc-finger" (Niesbach-Klosgen *et al.*, 1990).

1.2.5.3 RNA 3

L'RNA3 (1774 nt facendo riferimento alle molecole più lunghe sequenziate nel 1985 da Bouzoubaa *et al.*) contiene l'ORF di una proteina di 25 kDa (p25)

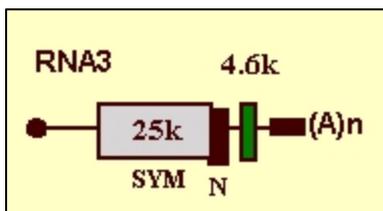


Figura 1.8: Mappa genetica dell'RNA3 del BNYVV.

(Figura 1.8). L'espressione della p25 è associata a lesioni locali gialle su foglie inoculate di ospiti come *Chenopodium quinoa* e *Tetragonia expansa* (Tamada *et al.*, 1989; Jupin *et al.*, 1992) e allo sviluppo dei sintomi della rizomania nelle radici di bietola (Tamada *et al.*, 1990; Koenig *et al.*, 1991).

La proteina è stata trovata nel citoplasma e nel nucleo di foglie infette di *Chenopodium murale* e *C. quinoa*. Il peptide contiene vicino al suo N-terminale (residui 57-62) una sequenza ricca di arginine (KRIRFR; i residui basici sono sottolineati) che potrebbe costituire il segnale di localizzazione nucleare. Il significato biologico della localizzazione nucleare della p25 è al momento sconosciuto, comunque questa proteina contiene una regione ricca di cisteine (regione 73-90) che potrebbe formare un motivo "zinc-finger" in grado di interagire con il genoma dell'ospite (Jupin *et al.*, 1992). Quest'interazione potrebbe essere responsabile dei sintomi indotti dalla presenza dell'RNA3 (Haeberlé e Stussi-Garaud, 1995).

Sperimentalmente, dopo la delezione di una porzione a monte dell'ORF di p25, si esprime un piccolo ORF chiamato N (nt 1052-1231) che si sovrappone

alla porzione 3' terminale dell'ORF di p25, che codifica per una proteina di 6,5 kDa in grado di provocare la comparsa di lesioni locali su *C. quinoa* e *T. expansa* (Jupin *et al.*, 1992).

L'RNA3 contiene degli altri piccoli ORF che non sono trascritti durante l'infezione (ORF A, ORF S). Un RNA subgenomico, il cui 5' mappa al nt 1230, appare dopo ogni infezione, quando l'RNA3 è presente nell'inoculo e non è incapsidato (Bouzoubaa *et al.*, 1991). L'ORF più vicino al 5' sull'RNA3 subgenomico è S (nt 1274-1393) corrispondente ad una proteina di 4,6 kDa (Lauber *et al.*, 1998).

Le osservazioni indicano inoltre che l'RNA3 possiede delle sequenze importanti per i movimenti vascolari che si trovano approssimativamente fra i nt 1033-1257 ("core region") (Lauber *et al.*, 1998). Tali movimenti avvengono ancora, ma con minor efficienza, quando le regioni fiancheggianti tale zona vengono rimosse indicando che contribuiscono al movimento vascolare anche se in modo sussidiario. È stato verificato che una delezione tra i nt 1033-1257 blocchi il movimento vascolare del virus. Al momento si può soltanto ipotizzare il meccanismo che interviene, in uno specifico ospite, nel movimento vascolare, una possibilità è che la regione fra i nt 1033-1257 interagisca con fattori virali o cellulari che governano i plasmodesmi favorendo l'entrata, l'uscita o i movimenti nei compartimenti vascolari. Alternativamente, l'RNA3 potrebbe promuovere movimenti sistemici indirettamente attraverso l'attivazione dell'espressione di proteine virali (Lauber *et al.*, 1998).

1.2.5.4 RNA 4

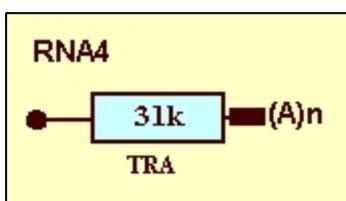


Figura 1.9: Mappa genetica dell'RNA4 del BNYVV.

L'RNA4 (1467 nt riferendosi alle molecole più lunghe sequenziate nel 1985 da Bouzoubaa *et al.*) contiene un ORF che si estende dall'AUG (344) ad UAG (1192) e può codificare un polipeptide di 31 kDa (p31) (Figura 1.9). P31 è stata osservata esclusivamente nel citosol (Niesbach-Klosgen *et al.*, 1990). La presenza dell'RNA4 sembra aumentare l'efficienza di trasmissione del virus da parte del vettore ed in particolare è stato osservato che varie combinazioni dei diversi RNA influenzano tale efficienza nel modo seguente:

(RNA 3+4+5) = (RNA 3+4) > (RNA 4+5) > (RNA4) > (RNA 3+5) = (RNA3) > (RNA 5) > (piccoli RNA assenti) (Tamada *et al.*, 1989, 1990). Oltre ad essere necessaria per una efficiente trasmissione da parte del vettore, p31 è risultata anche coinvolta nell'espressione dei sintomi ospite-specifica e nella capacità di BNYVV di sopprimere il silenziamento genico in particolar modo a livello radicale (Rahim *et al.*, 2007).

1.2.5.5 RNA 5

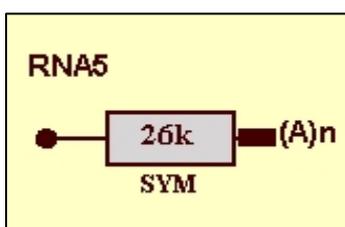


Figura 1.10: Mappa genetica dell'RNA5 del BNYVV.

L'RNA5 ha una lunghezza di 1342-1347 nucleotidi con un singolo ORF codificante una proteina di 26 kDa simile al peptide di 25 kDa codificato dall'RNA 3 (Kiguchi *et al.*, 1996; Koenig *et al.*, 1997) (Figura 1.10). La presenza dell'RNA 5 sembra conferire una maggiore virulenza all'isolato.

Test di inoculazione, infatti, mostrano che gli isolati contenenti tale RNA generalmente causano sintomi più gravi (Tamada *et al.*, 1996).

In relazione alle funzioni svolte dai diversi RNA possiamo perciò dire che: gli RNA 1 e 2 di BNYVV hanno geni coinvolti nella replicazione, nel movimento da una cellula all'altra, nell'incapsidazione dell'RNA virale e sono necessari alla moltiplicazione del virus sulle foglie delle piante ospiti; gli RNA più piccoli (3, 4 e 5) sono richiesti unicamente per il processo di infezione naturale: l'RNA3 è implicato nella proliferazione delle radici di *Beta vulgaris* e

RNA	Prodotto genico	Funzione
1	p237	replicasi
2	p21	proteina del capsido
2	p75	assemblaggio, trasmissione
2	p42	movimento cellula-cellula
2	p13	movimento cellula-cellula
2	p15	movimento cellula-cellula
2	p14	?
3	p25	sintomi sulla foglia, proliferazione nella radice
4	p31	trasmissione con <i>Polymixa</i>
5	p26	?

Tabella 1.4: Riepilogo sulle funzioni delle proteine del BNYVV.

nell'espressione dei sintomi (Rizomania); l'RNA4 è importante per la trasmissione del virus mediata da *P. betae*; l'RNA5 non è presente in tutte le fonti virali ma interagisce sinergicamente con l'RNA3, quando entrambi sono presenti (Figura 1.11) (Tabella 1.4). La moltiplicazione del virus mediante inoculo fogliare può determinare delle delezioni interne a questi piccoli RNA (Richards e Tamada, 1992).

1.2.5.6 Omologie e relazioni

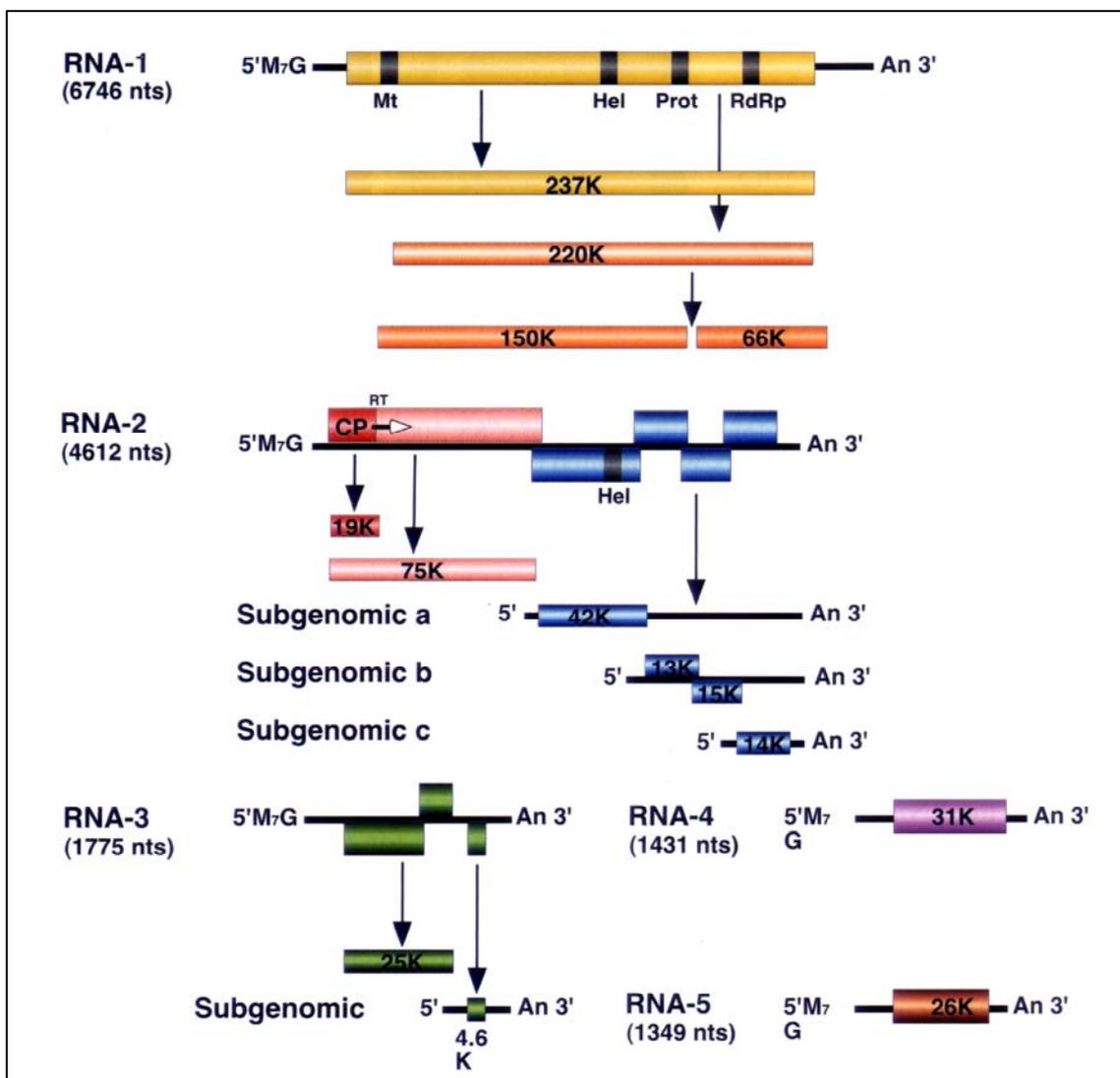


Figura 1.11. Mappa genetica degli RNA di BNYVV.

L'omologia tra i quattro RNA è limitata alle loro estremità. Al terminale 5' (m^7 GpppAAAUUCNAA) le molecole cominciano con adenina (A), A_3 nel caso dell'RNA 1, 2, 4 e A_4 per l'RNA3. I residui di guanina sono significativamente

poco rappresentati nei primi 30 o 50 residui dei quattro RNA. Queste sequenze potrebbero formare parte del promotore per la sintesi della seconda elica di RNA.

Il dominio essenziale in cis dell'RNA3 consiste di almeno tre subdomini separati da spaziatori non essenziali. Il subdominio più distante dall'estremità 5' è situato a 283-293 nt (Box I) ed è perfettamente complementare ai primi dieci nt immediatamente successivi la struttura cap (Box I'). Il secondo subdominio (Box II) contiene un elemento che è complementare ad una sequenza a monte (Box II'). Delezioni all'interno del dominio "ENCAP" interferiscono con l'assemblaggio dell'RNA3. Non sono state osservate omologie di sequenza fra il

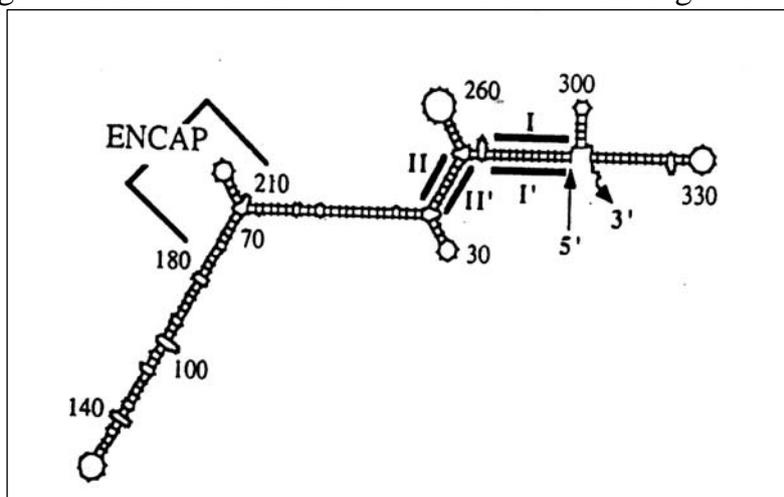


Figura 1.12: Possibile struttura secondaria dell'estremità 5' terminale dell'RNA 3 di BNYVV. Delezioni all'interno della regione "ENCAP" interferiscono nei virioni con l'assemblaggio dell'RNA 3. La posizione delle sequenze Box I e I' , II e II' sono indicate da linee.

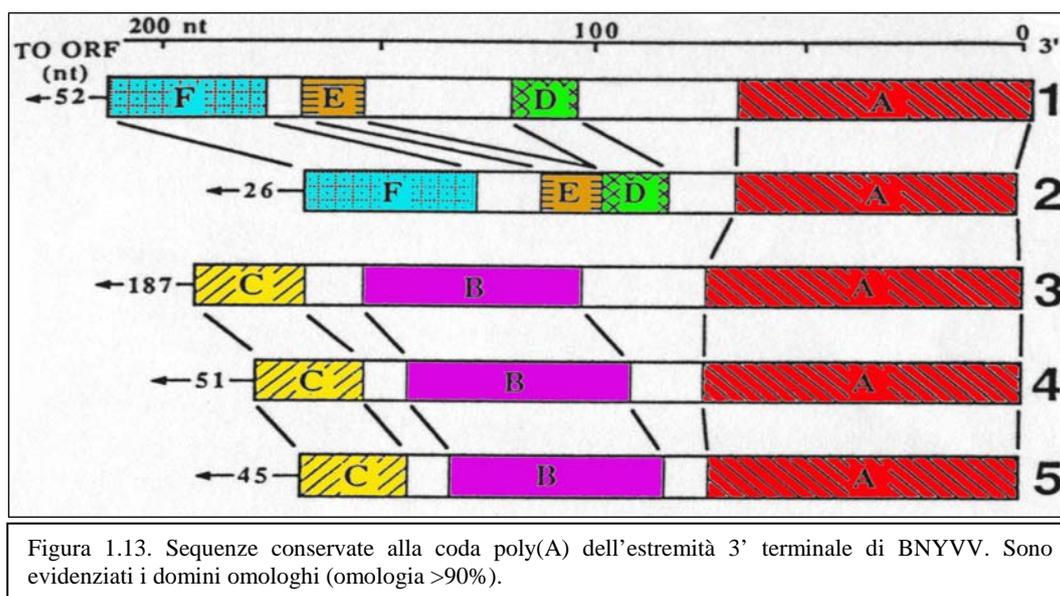
5' terminale di questo RNA e la corrispondente regione d'altri RNA (Figura 1.12).

Per esempio, il dominio essenziale in cis al 5' dell'RNA4 non contiene elementi di sequenza paragonabili al Box I dell'RNA3, capaci di appaiamento con il terminale al 5'. Tuttavia, sia l'RNA3 che l'RNA4 sono specificamente riconosciuti dalla polimerasi virale (Richards e Tamada, 1992).

Si nota che sequenze essenziali per l'assemblaggio dell'RNA3, nelle particelle virali, sono situate proprio vicino al nt 200. In particolare sui primi 312 residui posti al 5' UTR dell'RNA3 di BNYVV si identificano, nei domini I e II, tre corte sequenze chiamate Box I, II e III che sono rispettivamente complementari ad altre sequenze sul 5' UTR, Box I', II' e III' (Gilmer et al., 1992; Gilmer et al., 1993).

All'estremità 3' esiste un'estesa omologia di sequenza fra gli ultimi 200 residui dell'RNA 3 e 4 (Bouzoubaa *et al.*, 1985) e gli ultimi circa 70 residui dell'RNA2 (Bouzoubaa *et al.*, 1986).

Paragoni fra le sequenze degli RNA hanno evidenziato regioni di forte omologia (Figura 1.13). La regione indicata come A dell'RNA2 è omologa ad un dominio dell'RNA 3 e 4 che è presente anche nell'RNA1. A precedere questa regione, sull'RNA 1 e 2, ci sono due domini E-D e una più lunga regione di omologia F. Le regioni A, D, E ed F cadono nello stesso ordine nell'RNA 1 e 2 ma la spaziatura tra loro varia considerevolmente. C'è anche omologia tra i domini E dell'RNA 1-2 e la porzione del dominio B dell'RNA 3 e 4 così come tra le porzioni dei domini F e C. Questi allineamenti sono di limitata estensione interessando 13 residui per la coppia E/B e dodici residui per la coppia F/C. I domini A, B e C, simili a quelli degli RNA 3 e 4, sono presenti anche nell'RNA5. Il dominio A di tutti i cinque RNA può assumere una struttura secondaria a forcina nella quale i residui sono accomodati in regioni a singolo



filamento o a basi appaiate (Figura 1.14). E' verosimile che questa struttura conservata contenga il segnale, riconosciuto dalla polimerasi virale, per iniziare la sintesi del filamento di RNA negativo (Richards e Tamada, 1992).

1.2.5 Caratterizzazione molecolare del BNYVV

La caratterizzazione molecolare del virus è stata effettuata mediante l'analisi del polimorfismo dei frammenti di restrizione (Restriction fragment

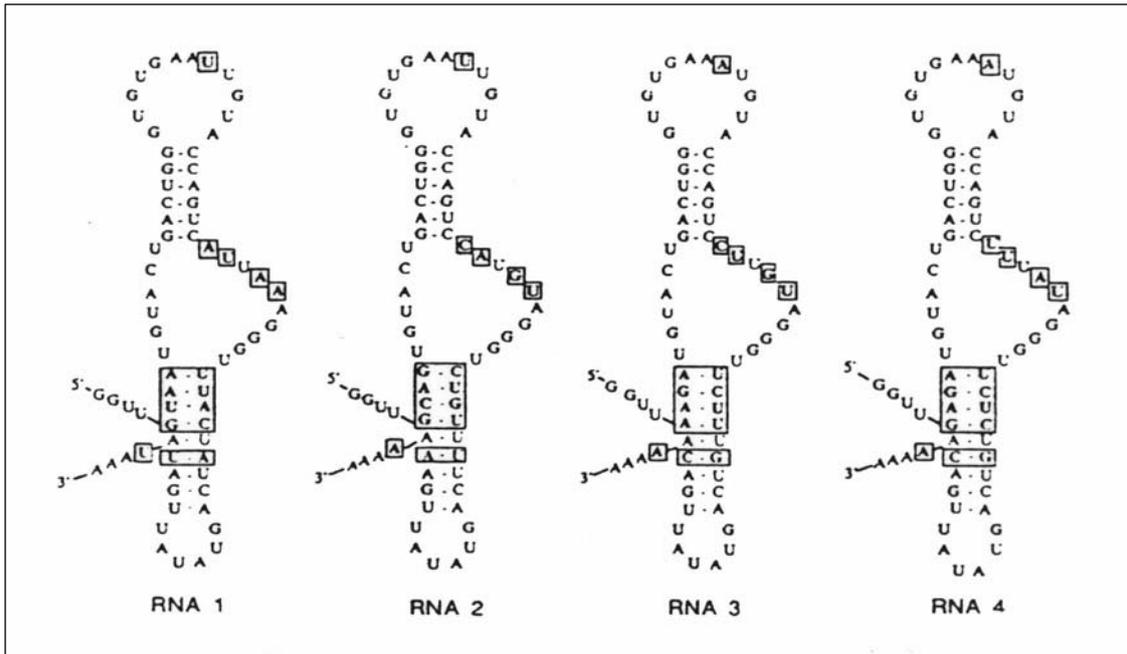


Figura 1.14. Possibile struttura secondaria per il dominio A all'estremità 3' terminale degli RNA 1-4 di BNYVV. I rettangoli indicano posizioni dove vi sono variazioni nella sequenza fra gli RNA.

length polymorphism analysis, RFLP) eseguita sui prodotti della reazione a catena della polimerasi (Polymerase chain reaction, PCR). Kruse *et al.* nel 1994 hanno condotto tale indagine, in regioni del genoma virale importanti nella patogenicità, su diversi isolati virali Europei ed extra Europei classificandoli in due gruppi o tipi denominati A e B.

In Europa il tipo B è stato identificato in alcune aree della Germania, dell'Inghilterra, della Svezia e della Francia mentre il tipo A è risultato presente in Italia, Grecia, Jugoslavia, Slovacchia, Austria, Francia, Belgio, Olanda, Inghilterra. Nei territori di confine sono state riscontrate infezioni miste (Kruse *et al.*, 1994).

I dati disponibili (Bouzoubaa *et al.*, 1985, 1986; Meulewater *et al.*, 1989, Yao *et al.*, 1993; Kruse *et al.*, 1994) suggeriscono che le differenze nucleotidiche, fra il tipo A e il B, sono minime in varie parti del genoma. Le analisi condotte sui quattro RNA dimostrano, infatti, che la loro sequenza nucleotidica risulta identica al 97% (Saito *et al.*, 1996). Nelle sequenze pubblicate approssimativamente 22 nt (corrispondenti al 3,1%) sono differenti nella regione del gene che codifica CP, 71 nt (corrispondenti al 3,7%) sono diversi in TGB e 41 nt (corrispondenti al 2,9%) nell'RNA3; nell'RNA4 la percentuale è qualche volta più bassa, 17 nt (corrispondenti al 1,5%). La

maggioranza delle differenze nucleotidiche non porta a sostituzioni aminoacidiche (aa).

Il grado della variazione è basso all'interno di ciascun gruppo, almeno in Europa. Nell'RNA2 (zona TGB), infatti, solo due nt differenziano un isolato francese (F13) da uno tedesco (Rg1) entrambi appartenenti al tipo B. Sequenze identiche sono state trovate nella regione del gene che codifica la CP degli isolati di tipo A provenienti dal Belgio, Cecoslovacchia, ex Jugoslavia. Un isolato, proveniente dall'interno della Mongolia, è invece meno relazionato, l'estremità 5' (nt 95-711) mostra 12 nt di differenza dal tipo A europeo. Le differenze nucleotidiche che compaiono nei virus appartenenti allo stesso gruppo spesso determinano cambiamenti nella sequenza aa. Le differenze aa nella proteina di rivestimento contengono quattro variazioni fra gli isolati europei tipo A e il francese F13 (tipo B), cinque rispetto all'isolato mongolo e tre fra il francese F13 e l'isolato mongolo. Nove dei differenti aa mutati nelle proteine di rivestimento dei tre isolati considerati si trovano in regioni non accessibili agli anticorpi la qual cosa spiega perché non siano state evidenziate differenze sierologiche fra gli isolati di BNYVV (Kruse *et al.*, 1994).

Percentuali di divergenza nucleotidica del 2,2% sono state riportate tra RNA4 di isolati tipo A, provenienti da Germania e Italia, ed isolati di tipo B, provenienti da Germania e Francia, mentre identità di sequenza del 99% sono state rilevate tra gli isolati appartenenti allo stesso gruppo (Koenig *et al.*, 2000).

Per Koenig *et al.*, nel 1995, è stato possibile evidenziare tali variazioni nucleotidiche, tra isolati appartenenti al medesimo tipo, impiegando l'analisi del polimorfismo di conformazione dei prodotti denaturati di RT-PCR (Single strand conformation polymorphism, SSCP), tecnica rivelatasi molto utile per rilevare anche singole differenze genomiche (Orita *et al.*, 1989).

Oltre a mostrare mutazioni in uno o più RNA in isolati dello stesso tipo ed a mettere in luce infezioni miste (A+B) di uno o di tutti gli RNA, è stato possibile identificare isolati che, pur risultando tipo A o B mediante l'RFLP, presentano differenze nucleotidiche tali da richiedere l'instaurare di un nuovo tipo. E' il caso di isolati virali che possiedono un quinto RNA, essi sono stati inizialmente identificati in Giappone, poi in Francia, Cina, Kazakistan e Regno unito. Gli isolati europei con il quinto RNA sono definiti tipo P, mentre quelli asiatici sono

definiti tipo J. Il tipo P presenta una corta delezione nella regione 5' UTR e una regione codificante più lunga di 4 codoni, in più 8 residui variabili permettono di discriminare le proteine p26 di tipo P e J (Gilmer *et al.*, 2007).

Analisi delle sequenze nucleotidiche di isolati di tipo A, B e P hanno evidenziato differenze del 4% e 7% del tipo P rispetto alle medesime porzioni dell'RNA 2 di isolati di tipo A e B rispettivamente (Koenig *et al.*, 2000).

Secondo quanto riportato in bibliografia, utilizzando la sequenza completa della regione codificante la CP di BNYVV, è stato rilevato che il tipo P risulta molto più simile al tipo A piuttosto che al tipo B (Rush, 2003).

Tali dati sembrano trovare conferma nell'elevata identità di sequenza rilevata tra gli RNA di alcuni isolati di tipo A e gli isolati di tipo P. Tali isolati, di tipo A, mancando del quinto RNA sono stati denominati P-simili o tipo PΔ5 e suggeriscono una possibile via evolutiva che da isolati con cinque RNA ha portato, per perdita di un RNA, ad isolati con quattro RNA (Lemaire *et al.*, 2003).

1.3 Virus del mosaico comune della bietola trasmesso da terreno

1.3.1 Aspetti fitopatologici ed epidemiologici

Il virus del mosaico comune della bietola trasmesso dal terreno (*Beet soil-borne mosaic virus*, BSBMV) appartiene al genere *Benyvirus* (Koenig e Lesemann, 2005) ed in natura, come il BNYVV, è trasmesso in maniera persistente da *P. betae*.

Il BSBMV, sierologicamente distinto dal BNYVV, è stato identificato per la prima volta in Texas nel 1988, in barbabietole da zucchero che mostravano sintomi simili a quelli della rizomania (Hiedel *et al.*, 1997). Isolati del BSBMV sono stati identificati nelle regioni centrali e settentrionali degli Stati Uniti (California, Colorado, Idaho, Nebraska, Wyoming e Minnesota) ma non è stato identificato nel resto del mondo (Rush e Heidel, 1995).

La sintomatologia del virus è molto variabile (Rush e Heidel, 1995). I sintomi fogliari sono identificati facilmente in campo durante Settembre e Ottobre, e sono più frequenti di quelli provocati da BNYVV, anche se più leggeri. Questi sintomi consistono in una leggera distorsione fogliare, striature e macchie di colore giallo lungo le nervature fogliari che, con il tempo, possono

diventare clorotiche (Heidel *et al.*, 1997). A volte si presentano infezioni sistemiche nelle foglie con mosaico o sintomi simili al BNYVV. Non si è ancora in grado di evidenziare se la differenza dei sintomi provocati dal BSBMV in barbabietola da zucchero è causata da interazione con l'ambiente oppure dalla diversità genetica degli isolati virali (Rush e Heidel, 1995). È impossibile identificare visivamente un campo infetto da BSBMV in assenza di sintomi fogliari. Di solito le radici infette non hanno sintomi, anche se in qualche caso si è osservata una sintomatologia tipica della rizomania, senza che venisse identificato il BNYVV (Rush e Heidel, 1995). Le diverse piante di barbabietola riscontrate infette da entrambi i virus sembrano tuttavia suggerire che siano molti i campi con infezioni miste da BNYVV e BSBMV.

1.3.2 Organizzazione molecolare del genoma del BSBMV

Gli isolati di BSBMV contengono quattro specie di RNA a singola catena di senso positivo. I quattro distinti RNA sono stati descritti ed indicati come RNA 1 (6683 nt), RNA 2 (4615 nt), RNA 3 (1720 nt) e RNA 4 (1203 nt). Gli RNA 1 e 2 di differenti isolati sono risultati della stessa dimensione mentre gli RNA 3 e 4 possono variare considerevolmente in lunghezza. Tutti gli RNA possiedono una coda di poly(A) all'estremità 3' e un cappuccio (cap) all'estremità 5'. Inoltre, in tutti gli RNA, sono presenti delle regioni non codificanti (UTR) alle estremità 3' e 5' (Lee *et al.*, 2001).

1.3.2.1 RNA 1

L'RNA1 ha una sequenza completa di 6683 nt esclusa la coda di poly(A). È presente un grande modulo di lettura (ORF) che inizia sul nucleotide 149 e si interrompe sul codone di stop in corrispondenza del nucleotide 6502. Viene formata una singola poliproteina di 239 kDa che contiene tre domini caratteristici (Figura 1.15):

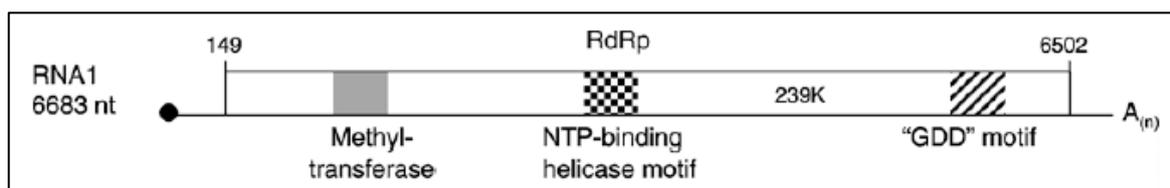


Figura 1.15: Mappa genetica dell'RNA1 di BSBMV

a) Dominio NTP-binding helicase tra gli amminoacidi 944 e 951 (Gly-X-X-Gly-X-Gly-Lys-Ser, dove X rappresenta qualsiasi amminoacido) che si suppone sia coinvolto nello svolgimento della doppia elica durante la replicazione e la traduzione dell'RNA virale (Gorbalenya e Koonin, 1989).

b) Dominio RdRp (Gly-Asp-Asp, il dominio GDD), localizzato al C-terminale dell'ORF tra gli amminoacidi 1939-1941.

c) Dominio metiltrasferasi, localizzato tra gli amminoacidi 220-230, 273-280 e 407-420, che presenta una bassa conservazione di sequenza con il BNYVV.

1.3.2.2 RNA 2

L'RNA2 del BSBMV ha una lunghezza di 4615 nt esclusa la coda di poly(A). Sono stati identificati 6 ipotetiche ORF, come per l'RNA2 del BNYVV (Figura 1.16). Al 5' terminale è presente la proteina del capsid virale (CP) di 21 kDa seguita da un codone di stop ambra UAG che consente la formazione della proteina readthrough (RT) da 74 kDa. Il motivo Tyr (Y), Arg-Phe (RT) e Phe-Glu (FE) tipico delle CPs codificate dai virus bastoncelliformi sono presenti rispettivamente nella regione amminica, centrale e carbossilica della CP codificata dal BSBMV. Nella regione RT è presente un dominio KTER tra i nucleotidi 1803-1814 che è fondamentale per un'efficiente trasmissione con *P. betae*.

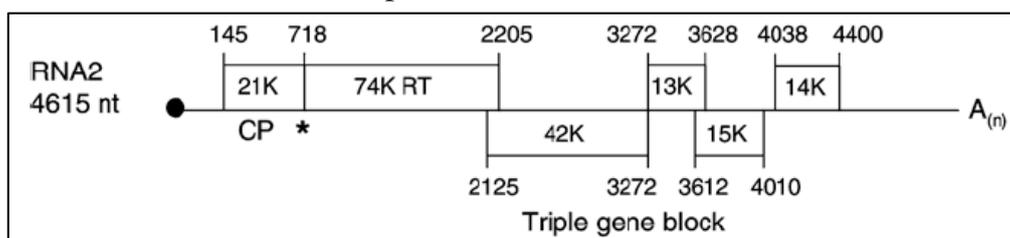


Figura 1.16: Mappa genetica dell'RNA2 di BSBMV.

Nella regione prossima al 3' della porzione codificante dell'RNA2 sono presenti i motivi tipici delle proteine triple gene block (TGB), rispettivamente di 42 kDa, 13 kDa e 15 kDa, necessari per il movimento del virus (Lee *et al.*, 2001).

Infine è stata identificata una proteina regolatrice di 14 kDa che presenta un dominio ricco di cisteina, implicata nella accumulazione in *cis* dell'RNA2 del BNYVV e nell'accumulazione in *trans* del CP del BSBMV.

Il TGB e la proteina regolatrice ricca di cisteine hanno una percentuale di nucleotidi in comune con il BNYVV rispettivamente del 74%, 81%, 65% e 32% (Lee *et al.*, 2001).

1.3.2.3 RNA 3

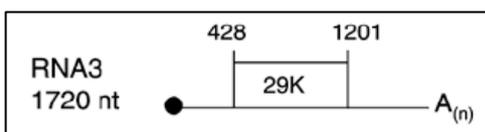


Figura 1.17: Mappa genetica dell'RNA3 di BSBMV.

La sequenza dell'RNA3 del BSBMV è lunga 1720 nt esclusa la coda di poly(A). È presente un unico modulo di lettura (ORF) dal nucleotide 428 al nucleotide 1201 che codifica per una proteina di 29 kDa (Figura 1.17). Questa proteina ha il 23% degli amminoacidi in comune con ORF da 25 kDa presente sull'RNA3 del BNYVV (Lee *et al.*, 2001).

1.3.2.4 RNA 4

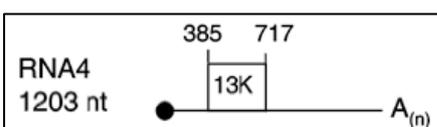


Figura 1.18: Mappa genetica dell'RNA4 di BSBMV

L'RNA4 ha una sequenza completa di 1203 nucleotidi esclusa la coda di poly(A). È presente un unico modulo di lettura (ORF) che codifica per una proteina di 13 kDa (Figura 1.18). L'RNA4 ha solo il 35% dei nucleotidi in comune con l'RNA4 del BNYVV ma la proteina da 13 kDa prodotta per il 42% degli amminoacidi ha una sequenza uguale alla metà ammino-terminale dell'ORF da 31 kDa presente sull'RNA4 del BNYVV (Lee *et al.*, 2001).

È possibile che le differenze fra i sintomi dei virus BNYVV e BSBMV siano il risultato della bassa somiglianza fra i geni degli RNA 3 e 4, imprescindibili per l'infezione tramite *P.betae* e strettamente relazionati con i sintomi fogliari e con la proliferazione delle radici (Lee *et al.*, 2001).

1.4 Confronto BNYVV e BSBMV

Studi di interazione fra BNYVV e BSBMV, eseguiti con inoculi meccanici su barbabietola da zucchero, hanno dimostrato l'alto grado di protezione reciproca, che si presenta solitamente fra le varietà virali strettamente imparentate (Mahmood *et al.*, 1999). Tuttavia è stato dimostrato che le fonti di resistenza al BNYVV, quale l'allele di Rz, non forniscono resistenza a BSBMV

il che suggerisce, probabilmente, un diverso meccanismo di riconoscimento del virus da parte della piante di barbabietola (Lee *et al.*, 2001; Wisler *et al.*, 2003).

	BSBMV	BNYVV	Omologia sequenza
RNA 1	6683	6746	76,8%
RNA 2	4615	4609	67%
RNA 3	1720	1774	60%
RNA 4	1203	1465	35%
RNA 5	----	1342	0%

Tabella 1.5. Omologia di sequenza tra gli RNA di BSBMV e BNYVV.

Gli RNA1 e 2 del BSBMV e BNYVV hanno un'omologia di sequenza pari, rispettivamente, al 92% e 81% sulla regione non codificante posta al 5' terminale (5' UTR) e 66% e 67% sulla regione 3' UTR. Le omologie di sequenza più basse sono ripartite rispettivamente fra le regioni 5' UTR del BSBMV e BNYVV RNA3 e RNA4 (38% e 50% rispettivamente) al contrario le regioni 3' UTR delle sequenze di tali RNA mostrano un'omologia pari al 79% e 64% (Lee *et al.*, 2001) (Tabella 1.5). Come si può vedere dalla tabella 1.6 anche le sequenze amminoacidiche dei diversi ORF sono molto conservate tra il BSBMV e il BNYVV. Sull'RNA1, l'80% e il 92% delle sequenze amminoacidiche della RdRp e del dominio metiltrasferasi è conservata tra BSBMV e BNYVV. Gli

	ORF	Omologia
RNA 1	MeT/H	80%
	RdRp	92%
RNA 2	CP 21k	56%
	RT 75k	56%
	TGB 1 42k	74%
	TGB 2 13k	81%
	TGB 3 15k	65%
	Cys-R 14k	32%
RNA 3		23%
RNA 4		42%

Tabella 1.6. Percentuale di omologia tra gli amminoacidi delle proteine codificate dagli RNA di BSBMV e BNYVV.

ORF dell'RNA2 di BSBMV hanno in comune il 56% delle sequenze amminoacidiche con gli analoghi ORF dell'RNA2 del BNYVV (Tabella 1.6).

1.4.1 Studio della “cross-protection” fra BSBMV e BNYVV

La protezione incrociata (“cross-protection”) è il termine generalmente utilizzato quando l'infezione di un virus protegge da una seconda infezione di un altro virus o ne riduce lo sviluppo dei sintomi. Anche se questo termine è riservato all'interazione fra due ceppi della stessa specie virale, lo stesso tipo di protezione o interferenza può essere osservata tra virus differenti, anche se con meccanismi possono essere totalmente diversi (Rush, 2003).

La “cross-protection” consiste in una duplice infezione o meglio in una pre-infezione da parte di un virus che interferisce con la superinfezione di un secondo virus correlato. Questa metodologia è utilizzata, in alcuni casi, nei metodi di controllo biologico per proteggere la pianta dalle infezioni virali ma è anche impiegata come strumento di studio delle relazioni che intercorrono fra diversi virus e tra i virus e la pianta ospite. Questa tecnica è infatti utilizzata in larga scala per il controllo del virus del mosaico del tabacco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) su pomodoro, della Papaya ringspot disease in papaya e del virus della tristezza degli agrumi (*Citrus tristeza virus*, CTV) in alcune specie del genere *Citrus*. Il punto chiave dell'applicazione di questa tecnica consiste nell'impiego di un ceppo attenuato di un virus strettamente correlato a quello da controllare che non causi danno e determini un alto grado di protezione (Mahmood e Rush, 1999).

Diversi studi sono stati fatti sulla protezione incrociata dei virus trasmessi attraverso il terreno alla barbabietola da zucchero. Prillwitz e Schlosser (1993) hanno dimostrato che la preinfezione da parte di BSBV, che presenta una temperatura ottimale di crescita più bassa rispetto a BNYVV, riduce il titolo virale, l'incidenza e la severità dei sintomi sviluppati in bietola a seguito dell'inoculazione con BNYVV. A causa della sua elevata somiglianza a BNYVV il BSBMV è risultato il candidato ideale per studi di “cross-protection”. Mahmood e Rush (1999) hanno riportato studi sull'efficacia, in condizioni di serra, del BSBMV come agente di protezione incrociata nei confronti di BNYVV. Da questa ricerca, effettuando gli inoculi secondo il metodo descritto

da Koenig e Stein (1990), risulta che la protezione incrociata data da BSBMV su BNYVV è già evidente anche dopo un breve intervallo fra i due inoculi, nonostante molte piante presentano elevate concentrazioni di BNYVV, se invece l'intervallo fra i due inoculi cresce aumenta anche l'incidenza della "cross-protection", che può essere ritenuta completa con un intervallo di 5/10 giorni, periodo in cui si ha la massima concentrazione di BSBMV nelle piante. Per quel che riguarda la protezione data da BNYVV nei confronti di BSBMV questa è più evidente nelle piante inoculate con BSBMV dopo 15 giorni dall'inoculo con BNYVV, ma l'effetto persiste per 30 giorni. La funzionalità della "cross-protection" in questi studi sembra perciò dipendere dall'intervallo in cui questi esperimenti vengono svolti suggerendo la necessità di un tempo minimo, di almeno di 5 giorni fra i due inoculi necessario perchè questa reazione di protezione abbia luogo (Mahmood e Rush, 1999).

Generalmente la "cross-protection" è studiata mediante inoculi meccanici e, solo occasionalmente, è stato inoculato il virus da cui proteggere la pianta con il vettore naturale. In particolare l'inoculo meccanico di BNYVV e BSBMV per sfregamento fogliare ha fornito risultati insoddisfacenti, come l'inoculo mediante il vettore *P. betae*, risultato difficile da impiegare in questi tipi di indagini (Mahmood e Rush, 1999).

Studi successivi hanno evidenziato, nelle piante protette, la presenza degli RNA di BNYVV mediante RT-PCR, ma adeguati saggi sierologici non hanno permesso di rilevare i corrispondenti prodotti proteici. Questo suggerisce che BNYVV non è in grado di replicarsi efficientemente nelle piante protette e che il meccanismo di protezione interferisce con la sintesi della proteina capsidica di BNYVV (Rush, 2003).

Ulteriori studi hanno dimostrato inoltre che, su terreno infetto da BSBMV, in assenza di BNYVV, il virus può infettare un alto numero di piante suscettibili o resistenti a BNYVV. In assenza di BSBMV, il BNYVV raggiunge alte concentrazioni nelle piante suscettibili e basse concentrazioni in quelle resistenti. Quando i due suoli sono mescolati BSBMV non raggiunge mai titoli alti nelle piante suscettibili e resistenti suggerendo che BNYVV può sopprimere BSBMV in infezione mista (Rush, 2003; Wisler *et al.* 2003).

Questi risultati sono in contrasto con quelli ottenuti in precedenza, ma questa discordanza è spiegabile considerando le differenti condizioni in cui sono stati ottenuti, gli studi di Mahmood e Rush (1999) sono state infatti eseguiti su giovani piante infettate meccanicamente con inoculo liquido ottenendo facilmente una infezione di tipo sistemico. Gli studi di Wisler *et al.* (2003) prevedevano invece inoculi realizzati per mezzo di *P. betae*, condizioni in cui raramente il virus si muove in maniera sistemica. Nel primo caso inoltre il primo virus inoculato, una volta insediato, è in grado di interferire sullo sviluppo del secondo inoculato, il livello di protezione aumenta perciò con l'aumentare dell'intervallo di tempo fra i due inoculi; nel secondo caso, con infezione naturale, entrambi i virus possono infettare la pianta ma, nella maggior parte dei casi, nessuno riesce ad infettarla in modo sistemico. Il virus in concentrazione maggiore colonizzerà perciò più velocemente la radice e con maggiore incidenza, in altre parole il primo virus che infetta l'apparato radicale ha maggiori probabilità di predominare in funzione delle condizioni ambientali e dalla densità di inoculo delle due popolazioni virulifere di *P. betae*. BSBMV e BSBV presentano infatti soglie minime di temperatura più basse di BNYVV che mostra infettività ridotta sotto i 20 °C. Ne consegue una maggiore infezione da parte di *P. betae* infetta da BSBMV o BSBV se la temperatura è sotto i 20°C e da BNYVV se la temperatura è maggiore ai 25 °C. In conclusione risulta perciò molto importante il momento in cui si inoculano le piante con *P. betae*, la densità di inoculo e la temperatura del suolo (Rush, 2003).

1.5 Scopo della ricerca

Lo scopo principale della nostra ricerca è stato quello di allestire e studiare un sistema modello, per i virus trasmessi in maniera persistente attraverso il terreno dal genere *Polymyxa*, che consenta di studiare le interazioni ospite/patogeno, coinvolte nell'espressione di resistenza, che possano fungere da base per meccanismi di induzione di resistenza.

A questo scopo sono stati presi in considerazione il BSBMV e il BNYVV in quanto strettamente correlati, ma sierologicamente distinti che rappresentano un ottimo sistema per studiare il fenomeno della "cross-protection" (Mahmood and Rush, 1999). Sono stati ottenuti cloni infettivi cDNA degli RNA virali di un

isolato di BSBMV proveniente dal Colorado (USA, gentilmente fornitoci dal Prof. C. Rush) e di un isolato di BNYVV tipo P proveniente dalla località di Pithivier (Francia, gentilmente fornitici dal Prof. D. Gilmer), i quali sono stati utilizzati come strumento per approfondire lo studio dell'interazione tra la pianta e il virus.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 Materiale vegetale

Campioni di terreno infetto da BSBMV sono stati gentilmente forniti dal Prof. C. Rush (University of Texas - USA). Il terreno è stato miscelato a sabbia sterile in rapporto 1/2, terreno/sabbia, collocato in vasi sterili del diametro di 13 cm ed utilizzato come substrato per la crescita di piante di barbabietola da zucchero (*Beta vulgaris* cv. Portland). Le piantine sono state allevate in ambiente controllato a 22 ± 1 °C, 3.000 lux e 16 ore di fotoperiodo, per un periodo di 45 giorni.

Piante di *Beta macrocarpa*, *Chenopodium quinoa* e *Tetragonia expansa* dopo essere state inoculate meccanicamente con estratti vegetali (porzioni di piante infette da BSBMV macinate in un tampone costituito da Macaloide 0,04% e KH_2PO_4 0,05 M.), purificazioni di RNA virali o miscele di RNA trascritti da cloni cDNA, sono state allevate in cella climatica a 24 °C con illuminazione di 3.000 lux e fotoperiodo di 16 ore.

2.2 Tecniche molecolari

2.2.1 Estrazione degli ssRNA dai tessuti vegetali

L'estrazione degli RNA a singolo filamento è stata effettuata dalle radici di *B. vulgaris* e dalle foglie di *B. macrocarpa*, *C. quinoa* e *T. expansa* utilizzando diversi protocolli.

2.2.1.1 Estrazione con CTAB

Il metodo si basa sull'uso del detergente CTAB (bromuro di esadeciltrimetilammonio) proposto da Chang *et al.* (1993). Il CTAB in presenza di alte temperature (circa 60°C) ed elevate concentrazioni saline si lega agli acidi nucleici formando un complesso stabile e solubile in acqua.

Per ogni estrazione è stato usato un campione di circa 200 mg di foglie o radici con il seguente protocollo:

- 1) posizionare circa 200 mg di materiale vegetale all'interno di buste di polietilene (16x10 cm) e congelarle in azoto liquido per qualche minuto. Con un piccolo rullo manuale macinare il tessuto fino a produrre una "pasta omogenea".

- 2) aggiungere 1 ml (10 volte il volume iniziale) di tampone di estrazione.
- 3) raccogliere 700 μ l della miscela in un tubo Eppendorf da 1,5 ml e incubare per 15 minuti a 65 °C per denaturare proteine e lipidi.
- 4) dopo l'incubazione aggiungere alla miscela 700 μ l di cloroformio:alcool isoamilico (24:1) e miscelare con agitatore fino ad ottenere un'emulsione omogenea.
- 5) centrifugare i campioni a 13.000 g per 15 minuti a 4 °C, in centrifuga Beckman Allegra 21R usata in tutti i nostri esperimenti, per separare la fase acquosa, dove si raccolgono gli acidi nucleici, dal solvente, la fase organica, dove si raccolgono proteine e polisaccaridi sia del virus che della pianta.
- 6) prelevare la fase liquida superiore e posizionarla in un nuovo tubo Eppendorf da 1,5 ml.
- 7) aggiungere 700 μ l di cloroformio:alcool isoamilico (24:1) e miscelare.
- 8) prelevare la fase liquida superiore e posizionarla in un nuovo tubo Eppendorf da 1,5 ml.
- 9) centrifugare i campioni a 13.000 g per 15 minuti a 4 °C.
- 10) aggiungere un ugual volume di LiCl 4M. Miscelare invertendo il tubo Eppendorf 3 o 4 volte ed incubare a 4 °C per tutta la notte.
- 11) centrifugare a 13.000 g per 30 minuti a 4 °C.
- 12) eliminare la fase liquida e risospendere il sedimento (pellet) in 200 μ l di tampone TE contenente 1% SDS (sodio dodecil solfato), per rimuovere proteine e polisaccaridi residui.
- 13) aggiungere 100 μ l di NaCl 5M e 300 μ l di isopropanolo freddo, miscelare invertendo il tubo 3 o 4 volte. Si può ottimizzare questa fase collocando il campione per 60 minuti a -20 °C.
- 14) centrifugare per 15 minuti a 13.000 g a 4 °C.
- 15) eliminare la fase liquida e lavare il pellet con 500 μ l di etanolo al 70% e centrifugare a 4 °C per 15 minuti.
- 16) eliminare la fase liquida e favorire l'evaporazione dell'etanolo residuo con una pompa a vuoto per circa 10 - 15 minuti.
- 17) risospendere il sedimento in 100 μ l di acqua distillata sterile trattata con DEPC (diethylpirocarbonato; Sigma-Aldrich) e conservare i campioni a -20 °C.

Di seguito si riportano i tamponi usati per questa estrazione:

Tampone TE:

10 mM Tris-HCl, pH 8,0.

1 mM EDTA.

Tampone di estrazione:

2% CTAB (Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide).

100 mM TRIS-HCl, pH 8,0.

20 mM EDTA.

1,4 M NaCl.

1,0% Na solfito.

2,0% PVP-40.

Gli ultimi due composti vanno aggiunti al tampone “stock”, contenente i primi quattro reagenti, immediatamente prima dell’uso. Il tampone risultante può essere mantenuto a temperatura ambiente e usato nel giro di due settimane. Il tampone “stock” può essere autoclavato e mantenuto a temperatura ambiente.

2.2.1.2 Estrazione con Trizol

Circa 100 mg di tessuto radicale o fogliare di piante infette sono stati posti in un tubo Eppendorf da 1,5 ml.

- 1) aggiungere 1 ml di reagente Trizol (Invitrogen ®) e macinare le foglie con un pestello sterile direttamente in tubo Eppendorf.
- 2) incubare a temperatura ambiente per circa 5 minuti.
- 3) aggiungere 200 µl di cloroformio per ml di Trizol e miscelare la soluzione.
- 4) incubare 2 – 3 minuti a temperatura ambiente.
- 5) dopo l’incubazione centrifugare a 12.000 r.c.f per 10 minuti a 4°C.
- 6) recuperare la fase acquosa, passarla in un nuovo tubo Eppendorf da 1,5 ml e aggiungere 0,5 ml di isopropanolo per ml di Trizol.
- 7) eseguire un’incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente e centrifugare a 12.000 r.c.f per 10 minuti a 4°C.
- 8) eliminare la fase acquosa e lavare il pellet con 1 ml di etanolo al 70% per ml di Trizol e centrifugare a 7.500 r.c.f per 5 minuti a 4 °C.
- 9) rimuovere la fase liquida e asciugare il pellet, dai residui di etanolo, sottovuoto per circa 10 - 15 minuti, a seconda delle dimensioni.

10) risospendere il pellet in 20 µl di acqua distillata sterile trattata con DECP (dietilpirocarbonato) e mantenere l'estratto a -20 °C.

2.2.1.3 Estrazione con “Polysome buffer”

Circa 200 mg di radici o foglie di piante infette sono state poste all'interno di buste di polietilene (16x10 cm), congelate in azoto liquido e macinate con un rullo manuale fino ad ottenere una pasta omogenea.

- 1) aggiungere 0,5 ml di “Polysome buffer” avente la seguente composizione:
 - 100 mM Tris - HCl pH 8,5
 - 200 mM KCl
 - 25 mM EGTA
 - 36 mM MgCl₂
 - 1% Detergent Mix
 - 1% PTE
 - 2% DOC
 - 5mM DTT
 - 1mM PMSF
 - 50 µg/ml Cyclohexamide
 - 50 µg/ml Chloramfenicol
 - 1 mg/ml Heparina
- 2) omogeneizzare e raccogliere in tubo Eppendorf da 1,5 ml, aggiungere 500 µl di fenolo.
- 3) centrifugare a 14.000 r.p.m. per 10 minuti a 4 °C.
- 4) prelevare 500 µl della fase acquosa, passarli in un nuovo tubo Eppendorf da 1,5 ml e aggiungere 1 volume di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico in rapporto 25:24:1 con pH 4,5 (Fluka).
- 5) centrifugare a 14.000 r.p.m per 15 minuti a 4 °C.
- 6) prelevare la fase acquosa e passarla in nuovo tubo Eppendorf da 1,5 ml, aggiungere 0,6 volumi di isopropanolo e 4 µl di sodio acetato 3 M pH 6 per 100 µl di liquido.
- 7) porre il campione a -20°C per almeno 10 minuti.
- 8) recuperare gli ssRNA tramite centrifugazione a 14.000 r.p.m. a 4 °C per 20 minuti.

- 9) eliminare la fase liquida e risospendere il pellet in 100 µl di sodio acetato 3 M pH 5-6, per rimuovere gli RNA a basso peso molecolare ed eventuali polisaccaridi contaminanti. Quest'ultimo passaggio deve essere eseguito in ghiaccio.
- 10) incubare i campioni a -20 °C 10 minuti.
- 11) centrifugare a 14.000 r.p.m. a 4 °C per 15 minuti.
- 12) eliminare la fase acquosa, lavare il pellet con 500 µl di etanolo al 70% e centrifugare a 14.000 r.p.m. per 5 minuti a 4 °C.
- 13) Rimuovere la fase liquida e asciugare il pellet, dai residui di etanolo, sottovuoto per circa 10 - 15 minuti, a seconda delle dimensioni.
- 14) Risospendere il sedimento ottenuto in 50 µl di acqua distillata sterile trattata con DECP e mantenerlo a -20 °C.

2.2.1.4 Estrazione con tampone TM

L'estrazione è stata eseguita secondo il protocollo TM descritto da Jupin *et al.* (1990):

- 1) omogeneizzare il tessuto con 5 ml/g di tampone TM (100 mM Tris - HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,5) ed incubare a 37 °C per 30 minuti.
- 2) centrifugare a 12.000 g per 5 minuti a 4 °C, per eliminare i detriti più grossolani, recuperare la fase acquosa e porla in un nuovo tubo Eppendorf da 1,5 ml.
- 3) aggiungere un ugual volume di fenolo saturato con TE, miscelare con agitatore e centrifugare a 12.000 g per 15 minuti a 4 °C.
- 4) prelevare la fase acquosa porla in un nuovo tubo Eppendorf da 1,5 ml e aggiungere 1/10 del volume di sodio acetato 3M pH 8,0 e 2,5 volumi di etanolo assoluto.
- 5) incubare a -20°C per 1 h.
- 6) centrifugare per 15 minuti a 12.000 g a 4 °C.
- 7) eliminare la fase liquida, lavare il pellet con 500 µl di etanolo 70% e centrifugare a 12.000 g a 4 °C per 15 minuti.
- 8) eliminare la fase liquida e favorire l'evaporazione dell'etanolo residuo con una pompa da vuoto per circa 10 - 15 minuti.

9) risospendere il sedimento in 100 μ l di acqua distillata sterile trattata con DEPC (dietilpirocarbonato) e conservare i campioni a -20 °C.

2.2.2 Reazione di trascrittasi inversa (RT) abbinata alla reazione a catena della polimerasi (PCR)

Nella reazione di trascrizione inversa (reverse transcriptase, RT) per la sintesi del filamento di DNA complementare (cDNA), sono stati utilizzati 1 μ l di RNA dell'estrazione precedente portati ad un volume finale di 5 μ l aggiungendo i seguenti componenti:

Reverse primer (10 nm/ml)	1,0 μ l
SDW (acqua distillata sterile + DECP)	3,0 μ l

La sospensione è stata sottoposta ad un ciclo di 70 °C per 5 minuti e il tutto è stato raffreddato in ghiaccio.

In seguito sono stati aggiunti:

Buffer ImProm-II (5X; Promega)	4,0 μ l
MgCl ₂ (25mM; Promega)	1,2 μ l
Miscela dNTPs (10 mM; Promega)	1,0 μ l
DTT (0,1 μ M)	1,0 μ l
Rnasi inhibitor (40u/ μ l; Promega)	0,5 μ l
RT ImProm – II (Promega)	1,0 μ l
SDW (acqua distillata sterile + DECP)	7,5 μ l

La mix è stata posta per:

- 5 minuti a 25 °C
- 1 ora a 42 °C
- 15 minuti a 70 °C

Alla fine della reazione sono stati aggiunti 30 μ l di acqua distillata sterile trattata con DEPC e in seguito 5 μ l dei diversi campioni sono stati sottoposti alla reazione a catena della polimerasi (polymerase chain reaction, PCR) in tubi ThermoStrip 0,2 ml (AB GENE). Le reazioni di PCR sono state effettuate con due tipi di polimerasi differenti, per un volume finale di 25 μ l:

 *PCR con Pfu Ultra II Fusion HS DNA Polymerase (Stratagene):*

SDW (acqua distillata sterile + DECP)	14,35 μ l
Pfu Ultra II reaction buffer (10X)	2,50 μ l

Miscela dNTPs (10 mM; Promega)	0,70 µl
“Forward” primer (10 nm/ml; Sigma-Aldrich)	1,00 µl
“Reverse” primer (10 nm/ml; Sigma-Aldrich)	1,00 µl
Pfu Ultra II Fusion HS DNA Polymerase	0,45 µl

I campioni sono stati amplificati in Thermocycler Biometra T3000, utilizzato per tutti i nostri esperimenti, programmato come segue:

- fase di denaturazione: 20 secondi a 95 °C
- fase di ibridazione degli oligodeossinucleotidi (annealing): 20 secondi a 37° C per i primi 5 cicli, mentre i successivi 35 sono stati effettuati a 62 °C.
- fase di sintesi: a 72 °C per 8 minuti.

Per un totale di 40 cicli.

 *PCR con FideliTaq PCR Master Mix (Fermentas):*

FideliTaq PCR Master Mix (2X)	12,5 µl
“Forward” primer (10 nm/ml; Sigma-Aldrich)	1,0 µl
“Reverse” primer (10 nm/ml; Sigma-Aldrich)	1,0 µl
SDW (acqua distillata sterile + DECP)	5,5 µl

I campioni sono stati amplificati in Thermocycler Biometra T3000 programmato come segue:

- fase di denaturazione: 15 secondi a 94 °C
- fase di ibridazione: 15 secondi a 37 °C per i primi 5 cicli, mentre i successivi 25 sono stati effettuati a 54 °C.
- fase di sintesi: a 72° C con tempo variabile tra i 2 minuti a 4,5 minuti.

Per un totale di 30 cicli.

2.2.3 Protocollo di RT-PCR multiplex per la diagnosi e caratterizzazione di BNYVV, *Polymyxa betae*, BSBV, BVQ, e BSBMV

La determinazione delle infezioni virali è stata effettuata mediante indagine RT-PCR multiplex, questo protocollo permette oltre alla diagnosi e caratterizzazione del BNYVV, l’identificazione del vettore (*Polymyxa betae*) e dei virus BSBV, BVQ e BSBMV (Figura 2.1 e Tabella 2.1) (Ratti *et al.*, 2005).

Nella reazione di trascrizione inversa sono stati utilizzati 0,5 µl di RNA dell'estrazione precedente portati ad un volume finale di 5 µl aggiungendo i seguenti componenti:

M-MLV RT buffer (5X; Promega)	1,00 µl
Miscela dNTPs (10 mM)	0,50 µl
Random primer (0,5 µg/µl; Roche)	1,00 µl
M-MLV RT (200 U/µl; Promega)	0,25 µl
SDW (acqua distillata sterile + DECP)	1,75 µl

La sospensione è stata sottoposta a:

- 37 °C per 1 ora
- 94 °C per 5 minuti.

Una volta completata la reazione RT i campioni sono stati sottoposti alla reazione di PCR.

Coppia di primers	Regione dell'RNA (nt)	Dimensioni del frammento (bp)
RhizoTGB F / RhizoTGB R	1177 - 1847 ¹	670
RhizoA F / RhizoA R	1444 - 1767 ¹	324
RhizoB F / RhizoB R	1405 - 1582 ²	178
Rhizo5 F / Rhizo5 R	156 - 748 ³	593
P.beta F / P.beta R	367 - 628 ⁴	261
BSBV2 F / BSBV2 R	439 - 895 ⁵	456
BVQ3 F / BVQ3 R	921 - 1442 ⁶	521
BSBMV2 R / BSBMV2 F	947 - 1642 ⁷	695

Tabella 2.1. Primers usati per caratterizzare gli isolati di BNYVV, *P. Betae*, BSBV, BVQ e BSBMV. ¹Relativa alla sequenza X77574. ²Relativo alla sequenza X77575. ³Relativa alla sequenza AB0186. ⁴Relativa alla sequenza Y12825. ⁵Relativa alla sequenza U64512. ⁶Relativa alla sequenza AJ223598. ⁷Relativa alla sequenza AF061869.

Ai 5 µl ottenuti dalla reazione di trascrittasi inversa è stata aggiunta la miscela di PCR preparata nel seguente modo:

Free Mg buffer (5X; Promega)	5,00 µl
MgCl ₂ (25 mM; Promega)	3,00 µl
Miscela dNTPs (10 mM; Promega)	0,50 µl
RhizoA F primer (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	0,40 µl
RhizoA R primer (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	0,40 µl

RhizoB F primer (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	0,50 µl
RhizoB R primer (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	0,50 µl
Rhizo5 F primer (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	0,40 µl
Rhizo5 R primer (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	0,40 µl
P.beta F primer (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	1,00 µl
P.beta R primer (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	1,00 µl
BSBV2 F primer (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	0,50 µl
BSBV2 R primer (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	0,50 µl
BVQ3 F primer (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	0,50 µl
BVQ3 R primer (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	0,50 µl
BSBMV2 F primer (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	0,50 µl
BSBMV2 R primer (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	0,50 µl
Go-Taq polimerasi (5 U/µl; Promega)	0,25 µl
SDW (acqua distillata sterile + DECP)	4,65 µl

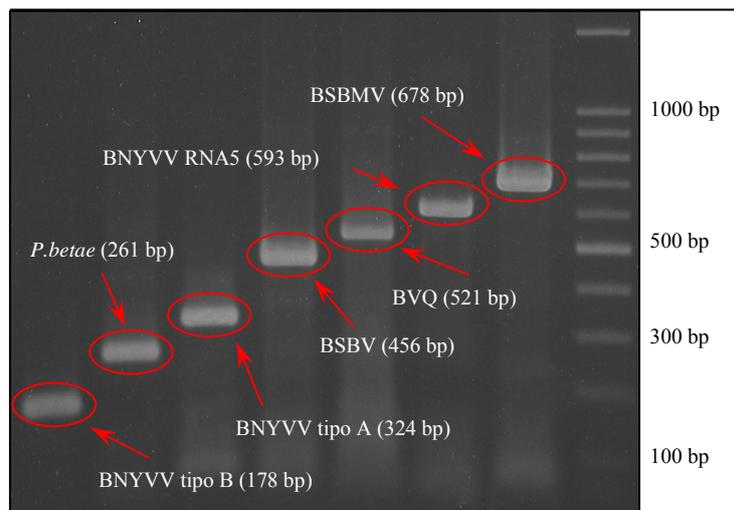


Figura 2.1. Esempio di corsa elettroforetica su gel di agarosio di un tipico profilo ottenuto con una reazione RT-PCR multiplex. 100 bp DNA ladder Promega.

La reazione è stata effettuata in un Thermocycler Biometra T3000 programmato come segue:

- fase di denaturazione: 5 minuti a 94 °C

Seguono 40 cicli ognuno dei quali composto da tre fasi:

- fase di denaturazione: 40 secondi a 94 °C
- fase di ibridazione: 35 secondi a 56 °C

- fase di sintesi: 40 secondi a 72 °C.

2.2.4 Estrazione della banda elettroforetica

Dopo aver eseguito una corsa elettroforetica su gel di agarosio i prodotti specifici di RT-PCR (primer specifici riportati in appendice A) sono stati estratti tagliando le porzioni di gel e purificandole mediante il kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega) seguendo il protocollo suggerito dalla casa produttrice:

- aggiungere 10 µl di Membrane Binding Solution per 10 mg di gel e miscelare con agitatore il campione.
- incubare il tubo Eppendorf a 60 °C e sciogliere completamente il gel.
- trasferire la soluzione su una colonna Wizard SV minicolum.
- incubare 1 minuto a temperatura ambiente.
- centrifugare a 14.000 g per 1 minuto e aggiungere 700 µl di Membrane Wash Solution.
- centrifugare a 14.000 g per 1 minuto e aggiungere 500 µl di Membrane Wash Solution.
- eluire il DNA con acqua distillata sterile trattata con DECP in un tubo Eppendorf sterile da 1,5 ml.

2.2.5 Purificazione DNA

La fase acquosa contenente il DNA d'interesse è stata portata ad un volume finale di 400 µl con acqua distillata sterile trattata con DECP, successivamente è stato seguito il seguente protocollo:

- aggiungere 400 µl di fenolo:cloroformio:alcool isoamilico (in rapporto 25:24:1 con pH 4,5 (Fluka) e miscelare la soluzione con agitatore.
- centrifugare per 15 minuti a 14.000 g a temperatura ambiente.
- prelevare la fase acquosa (circa 400 µl) e passarla in un nuovo tubo Eppendorf sterile da 1,5 ml e aggiungere:

16 µl di NaCl 5M

1 µl di glicogeno (10 mg/ml)

2 volumi di EtOH 100% freddo

- posizionare il tubo Eppendorf per 10 minuti a -20°C.
- centrifugare per 20 minuti a 14.000 r.p.m. a 4 °C.
- eliminare la fase acquosa, lavare il pellet con 500 µl di EtOH al 70% e centrifugare per 4 minuti a 14.000 g a 4 °C.
- eliminare la fase acquosa, asciugare il pellet, dai residui di etanolo, sottovuoto e risospenderlo con 20 µl di H₂O distillata sterile trattata con DEPC.

2.2.6 Procedura di “A-tailing”

Al fine di consentire l’inserimento nel plasmide pGEM-T easy (Promega) dei prodotti di PCR “Blunt-Ended”, sintetizzati dalla DNA polimerasi ad alta fedeltà con attività “proofreading”, è stato necessario effettuare la procedura di A-tailing per aggiungere un nucleotide dATP all’estremità 5’. La reazione è stata effettuata in un volume finale di 10 µl utilizzando la seguente miscela:

Taq polimerasi Buffer (5X; Promega)	2,0 µl
DNA purificato	6,8 µl
dATP (10 mM; Promega)	0,2 µl
Go-Taq polimerasi (5 U/µl; Promega)	1,0 µl

La miscela è stata incubata per 30 minuti a 70 °C.

2.3 Clonaggio dei prodotti di PCR

2.3.1 Preparazione delle cellule di *Escherichia Coli* per elettroporazione

Una sospensione di cellule di *Escherichia coli* (10µl) conservate a -80 °C in glicerolo al 50% è stata allevata over night a 37 °C in agitazione in una beuta con 10 ml di LB broth sterile.

La mattina seguente è stato prelevato 1 ml della coltura overnight ed è stato aggiunto in una beuta contenente 250 ml di mezzo liquido LB sterile. Si è proceduto secondo il seguente protocollo:

- 1) allevare a 37°C in agitazione fino al raggiungimento di un’assorbanza, a 600 nm, pari a 0,6.
- 2) trasferire il tutto in tubi falcon da 50 ml e centrifugare a 2600 r.p.m. per 15 minuti a 4 °C.

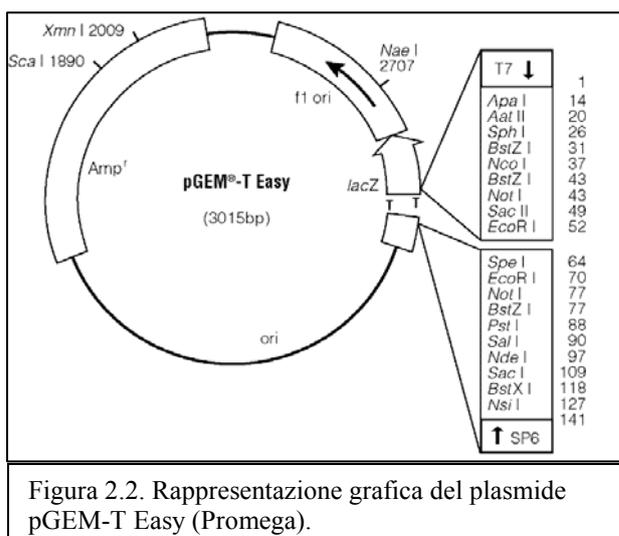
- 3) risospendere gentilmente il pellet con 50 ml di acqua ultrapura sterile (MilliQ) per ogni tubo falcon e centrifugare a 2600 r.p.m. per 15 minuti.
- 4) ripetere questa operazione altre 2 volte aumentando però la velocità della centrifuga a 5000 r.p.m. e 7500 r.p.m. rispettivamente, e raccogliere la sospensione in un unico tubo falcon.
- 5) risospendere il pellet in un volume finale di 2 ml di glicerolo al 10% e costituire aliquote da 100 µl ognuna e congelare a -80 °C.

Prima dell'uso le cellule sono state rimosse dal congelatore e lasciate 10 minuti in ghiaccio. Prima di prelevarne la quantità desiderata i tubi sono stati invertiti delicatamente alcune volte.

2.3.2 Reazione di ligasi

Le reazioni di ligasi sono state effettuate utilizzando diversi protocolli.

2.3.2.1 Ligasi con kit pGEM-T Easy Vector System (Promega)



Al prodotto di PCR che si vuole clonare sono stati aggiunti 20 µl di cloroformio. La miscela è stata centrifugata a 14.000 r.p.m. per 10 minuti a temperatura ambiente e è stata prelevata la fase acquosa eliminando il cloroformio.

Di tale fase acquosa, contenente il prodotto di PCR, 5,5 µl sono stati impiegati per la reazione di ligasi con il kit pGEM-T Easy

Vector System (Promega) (Figura 2.2) che coinvolge i seguenti reagenti:

T4 DNA ligasi buffer (2X)	7,5 µl
Vettore pGEM-T Easy (50 ng/µl)	1,0 µl
Prodotto di PCR	5,5 µl
T4 DNA ligasi (3 U/µl)	1,0 µl

Questa miscela è stata incubata per almeno 1 ora a temperatura ambiente o tutta la notte a 4 °C.

2.3.2.2 Ligasi con kit Rapid DNA ligation (Fermentas)

Per inserire frammenti di acidi nucleici nel plasmide pUC19 (Clontech, PA, USA) è stato seguito il protocollo del kit Rapid DNA ligation (Fermentas) che coinvolge i seguenti reagenti:

Rapid Ligation Buffer (5X)	3,0 µl
Vettore pUC19 (50 ng/µl)	1,0 µl
T4 DNA ligasi (5 U/µl)	1,0 µl
DNA	4,0 µl
SDW (acqua distillata sterile + DEPC)	6,0 µl

Il volume totale di 15 µl così ottenuto è stato incubato per almeno 1 ora a temperatura ambiente.

2.3.3 Trasformazione mediante elettroporazione delle cellule di *E. coli*

Dopo la reazione di ligasi, il volume di 15 µl è stato purificato seguendo il protocollo riportato nel paragrafo 2.2.5, ma nell'ultima fase dopo avere asciugato il pellet dai residui di etanolo questo è stato risospeso in un volume di 3 µl. Di questi, 1,5 µl sono stati usati per la trasformazione e i restanti 1,5 µl sono stati conservati a -20°C.

Fasi per eseguire la trasformazione:

- 1) pulire le cuvette con H₂O distillata, asciugarle e mantenerle in ghiaccio fino al momento dell'uso.
- 2) posizionare in un tubo Eppendorf 1,5 µl del prodotto di ligasi purificato e 30 µl di cellule *E. coli*. Miscelare il tutto con una pipetta.
- 3) trasformare le cellule *E. coli* con elettroporatore (Electroporator 2510, Eppendorf) ad una potenza di 2500V.
- 4) sotto cappa sterile, aggiungere 500 µl di LB liquido e miscelare la soluzione.
- 5) incubare a 37 °C per 30 minuti.
- 6) inoculare tutta la coltura liquida su una piastra Petri contenente un mezzo LB addizionato di 35 g di agar per litro + ampicillina (100 µg/ml), IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; 0,5 mM) e X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside; 80 µg/ml). Il mezzo LB agarizzato è stato sterilizzato in autoclave e raffreddato a 50 °C prima di aggiungere ampicillina, IPTG e X-

Gal. In seguito, sono stati versati 20-25 ml di mezzo in piastre Petri del diametro di 85 mm.

7) incubare le piastre a 37 °C per tutta la notte.

Per quel che riguarda pGEM-T Easy inizialmente il plasmide è interrotto a livello del gene LacZ che codifica per la β -galattosidasi, necessaria per scindere l'X-Gal presente nel terreno di crescita. Se il prodotto di PCR è incorporato nel plasmide il gene LacZ rimane interrotto, il substrato X-gal non viene scisso, conferendo alle colonie batteriche un caratteristico colore bianco. Se la trasformazione non ha avuto successo, l'inserito non è stato cioè incorporato, il gene LacZ codifica per l'enzima specifico necessario per il metabolismo dell'X-Gal, che viene scisso determinando la colorazione blu delle colonie. Quindi durante il periodo di incubazione O/N le cellule batteriche crescono assumendo una colorazione blu (non trasformate) o bianca (trasformate).

Al fine di verificare che il prodotto di PCR clonato nel vettore plasmidico è quello desiderato, è stata eseguita una reazione di screening mediante PCR. Con stuzzicadenti sterili sono state prelevate le colonie trasferendole su una "master plate" e ponendo in seguito lo stuzzicadente in un tubo termostrip da 0.2 ml contenente una miscela composta da:

Buffer Mix (con MgCl ₂ , 5X; Promega)	4,0 μ l
Primer "reverse" (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	1,0 μ l
Primer "forward" (5 nm/ml; Sigma-Aldrich)	1,0 μ l
Miscela dNTPs (10mM; Promega)	0,4 μ l
Go-Taq Polimerasi (5 U/ μ l; Promega)	0,1 μ l
SDW (acqua distillata sterile + DEPC)	14,0 μ l

La "master plate" è stata incubata a 37°C per 8 ore, mentre i tubi termostrip sono stati sottoposti a reazione di PCR, il programma prevede 25 cicli in cui sono ripetute le seguenti tre fasi:

- 94 °C per 10 secondi
- 56 °C per 10 secondi
- 72 °C per 45 secondi.

I prodotti di PCR sono stati analizzati su gel di agarosio. In base alle dimensioni del frammento ottenuto sono state selezionate le colonie batteriche da sottoporre ad allevamento over night e alla successiva estrazione plasmidica.

2.3.4 Estrazione del plasmide ricombinante

Le colonie batteriche di interesse sono state trasferite dalla “master plate” in mezzo liquido LB e allevate a 37 °C per tutta la notte.

Per l'estrazione del plasmide e la purificazione dell'inserto è stato utilizzato il kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega) seguendo il protocollo allegato:

- raccogliere il pellet di 1 - 10 ml di coltura batterica tramite centrifugazione per 5 minuti a 4.000 g.
- aggiungere 250 µl della soluzione di risospensione cellulare Wizard Plus SV Minipreps e risospendere il pellet.
- aggiungere 250 µl della soluzione di lisi cellulare Wizard Plus SV Minipreps e miscelare invertendo il tubo quattro volte.
- aggiungere 10 µl di proteasi alcalina e miscelare invertendo il tubo quattro volte.
- incubare per cinque minuti a temperatura ambiente.
- aggiungere 350 µl di soluzione di neutralizzazione Wizard Plus SV Minipreps e miscelare la soluzione.
- centrifugare il lisato batterico a 14.000 g per 10 minuti a temperatura ambiente.
- trasferire 850 µl del lisato pulito in una Wizard Plus SV Minipreps spin column inserita in un tubo di raccolta da 2 ml.
- centrifugare il lisato purificato a 14.000 g per un minuto a temperatura ambiente.
- pulire la colonna con 750 µl di soluzione di lavaggio Wizard Plus SV Minipreps column precedentemente diluita con etanolo al 95%.
- centrifugare a 14.000 g per un minuto a temperatura ambiente.
- aggiungere 250 µl di soluzione di lavaggio Wizard Plus SV Minipreps column.
- centrifugare a 14.000 g per due minuti a temperatura ambiente.
- trasferire la Wizard Plus SV Minipreps spin column in un tubo Eppendorf sterile da 1,5 ml.
- eluire il DNA plasmidico aggiungendo 100 µl di acqua priva di nucleasi alla Wizard Plus SV Minipreps spin column e centrifugare a 14.000 g per un minuto a temperatura ambiente.

Al fine di avere un'ulteriore conferma dell'avvenuto clonaggio del frammento d'interesse, il DNA plasmidico, dopo essere stato estratto, è stato sottoposto all'azione di appropriati enzimi di restrizione. E' stata impiegata la seguente miscela di digestione enzimatica usando diversi enzimi di restrizione:

Buffer (10X; Promega)	1,0 µl
Enzima (10 U/µl; Promega)	0,1 µl
DNA plasmidico	1,0 µl
SDW (acqua distillata sterile +DEPC)	7,9 µl

per un volume totale di 10 µl che è stato messo in incubazione per 1 ora a 37 °C.

I prodotti di digestione sono stati esaminati su gel di agarosio.

2.3.5 Sequenziamento degli inserti

I prodotti di PCR inseriti nei plasmidi estratti sono stati sequenziati. A tal fine una sospensione contenente 1 µg di DNA plasmidico è stata essiccata in un tubo Eppendorf da 1,5 ml sottovuoto per 10 minuti. I tubi Eppendorf sono stati inviati presso la ditta MGW AG Biotech (Ebersberg, Germania), dove è avvenuto il sequenziamento sfruttando primers o disegnati a livello dei promotori T7 e SP6 o specifici per il frammento da sequenziare.

Le sequenze ottenute sono state allineate ed analizzate mediante il programma di allineamento del pacchetto software VectorNTI (Invitrogen).

2.4 Western Blot

Il western blot, o immunorivelazione, è una tecnica immunochimica che permette di identificare la presenza di una determinata proteina in una miscela di proteine separate elettroforeticamente, mediante il suo riconoscimento con anticorpi specifici. Dopo l'elettroforesi le proteine vengono trasferite su un supporto, membrana di nitrocellulosa o PVDF o nylon, dove si procede alla reazione immunomediata e alla rivelazione enzimatica del complesso antigene/anticorpo.

2.4.1 Preparazione dei campioni

- 1) prelevare, mediante il tappo di un tubo Eppendorf da 0,5 ml, 3 dischi fogliari dai campioni da esaminare.

- 2) aggiungere 100 µl di Tampone Laemli (Laemli, 1970; Tabella 2.2) e macinare il tessuto con un pestello sterile direttamente nel tubo Eppendorf.
- 3) denaturare le proteine per 3 minuti a 100 °C.
- 4) centrifugare i campioni per 1 minuto a 14.000 g.

Tampone Laemli	
Tris – HCl [1,5 M]	10 ml
SDS 20%	6 ml
Glicerolo 100%	30 ml
Beta mercaptoetanolo	15 ml
Blu di bromofenolo	0,25 ml
H ₂ O	48,75 ml

Tabella 2.2. Ricetta per il tampone Laemli.

2.4.2 SDS - PAGE

L' SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) consiste nell'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato, un detergente anionico in grado di complessare le proteine e mantenerle denaturate nella loro struttura primaria, caricandole negativamente.

La corsa elettroforetica è stata effettuata in una cella Mini-V8·10 (GibcoBRL) che consente l'impiego di gel di dimensioni 9 x 6,5 cm (l x h) e spessore 0,75 mm. Il gel è stato preparato in due tempi successivi, i ³/₄ inferiori sono stati allestiti con il "Resolving" gel (poliacrilammide 12 % - pH 8,8) sopra al quale, prima della polimerizzazione, è stato depositato 1 ml di acqua distillata. A

	Resolving gel Stacking gel	
	12 %	4,05 %
Acilammide	3,2 ml	0,54 ml
Buffer	3,3 ml	1 ml
Ammonio Persolfato 25%	0,04 ml	0,04 ml
SDW	3,45 ml	3,41 ml
TEMED (100mg/ml)	0,01 ml	0,01 ml
	10 ml	5 ml

Tabelle 2.3. Ricette per il gel per SDS-PAGE.

polimerizzazione avvenuta l'acqua viene rimossa e il gel è stato completato mediante "Stacking" gel (poliacrilammide 4 % - pH 6,8) nel quale è stato inserito un apposito pettine che consente di ricavare 10 pozzetti con volume di circa 20 μ l (Tabelle 2.3 e 2.4).

	Tampone Resolving gel [500ml]	Tampone Stacking gel [250ml]
Tris base	68 g	18,9 g
SDS 20%	7,5 ml	6,25 ml
H ₂ O bidistillata	500 ml	250 ml
Regolazione pH	8,8	6,8

Tabella 2.4. Ricette per i tamponi per SDS-PAGE.

Nei pozzetti sono stati caricati 10 o 15 μ l (5-20 μ g) di proteine totali denaturate come riportato precedentemente. La corsa elettroforetica è stata eseguita in un tampone ad appropriata conducibilità elettrica ("Running Buffer" - Tabella 2.5).

Tampone Tris - Gly 10X		Running buffer	Transfer buffer
Tris [250mM]	30 g	Tampone Tris - Gly 10X	100 ml
Glicine [1,92M]	144 g	SDS 20%	5 ml
H ₂ O bidistillata	1 l	H ₂ O bidistillata	895 ml
			900 ml

Tabella 2.5. Ricetta per i tamponi di running e transfer.

2.4.3 Protein Blotting

Al termine della corsa elettroforetica è stato eseguito il trasferimento delle proteine su una membrana di Polyvinylidene fluoride (PVDF) impiegando una cella di trasferimento tipo *wet*:

- 1) lavare la membrana di PVDF con etanolo assoluto e successivamente idratarla in 20 ml di tampone di trasferimento (Transfer buffer – Tabella 2.5) in lenta agitazione per almeno 20 minuti.
- 2) eliminare lo "Stacking gel".

- 3) immergere nel tampone di trasferimento i due supporti spugnosi e la carta assorbente (Hybond blotting paper, Amersham Biosciences).
- 4) preparare il sandwich di trasferimento nella cassetta nel seguente ordine partendo dal lato che sarà rivolto verso l'anodo: spugna, carta, gel, membrana, carta, spugna. Prima di porre il secondo strato di carta assorbente eliminare le bolle d'aria tra la membrana e il gel.
- 5) chiudere la cassetta senza disturbare il sandwich.
- 6) riempire l'apparato con il tampone di trasferimento.
- 7) introdurre la cassetta preparata nella cella di trasferimento, avendo cura di rivolgere la membrana verso il polo positivo

Il trasferimento è stato effettuato ad una temperatura di 4 °C a 80 V per 90 minuti.

2.4.4 Preparazione della membrana e deposizione anticorpi

La membrana, dopo avere eseguito il transfer, è stata saturata in una soluzione contenente latte scremato in polvere al 5% in PBS 1X–Tween 1% (Tabella 2.6) e per almeno 30 minuti.

Tampone fosfato salino (PBS) 10X	
NaCl	80 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	29 g
KCl	2 g
H ₂ O	fino ad un volume di 1 l pH 7,4

Tabella 2.6. Ricetta per il tampone PBS 10X.

Successivamente si procede in questo modo:

- 1) aggiungere alla soluzione l'antisiero primario, coniugato o meno con l'enzima perossidasi, appropriatamente diluito (Tabella 2.7) e lasciare la membrana in agitazione 3 ore a temperatura ambiente o over night a 4 °C.

Antisiero	Concentrazione di utilizzo
Anti-CP BNYVV	1:40000
Anti-CP BSBMV	1:30000
Anti-rabbit coniugato con perossidasi	1:3500
Anti-HA coniugato con preossidasi	1:20000

Tabella 2.7. Diluizioni degli antisieri utilizzati per il saggio western blot.

- 2) eseguire 3 lavaggi da 20 minuti ciascuno con PBS 1X-Tween 1% per eliminare l'antisiero che non si è legato alla membrana.
- 3) aggiungere l'eventuale antisiero secondario coniugato con l'enzima perossidasi appropriatamente diluito (Tabella 2.7) e lasciare la membrana in agitazione over night a 4 °C.
- 4) eseguire 3 lavaggi da 20 minuti ciascuno con PBS 1X-Tween 1% per eliminare l'antisiero che non si è legato alla membrana.
- 5) aggiungere il substrato per l'enzima perossidasi, kit Lumi-light Plus Western blotting substrate (Roche), il quale innesca la reazione chemiluminescente.
- 6) impressionare una lastra fotografica e svilupparla immergendola per 10 minuti nella soluzione di sviluppo Developer Powerd D-19 (Kodak) e, previo lavaggio in acqua deionizzata, per 10 minuti nella soluzione di fissaggio Polymax Fixateur (Kodak).

2.5 Northern Blot

Il northern blot è una tecnica molecolare che consente di visualizzare ed identificare l'RNA purificato da un campione.

2.5.1 Estrazione RNA e corsa elettroforetica

Da 90 mg di tessuto fogliare con lesioni è stata effettuata l'estrazione dell'RNA con il metodo Trizol o PEB o TM, descritti precedentemente, utilizzando 5 µl di acqua "nuclease free" per risospendere il sedimento.

E' stato preparato un gel di agarosio all'1% contenente il 6% di formaldeide in tampone HEPES 10X (Tabella 2.8 e 2.9)

E' stato denaturato 1µl di RNA in 5µl di Tampone HFF per 5 minuti a 65 °C ed è stato raffreddato immediatamente in ghiaccio prima di caricarlo sul gel

denaturante. Si è proceduto con una corsa elettroforetica a 80V (30 - 40 mA) per circa 4-5 ore.

Tampone HEPES 10x pH 7,8		Tampone HFF	
HEPES 200mM	47,66 g	HEPES 10x	10 µl
EDTA 10mM	3,72 g	Formamide	50 µl
KOH	9,5 g	Formaldeide	16 µl
H ₂ O	volume finale 1l pH 7,8	Etidio Bromuro 10mg/ml	1 µl
		Blue BB a 0,1% (con 50% di glicerolo)	6 µl
		SDW	18 µl

Tabella 2.8 e 2.9. Ricetta per i tamponi HEPES e HFF.

2.5.2 Trasferimento RNA su membrana

Al termine della corsa elettroforetica è stato effettuato il trasferimento degli RNA dal gel denaturante alla membrana sfruttando un trasferimento capillare over night in una soluzione 20X SSC, la cui composizione è la seguente:

3M NaCl
0,3M Citrato di sodio
H₂O a volume di 800ml

Aggiustare il pH a 7 con HCl e portare a volume di 1l.

E' stato costruito un sandwich alla base del quale è stato disposto il gel, sopra di esso la membrana e quindi carta assorbente.

Il giorno seguente sono stati eseguiti 2 lavaggi della membrana con una soluzione al 2X SSC. In seguito è stato eseguito il fissaggio degli RNA con cross-linker Bio Link 254 a 120 J per 2 minuti e 30 secondi.

2.5.3 Sintesi della sonda a DNA con kit Ready-To-Go DNA Labelling Beads (Amersham Biosciences)

La sonda radioattiva, marcata al nucleotide citosina mediante fosforo radioattivo P³², è stata sintetizzata mediante il kit Ready-To-Go DNA Labelling Beads (Amersham Biosciences). 25–50 ng di DNA linearizzato sono stati aggiunti alla mix di reazione per un volume finale di 30ul.

1) denaturare il DNA 3 minuti a 100 °C e porlo immediatamente in ghiaccio per 2 minuti, poi fare una breve centrifuga ed aggiungere acqua sterile trattata con DEPC per raggiungere il volume di 30 µl.

- 2) aggiungere al tubo dove è presente la reaction mix la miscela ottenuta precedentemente.
- 3) in camera radioattiva aggiungere 5 μ l di dCTP (P^{32}) (Concentrazione finale di 50 μ Ci).
- 4) miscelare gentilmente.
- 5) incubare a 37 °C per 30 minuti.
- 6) Prima di aggiungere la sonda per l'ibridazione questa deve essere denaturata a 100 °C per 2 minuti e raffreddata in ghiaccio.

2.5.4 Ibridazione della sonda

La membrana è stata sottoposta a pre-ibridazione per 30 minuti a 65 °C in Perfecthyb plus buffer (SIGMA-H7033.14). In seguito è stata aggiunta la sonda marcata e lasciata in ibridazione per tutta la notte a 65 °C.

Il giorno successivo si eseguono:

- due lavaggi da 20 minuti ciascuno con SSC 2x e 2% SDS a 65 °C.
- due lavaggi da 20 minuti ciascuno con SSC 1 x e 1% SDS a 65 °C.

2.5.5 Sviluppo lastra fotografica

La membrana così trattata è stata utilizzata per impressionare una lastra fotografica per un tempo di esposizione variabile da 7 a 48 ore, in apposite cassette da autoradiografia a -80 °C. Per lo sviluppo la lastra fotografica è stata immersa per 10 minuti nella soluzione di sviluppo Developer Powder (Kodak) e, previo lavaggio in acqua deionizzata, per 10 minuti nella soluzione di fissaggio Polymax Fixateur (Kodak).

2.6 Trascrizione *in vitro*

Prima di eseguire la trascrizione *in vitro* il plasmide ricombinante è stato linearizzato mediante taglio enzimatico sfruttando il sito di restrizione posto all'estremità 3' dell'inserto. È stato utilizzando il seguente protocollo:

Buffer enzima (10X)	10 μ l
Enzima di restrizione (10U/ μ l)	0,1 μ l
Plasmide purificato alla concentrazione finale di:	1ng/ μ l
SDW fino ad un volume finale di:	100 μ l

incubare per 3 ore a 37 °C.

Il plasmide linearizzato è stato purificato e su questo è stata eseguita la trascrizione *in vitro* utilizzando il kit RiboMax (Promega) con il seguente protocollo per un volume finale di 20 μ l:

T7 Transcription buffer (5X)	4,0 μ l
rATP (100mM)	1,5 μ l
rCTP (100mM)	1,5 μ l
rUTP (100mM)	1,5 μ l
rGTP (10mM)	0,6 μ l
CAP (m7 - GpppG) promega (40mM)	1,0 μ l
DDT (0,1M)	1,0 μ l
RNasi (40 U/ μ l)	0,5 μ l
T7 RNA pol mix	2,0 μ l
Plasmide linearizzato (almeno 1 μ g)	1,5 μ l
SDW (acqua distillata sterile +DEPC)	4,96 μ l

Il tutto è stato incubato per 30 minuti a 37 °C, poi sono stati aggiunti 1,5 μ l di rGTP (100mM) ed è stata proseguita l'incubazione per 3 ore a 37 °C.

Per controllo della trascrizione 1 μ l del trascritto dopo circa 2 ore di incubazione a 37°C è stato fatto migrare su un gel di agarosio.

Il trascritto prima di essere utilizzato per l'inoculo è stato trattato con enzima DNasi.

Al volume finale di trascritto aggiungere:

Buffer RQ1 RNase-free DNase (10X, Promega)	15 μ l
RQ1 RNase-free DNase (1U/ μ l)	1,5 μ l
SDW fino a raggiungere un volume finale di:	150 μ l

Incubare 30 minuti a 37 °C, poi passare in ghiaccio e procedere sempre in ghiaccio.

1) aggiungere ai 150 μ l di trascritto trattato:

NaOAc 3M	50 μ l
SDW (acqua distillata sterile +DEPC)	300 μ l

fino a raggiungere un volume finale di 500 μ l.

2) aggiungere lo stesso volume di fenolo (500 μ l) e miscelare

3) centrifugare 10 minuti a 13000 rpm a 4°C.

- 4) prelevare la fase liquida superiore e trasferirla in un nuovo tubo Eppendorf da 1,5 ml, aggiungere 2 volumi (1000 µl) di EtOH 100% e miscelare
- 5) centrifugare 10 minuti a 13000 rpm a 4°C.
- 6) eliminare la fase liquida e lavare il pellet con 500 µl di EtOH 50%
- 7) centrifugare 5 minuti a 13000 rpm a 4°C.
- 8) eliminare la fase liquida e aspettare l'evaporazione dell'etanolo residuo all'aria.
- 9) riprendere il pellet in:

SDW (acqua distillata sterile +DEPC)	14 µl
DTT (0,1 µM)	3,0 µl
Rnasi inhibitor (40u/µl; Promega)	3,0 µl
fino a raggiungere il volume finale di 20 µl.	

Per controllo del trattamento 1 µl del trascritto è stato fatto migrare su un gel di agarosio.

2.6.1 Inoculo

L' inoculo meccanico dei trascritti su foglie di *C. quinoa*, *B. macrocarpa* e *T. expansa* è stato effettuato con la seguente miscela:

Trascritto	20 µl
Macaloide 0,5%	8,0 µl
KH ₂ PO ₄ 0,5M	10 µl
Stras12 (Miscela degli RNA1 e 2 di BNYVV tipo B)	5,0 µl
SDW (acqua distillata sterile +DEPC)	57 µl

Con un volume finale di 100 µl si inoculano le foglie dopo avervi causato micro-lesioni sul tessuto epidermico mediante polvere di celite (Diatomaceous earth, SIGMA).

2.7 Tecniche di microscopia

Le lesioni locali apparse dopo 7 giorni sulle foglie inoculate con i trascritti contenenti GFP e RFP sono state analizzate, per controllare l'effettiva replicazione delle proteine fluorescenti, con un microscopio a fluorescenza Nikon E800 munito di fotocamera Nikon DXM1200.

CAPITOLO 3

RISULTATI

3.1 Ottenimento dei cloni cDNA degli RNA di BSBMV e BNYVV

Per ottenere i cloni cDNA della sequenza completa degli RNA di BSBMV

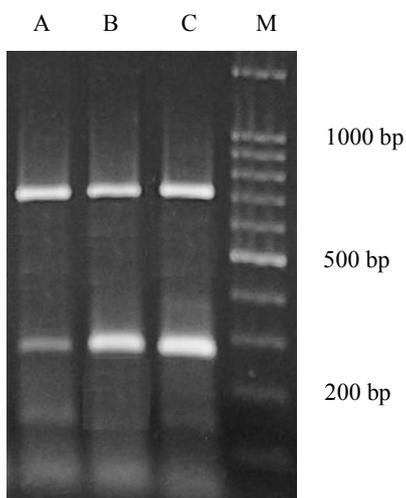


Figura 3.1. RT-PCR multiplex. Campioni di radici e foglie infetti solo da BSBMV (A, B, C). (M) Marker 100 bp DNA Ladder (Promega).

sono state eseguite reazioni di RT-PCR partendo dall'RNA totale estratto da foglie di *B. macrocarpa* e *C. quinoa* o da radici di *B. vulgaris*, mediante il reagente Trizol (Invitrogen). Per verificare l'infezione del materiale vegetale è stata utilizzata la tecnica RT-PCR multiplex (Ratti *et al.*, 2005). Le analisi effettuate hanno permesso di confermare la presenza di BSBMV nei tessuti raccolti e di escludere infezioni miste con altri virus trasmessi da *P. betae* come BNYVV, BSBV e BVQ (Figura 3.1). Sfruttando le sequenze

nucleotidiche pubblicate degli RNA di BSBMV sono state disegnate differenti coppie di primers che hanno permesso l'amplificazione delle diverse regioni dell'RNA, come riportato in appendice A.

3.1.1 Sintesi dei cloni cDNA degli RNA 1 e 2 di BSBMV

RNA1 di BSBMV

Impiegando la coppia di primers BSBMV1 NotI T7 F/OligodT21VN MluI è stata amplificata la sequenza completa dell'RNA1 del BSBMV ottenendo un amplicone di 6675 bp esclusa la coda di poly(A) (Figura 3.2). Per facilitare le procedure di clonaggio e inserzione nel plasmide pUC19 (Clontech, PA, USA) all'estremità 5' del primer forward (BSBMV1 NotI T7 F) è stato aggiunto il sito di restrizione *NotI* e il promotore T7 e il sito *MluI* all'estremità del primer reverse (OligodT21VN MluI). Il prodotto di PCR

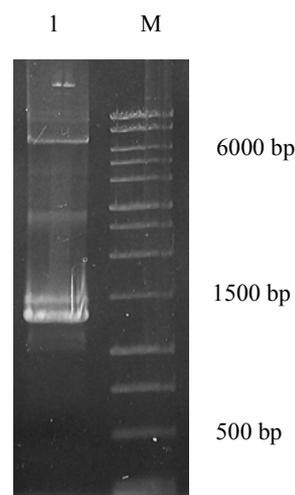


Figura 3.2. RT-PCR per ottenere l'RNA1 di BSBMV (1). (M) Marker 1 Kb DNA Ladder (Promega).

purificato è stato tagliato con gli enzimi di restrizione *NotI* e *MluI* e inserito nel plasmide pUC19 anch'esso tagliato con gli stessi enzimi di restrizione, ottenendo il clone LB106.

RNA2 di BSBMV

Impiegando le coppie di primers:

✚ BSBMV2 *NotI* T7 F/ BSBMV2 *XmaI* R

✚ BSBMV2 *XmaI* F/ BSBMV *XbaI* R

✚ BSBMV2 *XbaI* F/OligodT21VN *BglII*

è stata amplificata in tre frammenti la sequenza completa dell'RNA2 di BSBMV. Le sequenze amplificate sono state rispettivamente di 1815 bp, 1501 bp e 1346 bp. Per facilitare l'inserzione nei plasmidi pGEM-T easy (Promega) e pUC19 il primer BSBMV2 *NotI* T7 F porta il sito di restrizione *NotI* e il promotore T7, sul rispettivo primer reverse si trova il sito di *XmaI*, presente anche sulla sequenza dell'RNA2 di BSBMV. Sul primer BSBMV2 *XmaI* F si trova il sito di restrizione *XmaI* e sul primer reverse BSBMV2 *XbaI* R, il sito di restrizione *XbaI*, anch'esso presente sulla sequenza dell'RNA2 di BSBMV. Il primers BSBMV2 *XbaI* F porta il sito *XbaI* e al rispettivo primer reverse, OligodT21VN *BglII*, è stato aggiunto il sito *BglII*. I prodotti di PCR purificati sono stati tagliati con gli enzimi di restrizione appositamente introdotti nella sequenza e inseriti nel plasmide pGEM-T easy tagliato con gli stessi enzimi di restrizione. I cloni così ottenuti sono stati rispettivamente chiamati LB5, LB15 e LB9. Il clone LB5 è stato tagliato con *XmaI* e *XbaI* per permettervi l'inserimento del clone LB15 tagliato con gli stessi enzimi ed ottenere il clone LB21. Allo scopo di ottenere il clone completo dell'RNA2 di BSBMV in pGEM-T easy (clone LB29), il clone LB21 è stato tagliato con *XbaI* e *BglII* per permettere l'inserimento di LB9, tagliato nello stesso modo. Dal clone LB29 è stato tagliato, con gli enzimi *NotI* e *BglII*, il cDNA dell'RNA2 del BSBMV (4614 bp esclusa la coda di poly(A)) che è stato ligato in pUC19, tagliato anch'esso con *NotI* e *BglII*, ottenendo il clone LB38.

3.1.2 Sintesi dei cloni cDNA degli RNA 1 e 2 di BNYVV

Durante il periodo di permanenza a Strasburgo (Francia), presso l'"Institut de Biologie Moléculaire des Plantes", sotto la guida del Pof. David Gilmer, sono

state utilizzate strategie di clonaggio che sfruttano tre o due passaggi rispettivamente per produrre i cloni infettivi degli RNA1 e 2 dell'isolato di BNYVV tipo P. Da tessuto radicale di piante di bietola, cv. Roberta, suscettibile all'infezione di Rizomania, è stata effettuata l'estrazione dell'RNA, utilizzando il reagente Trizol. L'RNA isolato è stato utilizzato come target per ottenere, mediante reazione di RT-PCR:

- il cDNA dell'RNA1 suddiviso in tre frammenti chiamati Fg1 (1545 bp), Fg2 (3348 bp) e Fg3 (2257 bp) utilizzando, rispettivamente, le coppie di primers:
 - ✚ 409-RNA1F5 NotI/RNA1 R2
 - ✚ 409-RNA1 F1403/409-RNA1 R4750
 - ✚ 409-RNA1 F4512/409-RNA1 R3 (oligodT16 HindIII).
- il cDNA dell'RNA2 di BNYVV, in due frammenti chiamati Fg1 (2395 bp), Fg2 (2834 bp) utilizzando, rispettivamente, le coppie di primers:
 - ✚ 409-RNA2 F5 NotI/RNA2 R107
 - ✚ 409-RNA2 F1823/409-RNA2 R3 (oligodT16 HindIII)

Per facilitare le procedure di clonaggio e inserzione nei plasmidi pGEM-T easy e pUC19 i primers 409-RNA1F5 NotI e 409-RNA2 F5 NotI F portano, oltre al promotore T7, il sito di restrizione *NotI*, mentre i reverse primers 409-RNA1 R3 e 409-RNA2 R3 portano il sito di *HindIII*.

I frammenti Fg1 (clone MP103), Fg2 (clone MP2), Fg3 (clone MP106) dell'RNA1 e Fg1 (clone MP8) dell'RNA2 sono stati clonati singolarmente in pGEM-T easy mentre il frammento Fg2 dell'RNA2 è stato inserito in plasmide pUC19 ottenendo il clone LBS11. I cloni MP103 e MP2 sono stati fusi insieme, in pGEM-T easy, a originare il clone MP203.

Per ottenere il clone completo dell'RNA1 di BNYVV (LBS9, 6747 bp esclusa la coda di poly(A)) il clone MP203 è stato tagliato con gli enzimi *NotI* e *SpeI* e inserito in pUC19 tagliato nello stesso modo, ottenendo il clone LBS8. A sua volta il clone LBS8 è stato tagliato con *Sall* e *HindIII* per permettere l'inserimento del clone MP106, tagliato con gli stessi enzimi.

Per ottenere il clone completo infettivo dell'RNA2 di BNYVV (LBS22, 4610 bp esclusa la coda di poly(A)) il clone MP8 è stato tagliato con *SpeI* e *HindIII* per permettere l'inserimento del clone LBS11 tagliato nello stesso modo.

3.1.2 Sintesi di un clone cDNA infettivo dell'RNA 3 di BSBMV

Impiegando la coppia di primers BSBMV3 *EcoRI* T7 F /OligodT21 *HindIII* è stata amplificata la sequenza completa dell'RNA3 del BSBMV ottenendo un amplicone di 1720 bp esclusa la coda di poly(A) (Figura 3.3). Il primer forward include il sito di restrizione *EcoRI* e il promotore T7, sul primer reverse, invece, si trova il sito di restrizione di *HindIII*, in modo da facilitare le procedure di clonaggio e inserzione nel plasmide pUC19. Il prodotto di PCR è stato tagliato con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *HindIII* e inserito nel plasmide pUC19 anch'esso tagliato con gli stessi enzimi, per ottenere il clone E.

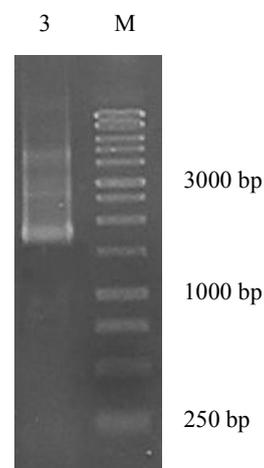


Figura 3.3. RT-PCR per ottenere l'RNA3 di BSBMV (3). (M) Marker 1 Kb DNA Ladder (Promega).

3.1.3 Sintesi di un clone cDNA infettivo dell'RNA 4 di BSBMV

Impiegando la coppia di primers BSBMV4 *NotI* T7 F/OligodT21 *BglII* è stata amplificata la sequenza completa dell'RNA4 del BSBMV ottenendo un amplicone di 1767 bp. Il primer forward porta il sito di restrizione *NotI* e il promotore T7, mentre il primer reverse porta il sito di *BglII*. Il prodotto di PCR purificato è stato tagliato con gli enzimi di restrizione *NotI* e *BglII* e inserito, con una reazione di ligasi, nel plasmide pUC19, tagliato con gli stessi enzimi (clone LB155).

3.1.4 Analisi delle sequenze

Studi precedenti hanno dimostrato il ruolo essenziale svolto dei primi 380 e degli ultimi 70 nucleotidi nella replicazione dell'RNA3 di BNYVV (Jupin *et al.*, 1990). Ulteriori studi hanno inoltre confermato l'importanza della sequenza nucleotidica che precede la coda di poly(A) degli RNA di BNYVV, ritenuta fondamentale per la formazione della struttura a forcina essenziale per la replicazione virale (Richards e Tamada, 1992). Inoltre l'analisi degli ultimi 68 residui della regione 3' UTR degli RNA 1, 2, 3, 4 di BSBMV e BNYVV evidenzia i domini conservati α , β e γ proposte da Lauber *et al.* (1997) per l'RNA 3 del BNYVV (Figura3.4).

Analisi delle sequenze degli RNA 1 e 2 di BSBMV

Confrontando la sequenza del clone LB106 con la sequenza pubblicata dell'RNA1 di BSBMV (NC_003506) e quella del clone LB38 con quella

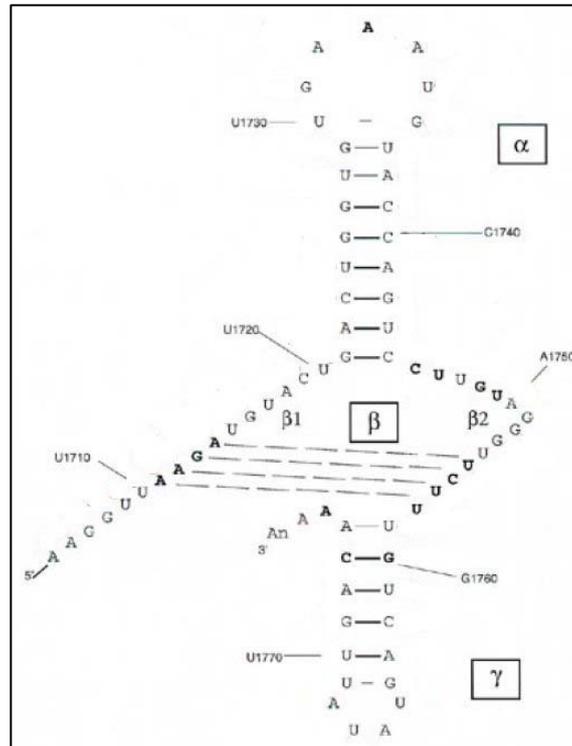


Figura 3.4. conformazione dell'estremità 3' UTR dell'RNA3 di BNYVV.

pubblicata dell'RNA2 di BSBMV (NC_003503) sono state osservate alcune differenze nucleotidiche.

	(6777)	6777	6790	6800	6810	6823
BNYVV RNA1 NC_003514 (6700)	GTGAAT	TGTACCAGT	CGTTAAAGGGT	TTACTAT	TCAGTAT	ATTGATAT
BSBMV RNA1 NC_003506 (6637)	GTGAAT	TGTACCAGT	CCTTGTAGGGT	TTGCTAT	TCAGTGT	ATTGATAT
BSBMV RNA1 LB106 (6628)	GTGAAT	TGTACCAGT	CCTTGTAGGGT	TTGCTAT	TCAGTGT	ATTG-----
BSBMV RNA1 LB160 (6628)	GTGAAT	TGTACCAGT	CCTTGTAGGGT	TTGCTAT	TCAGTGT	ATTGATAT
BNYVV RNA2 NC_003515 (4567)	GTGAAT	TGTACCAGT	CCATGTAGGGT	CTGTTT	TCAGTAT	ATTG-----
BSBMV RNA2 NC_003503 (4574)	GTGAAT	TGTACCAGT	CCTTGTAGGGT	TTATTT	TCAGT	TTATTG-----
BSBMV RNA2 LB38 (4573)	GTGAAT	TGTACCAGT	CCTTGTAGGGT	TTATTT	TCAGT	TTAC-----
BSBMV RNA2 LB157 (4573)	GTGAAT	TGTACCAGT	CCTTGTAGGGT	TTATTT	TCAGT	TTATTG-----
BNYVV RNA3 NC_003516 (1730)	GTGAAA	TGTACCAGT	CCTTGTAGGGT	CTCT	TCAGTAT	ATTGAC---
BSBMV RNA3 NC_003507 (1675)	GTGAAA	TGTACCAGT	CCTTGTAGGGT	GTACCT	TCAGTAT	ATTGAAG-
BSBMV RNA3 clone E (1675)	GTGAAA	TGTACCAGT	CCTTGTAGGGT	GTACCT	TCAGTAT	ATT-GAAG-
BNYVV RNA4 NC_003517 (1421)	GTGAAA	TGTACCAGT	CTTTATAGGGT	CTCT	TCAGTAT	ATTGAC---
BSBMV RNA4 NC_003508 (1161)	GTGAAA	TGTACCAGT	CCTTGTAGGGT	GTATTT	TCAGT	TTATTG-----
BSBMV RNA4 LB155 (1688)	GTGAAA	TGTACCAGT	CCTTGTAGGGT	GTATTT	TCAGT	TTATTG-----

Figura 3.5. Allineamento degli ultimi nucleotidi che precedono la coda di poly(A) delle sequenze pubblicate e dei cloni sintetici di BSBMV e BNYVV.

In particolare negli ultimi nucleotidi precedenti la coda di poly(A) sono state osservate 4 delezioni nel clone LB106 e 2 delezioni ed una sostituzione nel

clone LB38, risultate invece conservate nelle sequenze degli altri RNA sia di BSBMV sia di BNYVV, che potrebbero impedire la formazione della struttura a forcina nel dominio γ (Figura 3.5).

La sequenza del clone LB106 presenta inoltre, rispetto alla sequenza NC_003506, 20 sostituzioni e 12 delezioni, concentrate soprattutto nella regione 5'. Il clone LB38 evidenzia invece 11 sostituzioni ed 3 delezioni rispetto alla sequenza NC_003503.

Reazioni di RT-PCR della sola regione 3' UTR hanno permesso di ottenere i cloni LB160 (RNA1 BSBMV) ed LB157 (RNA2 BSBMV) che presentano la sequenza corretta all'estremità 3' (Figura 3.5) (Appendice B3 e B4). Al contrario reazioni RT-PCR effettuate per amplificare la sola porzione 5' degli RNA1 e 2 di BSBMV hanno fornito cloni che presentano le medesime sostituzioni prima riportate.

Analisi delle sequenze degli RNA 1 e 2 di BNYVV

La sequenza del clone LBS9 (RNA1 di BNYVV) è stata allineata con le sequenze complete dell'RNA1 di BNYVV di tipo A (NC_003514) e tipo B (gentilmente fornita dal Prof. D. Gilmer), non sono state infatti fino ad ora pubblicate sequenze complete degli RNA 1 o 2 di isolati di BNYVV del tipo P o J. Recenti osservazioni hanno inoltre evidenziato che, a livello nucleotidico, gli isolati di tipo P risultano molto più simili a quelli di tipo A piuttosto che a quelli di tipo B (Rush, 2003).

L'analisi ha evidenziato sul clone LBS9 48 sostituzioni rispetto alla sequenza NC_003514, e un'identità pari al 99,3%. L'organizzazione genomica dell'RNA1 di BNYVV prevede un unico ORF che codifica per un'unica poliproteina (Jupin *et al.*, 1988) mentre l'esame della sequenza del clone LBS9 ha permesso di individuare due ipotetiche ORF. Una transizione, G²²⁷⁷A, determina infatti nel clone LBS9 la presenza di un codone di stop (UAG), non presente sulla sequenza NC_003514. Tale transizione è stata corretta, mediante mutagenesi per PCR, ottenendo il clone LBS31 (Appendice B1).

L'allineamento della sequenza del clone LBS22 con quella dell'RNA2 di BNYVV tipo A pubblicata (NC_003515) ha messo in evidenza 50 sostituzioni ed un'identità pari al 98,9% (Appendice B2).

Analisi delle sequenze dell'RNA3 di BSBMV – Motivi strutturali all'interno delle regioni UTR dell'RNA3 di BSBMV permettono la sua replicazione, incapsidazione e movimento in pianta da parte dell'RNA 1 e 2 di BNYVV

Il clone E è stato comparato con la sequenza dell'RNA3 di BSBMV pubblicata (NC_003507) e sono state osservate quattro sostituzioni nucleotidiche (Appendice B5). Una sostituzione è stata rinvenuta nella sequenza 5' UTR (G³³⁵A) e tre nella sequenza codificante la p29 (T⁸⁰⁸A, A⁸⁸⁷G e T¹⁰⁰⁰C) conducendo rispettivamente alle sostituzioni amminoacidiche D¹²⁷E, N¹⁵⁴D e alla conservazione di un amminoacido nella sequenza della p29.

La caratterizzazione della struttura secondaria della regione 5' UTR dell'RNA3 di BNYVV ha evidenziato che le tre corte sequenze, chiamate Box I, II e III, risultate complementari alle sequenze Box I', II' e III' poste più a monte sulla regione 5' UTR, sono essenziali per la replicazione (Gilmer *et al.*, 1992, 1993). L'analisi comparata delle sequenze degli RNA3 di BSBMV e BNYVV ci ha permesso di identificare elementi corrispondenti anche sulla sequenza 5' UTR di BSBMV: Box I/I' (nucleotidi 284-293/1-10), Box II/II' (nucleotidi 237-244/15-22) e Box III/III' (nucleotidi 222-231/43-51). Confrontando queste sequenze Box sulla regione 5' UTR dell'RNA3 di BSBMV e BNYVV abbiamo osservato la presenza di variazioni compensative in grado di ristabilire perfettamente la complementarietà delle basi che consente l'appaiamento delle sequenze Box I, II e III con quelle Box I', II' e III'. La transizione C-U e la transversione A-U nel Box I' sono infatti accompagnate dalle sostituzioni di basi



Figura 3.6. Allineamento della regione 5' UTR degli RNA3 di BNYVV (NC_003516) e BSBMV (NC_003507). Le sequenze Box I, II e III e le loro complementari Box I', II' e III' sono evidenziate dai riquadri neri. I codoni di start AUG delle ORF che codificano per la p25 dell'RNA3 di BNYVV e la p29 dell'RNA3 di BSBMV sono evidenziati dai riquadri neri e dalle frecce. Gli asterischi corrispondono ai nucleotidi conservati. I primi due nucleotidi (AG) sulla sequenza M36894 appartengono al plasmide. Le variazioni compensative sono evidenziate in grigio chiaro e grigio scuro a rappresentare rispettivamente le sequenze di BNYVV e BSBMV.

U-A e G-A nel Box I. Le transizioni UU-CC nel Box II' sono seguite dalle transizioni AA-GG nel Box II. La transversione A-U all'estremità 5' del Box II non è compensata. Nel Box III' sono state osservate sei sostituzioni (tre transizioni e tre transversioni) e le relative sostituzioni compensative sono state identificate nel Box III (Figura 3.6). Fra le sequenze 3' UTR degli RNA3 di BNYVV e BSBMV sono state osservate sequenze altamente conservate. Sull'RNA3 di BSBMV è grazie alle sostituzioni compensative CA-AG in GU-

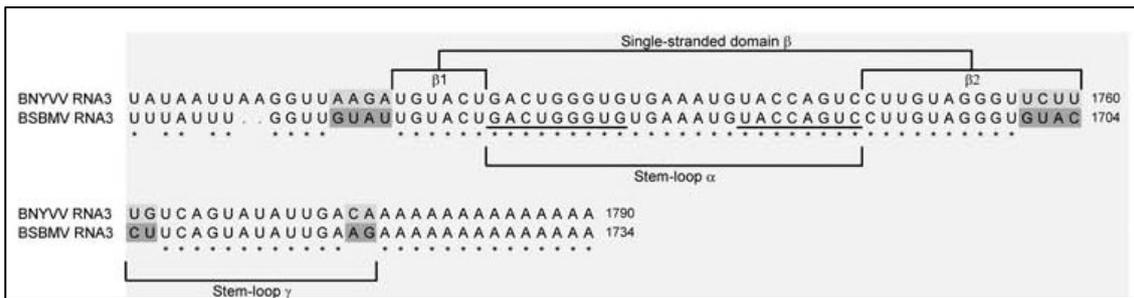


Figura 3.7. Allineamento della sequenza 3' UTR degli RNA3 di BNYVV (NC_003516) e BSBMV (NC_003507). Sono indicate le strutture conservate α , β e γ all'estremità 3' UTR degli RNA di BNYVV. Le variazioni compensative sono evidenziate in grigio chiaro e grigio scuro a rappresentare rispettivamente le sequenze di BNYVV e BSBMV.

CU, all'interno dello stem-loop γ , che alcune coppie di basi permettono la formazione degli stem-loop α e γ (Figura 3.7). Nel singolo filamento del dominio β della sequenza del BNYVV è stato proposto l'appaiamento delle basi ¹⁷¹¹AAGA¹⁷¹⁴ e ¹⁷⁵⁵UCUU¹⁷⁵⁸ (Lauber *et al.*,1997). In BSBMV l'allineamento delle sequenze ha permesso di verificare che i nucleotidi ¹⁶⁵⁷GUAU¹⁶⁶⁰ nella regione β_1 sono complementari a quelli ¹⁷⁰¹GUAC¹⁷⁰⁴ presenti nella regione β_2 .

Tali sequenze conservate nelle regioni 3' e 5' terminale degli RNA3 di BSBMV e di BNYVV, sono presumibilmente necessarie per l'efficiente riconoscimento della regione 3' terminale da parte dell'RdRp virale e risultano perciò importanti per l'inizio della sintesi degli RNA. Similitudini così forti suggeriscono una struttura secondaria simile a quella formata dagli RNA del BNYVV, che potrebbe essere assunta anche dagli RNA del BSBMV rendendoli perciò riconoscibili dalla RdRp codificata dall'RNA1 del BNYVV. Queste informazioni ci hanno permesso di investigare la possibile replicazione dell'RNA3 di BSBMV nel sistema replicativo del BNYVV (vedi paragrafo 3.2.2).

Analisi delle sequenze dell'RNA4 di BSBMV

Le uniche informazioni relative alla sequenza dell'RNA4 di BSBMV pubblicate fanno riferimento ad una molecola della lunghezza di 1203 bp (NC_003508). Il clone LB155 da noi ottenuto risulta essere 1731 bp, esclusa la coda di poly(A), il quale, in base all'allineamento con la sequenza disponibile dell'RNA4 di BSBMV, presenta 630 bp in più, situate dal nucleotide 689 al 1219 con un'identità di sequenza nucleotidica del 69,1% (Appendice B6). In termini di dimensioni e di organizzazione genomica la sequenza del clone LB155 risulta inoltre maggiormente simile a quella dell'RNA4 di BNYVV (NC_003517) nonostante l'identità nucleotidica risulti pari al 51,8%.

3.2 Trascrizione e inoculo degli RNA di BSBMV e BNYVV

3.2.1 Trascrizione e inoculo degli RNA 1 e 2 di BSBMV e BNYVV

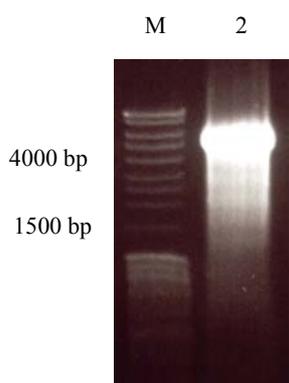


Figura 3.8. Migrazione su gel di agarosio della trascrizione *in vitro* dell'RNA2 di BNYVV tipo P dopo trattamento con l'enzima DNasi (2). (M) MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

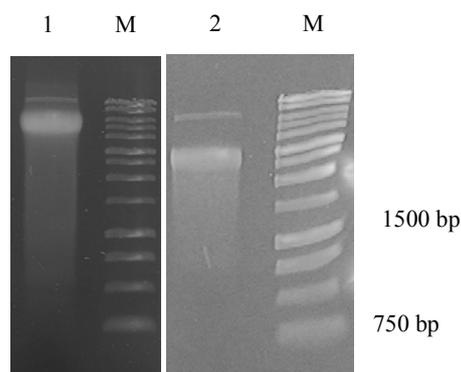


Figura 3.9. Migrazione su gel di agarosio della trascrizione *in vitro* degli RNA 1 (Linea 1) e 2 (Linea 2) di BSBMV prima del trattamento con l'enzima DNasi. (M) Marker 1 Kb DNA Ladder (Promega).

I cloni LB160, LB157 e LBS31 sono stati linearizzati con appropriati enzimi di restrizione (*MluI*, *BglII* e *HindIII* rispettivamente) e il clone LBS22 tagliato con gli enzimi *NotI/HindIII* prima di essere utilizzati nella sintesi, rispettivamente, dell'RNA 1 e 2 di BSBMV e di BNYVV, mediante trascrizione *in vitro* (Figura 3.8 e 3.9).

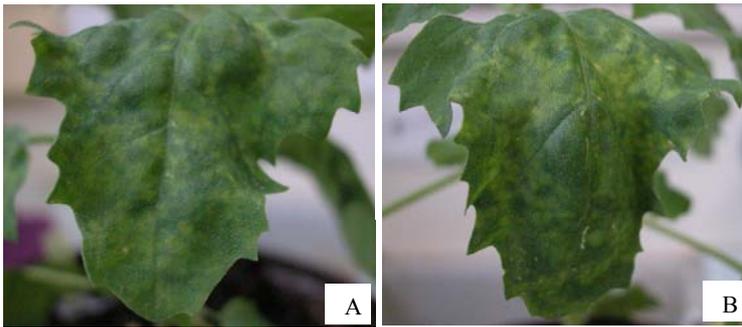


Figura 3.10. Sintomi fogliari su foglie di *C. quinoa* indotti da:
 A) RNA1 di BNYVV tipo B e RNA2 di BNYVV tipo P
 B) RNA 1 e 2 di BNYVV tipo B.

Gli RNA trascritti sono stati inoculati meccanicamente su foglie di *C. quinoa* in differenti miscele secondo quanto riportato in tabella 3.1 impiegando anche una estrazione degli RNA totali di BSBMV,

effettuata con il metodo “Polysome buffer” (isolato PolyBSBMV). I cloni degli

RNA trascritto	Clone	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
BSBMV RNA1	LB160	x	x									
BSBMV RNA2	LB157	x		x								
BNYVV RNA1 tipo P	LBS31					x	x			x		
BNYVV RNA1 tipo B	pB15			x	x			x				x
BNYVV RNA2 tipo P	LBS22					x		x			x	x
BNYVV RNA2 tipo B	pB214		x		x		x					x
PolyBSBMV									x	x	x	

Tabella 3.1. Differenti miscele utilizzate per l’inoculo meccanico di foglie di *C. quinoa*.

RNA 1 e 2 di BNYVV tipo B (pB15 e pB412) sono stati gentilmente forniti del Prof. David Gilmer.

Nessuna lesione fogliare è stata osservata dopo 7 giorni sulle piante

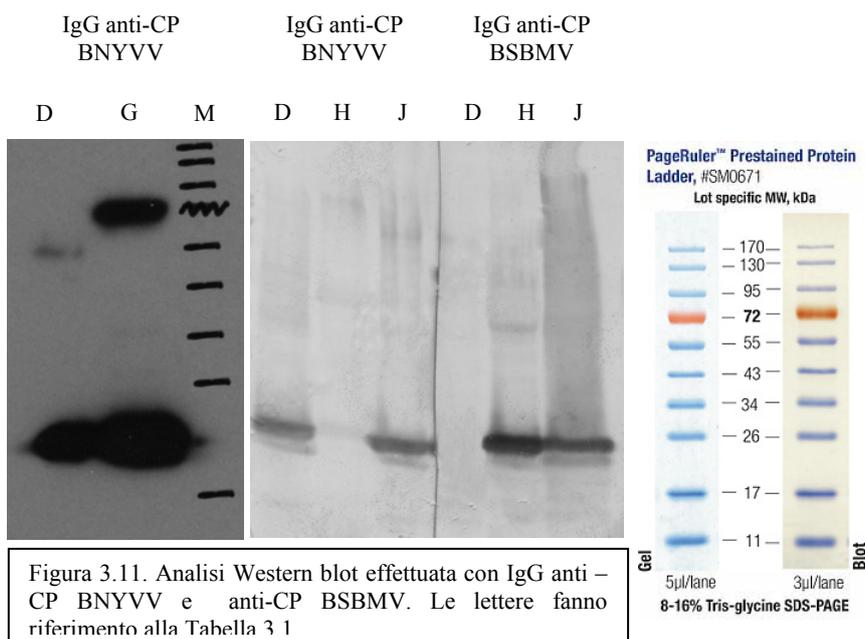


Figura 3.11. Analisi Western blot effettuata con IgG anti – CP BNYVV e anti-CP BSBMV. Le lettere fanno riferimento alla Tabella 3.1

inoculate con le miscele A, B, C, E, F ed I. Tipiche lesioni clorotiche sono comparse nelle piante inoculate con le miscele D, G e K mentre lesioni necrotiche sono comparse negli inoculi H e J (Tabella 3.1 e Figura 3.10).

L'analisi western blot, effettuata su ½ lesione fogliare e impiegando anticorpi anti-CP di BNYVV e di BSBMV ha permesso di evidenziare la presenza della sola proteina capsidica di BNYVV negli inoculi D, G e K, del solo capsidico di BSBMV negli inoculi H e I e di entrambe le proteine nell'inoculo J. (Figura 3.11).

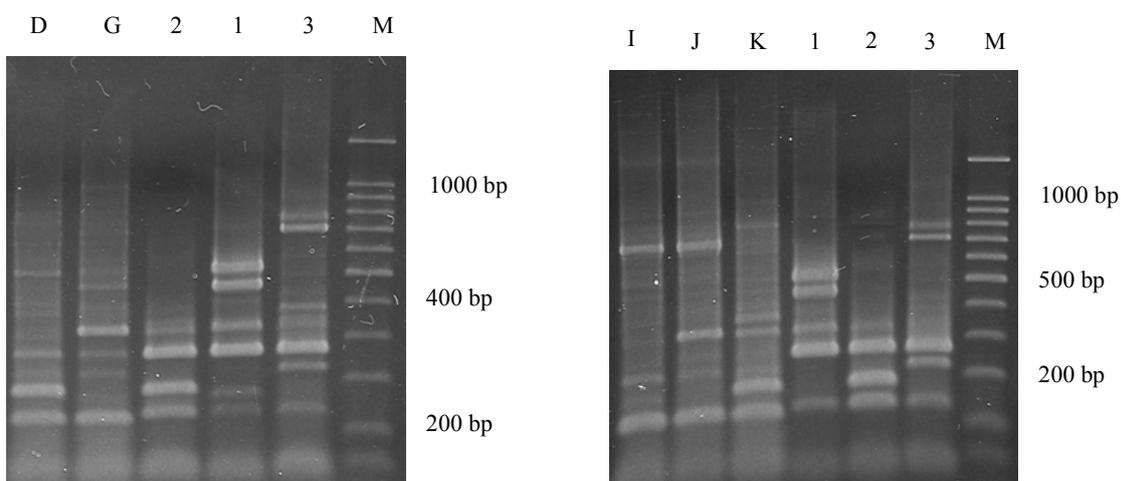


Figura 3.12. RT-PCR multiplex. 1) Controllo positivo a BNYVV tipo A, 2) Controllo positivo BNYVV tipo B e 3) Controllo positivo BSBMV. Le lettere fanno riferimento alla Tabella 3.1. (M) Marker 100 bp DNA Ladder (Promega).

Per verificare l'effettiva replicazione *in planta* e la funzionalità del trascritto dell'RNA2 di BNYVV tipo P, derivato dal clone LBS22, l'RNA estratto da tre lesioni fogliari è stato analizzato mediante RT-PCR multiplex. L'amplicone specifico per l'RNA2 di BNYVV tipo B (178 bp) è stato ottenuto solo dall'inoculo D, il prodotto di PCR specifico per l'RNA2 di BNYVV tipo A o P (324 bp) è stato amplificato negli inoculi G e J, mentre gli ampliconi specifici per l'RNA2 di BNYVV tipo B e A o P sono stati amplificati contemporaneamente solo nell'inoculo K (Figura 3.12).

3.2.2 Trascrizione e inoculo dell'RNA 3 di BSBMV

Il clone E è stato linearizzato mediante digestione con l'enzima *HindIII* e usato per la sintesi dell'RNA3 completo di BSBMV mediante trascrizione *in vitro* (Figura 3.13).

L'RNA trascritto è stato inoculato meccanicamente su foglie di *B. macrocarpa* e *C. quinoa* con una miscela contenente l'isolato Stras12. Tipiche lesioni clorotiche sono comparse dopo 7 giorni nelle piante inoculate solo con Stras12. Lesioni necrotiche, identiche a quelle ottenuti dall'espressione della p26 codificata dall'RNA5 di BNYVV (Link *et al.*, 2005), sono invece apparse quando è stato aggiunto il trascritto dell'RNA3 di BSBMV all'inoculo (Figura 3.14).

L'aspetto delle lesioni locali indica l'effettiva replicazione e movimento cellula-cellula degli RNA 1 e 2 di BNYVV come confermato dall'analisi Northern blot (Figura 3.15). A tale scopo gli RNA totali e gli RNA virali incapsidati sono stati estratti da tre lesioni fogliari utilizzando, rispettivamente, il reagente Trizol o il protocollo TM (Klein *et al.*, 2007). Sonde specifiche hanno permesso di rilevare la presenza degli RNA 1 e 2 di BNYVV (Stras12) in tutte le piante inoculate e dell'RNA3 di BSBMV in tutte quelle inoculate anche con il trascritto del clone E (Figura 3.14) evidenziando una elevata efficienza di replicazione dell'RNA3 di BSBMV nel complesso di replicazione BNYVV.

L'RNA3 di BSBMV è stato inoltre rilevato nelle estrazioni effettuate con il protocollo TM, che prevede una incubazione di 30 minuti a 37°C, indicando che l'RNA3 di BSBMV viene trans-incapsidato dalla proteina del capsid di

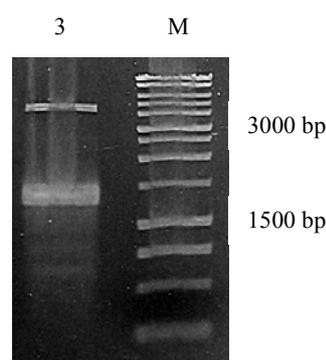


Figura 3.13. Migrazione su gel di agarosio della trascrizione *in vitro* dell'RNA3 di BSBMV prima del trattamento con l'enzima DNasi (3). (M) Marker 1kb DNA Ladder (Promega).

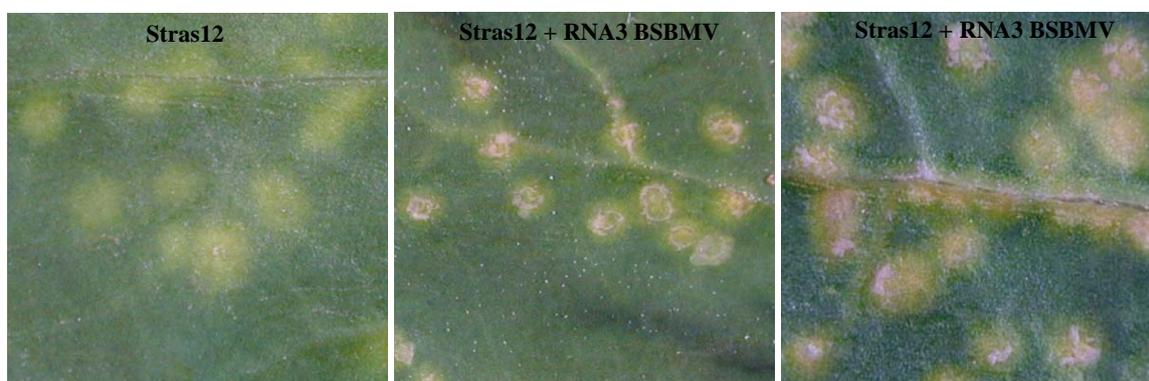


Figura 3.14. Sintomi fogliari clorotici o necrotici degli inoculi effettuati su *C. quinoa*.

BNYVV (Figura 3.14).

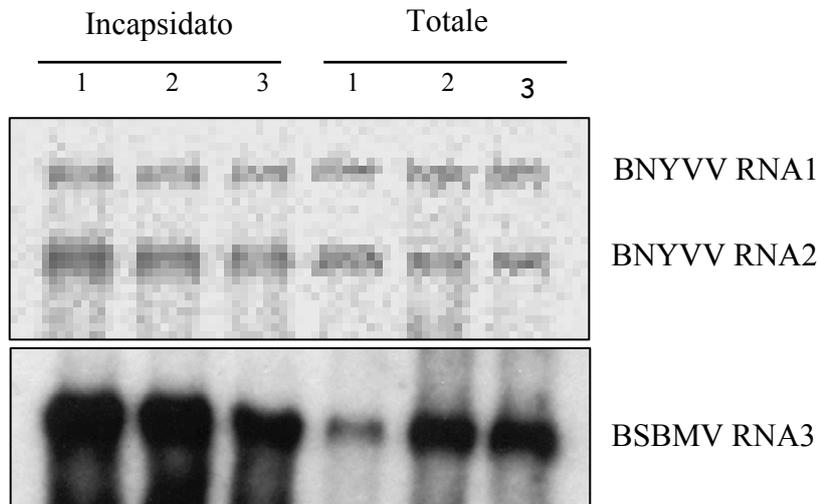


Figura 3.15. Confronto del contenuto in RNA virali, incapsidati e totali, nelle lesioni locali ottenute dopo 7 giorni sulle foglie di *C. quinoa* mediante saggio northern blot. Le miscele di inoculo contengono Stras12 e il trascritto dell'RNA3 di BSBMV.

L'RNA3 di BSBMV promuove il movimento a lunga distanza degli RNA 1 e 2 di BNYVV in *B. macrocarpa*

La regione dal nucleotide 1033 al 1257 dell'RNA3 di BNYVV (core region), è essenziale per il movimento a lunga distanza del virus in *B. macrocarpa* (Laubert *et al.*, 1998). L'isolato PolyBSBMV e l'isolato Stras12, da solo o addizionato dei trascritti in vitro dell'RNA3 di BNYVV (pB35) o di



Figura 3.16. Inoculi su *B. macrocarpa*: A, B, C e D piante inoculate con Stras12+RNA3 BSBMV; E e F piante inoculate con Stras12.

BSBMV (clone LB155), sono stati inoculati su due foglie di ogni pianta di *B. macrocarpa* dell'età di 10 giorni. Tutte le foglie inoculate hanno mostrato lesioni clorotiche dopo 5-7 giorni dall'inoculo (Tabella 3.2). Mosaicature gialle sono iniziate a comparire con carattere sistemico 10-14 giorni dopo l'inoculo sulle piante infettate con

l'isolato polyBSBMV e con Stras12 insieme all'RNA3 di BNYVV (Tabella 3.2).

Inoculo	Sintomi (dpi)		Efficienza della sistemicità (%)
	Locali	Sistemici	
Stras12	5-7	-	0
Stras12 + RNA3 BNYVV	5-7	10-14	≥ 90
Stras12 + RNA3 BSBMV	5-7	15-22	≥ 70
PolyBSBMV	5-7	10-14	≥ 90

Tabella 3.2. Cinetica della sintomatologia su *B. macrocarpa* a seguito dell'inoculo con Stras12, RNA3 di BNYVV e RNA3 di BSBMV. L'efficienza della sistemicità corrisponde alla media delle piante con sintomi sistemici rispetto al totale di quelle inoculate.
dpi, giorni dopo l'inoculo; -, non è stato rilevato alcun sintomo.

Circa 15-22 giorni dopo l'inoculo più del 70% delle piante inoculate con Stras12 e con il trascritto dell'RNA3 di BSBMV hanno presentato sintomi sistemici (Tabella 3.2), mentre nessun sintomo e nessun RNA virale sistemico è stato rilevato nelle piante inoculate solamente con Stras12, anche 40 giorni dopo l'inoculo. Con il passare del tempo sono stati notati sintomi accentuati di arricciamento fogliare e nanismo nelle piante infette sistemicamente (Figura 3.16). Anche se l'efficienza è stata più bassa del 20% sia rispetto all'inoculo con l'RNA3 di BNYVV, sia con l'isolato PolyBSBMV, i nostri esperimenti dimostrano la possibile complementazione dell'RNA3 di BSBMV nel movimento sistemico del BNYVV.

3.2.2.1 Sequenze estranee sono espresse con successo dal replicone basato sull'RNA3 di BSBMV

Sintesi di un clone cDNA basato sulla regione non codificante dell'RNA3 di BSBMV

Partendo dall'RNA3 completo di BSBMV inserito nel plasmide pUC19 (clone E) è stato ottenuto un replicone costituito dalle sole estremità 5' e 3' UTR dell'RNA3 di BSBMV, chiamato RepIII. Il replicone RepIII è stato ottenuto sostituendo la sequenza codificante la p29 con una sequenza linker (contenente i siti di restrizione *NcoI*, *Sall* e *BamHI*), mantenendo la regione 5' prossimale, 425 bp, e le 346 bp precedenti la coda poly(A) dell'RNA3.

Le sequenze codificanti la proteina GFP (Green Fluorescent Protein) e la proteina RFP (Red Fluorescent Protein) sono state inserite in RepIII dopo taglio enzimatico con *NcoI* e *BamHI* per produrre rispettivamente i cloni RepIII-GFP e RepIII-RFP. Similarmente, RepIII-p29HA è stato ottenuto utilizzando un

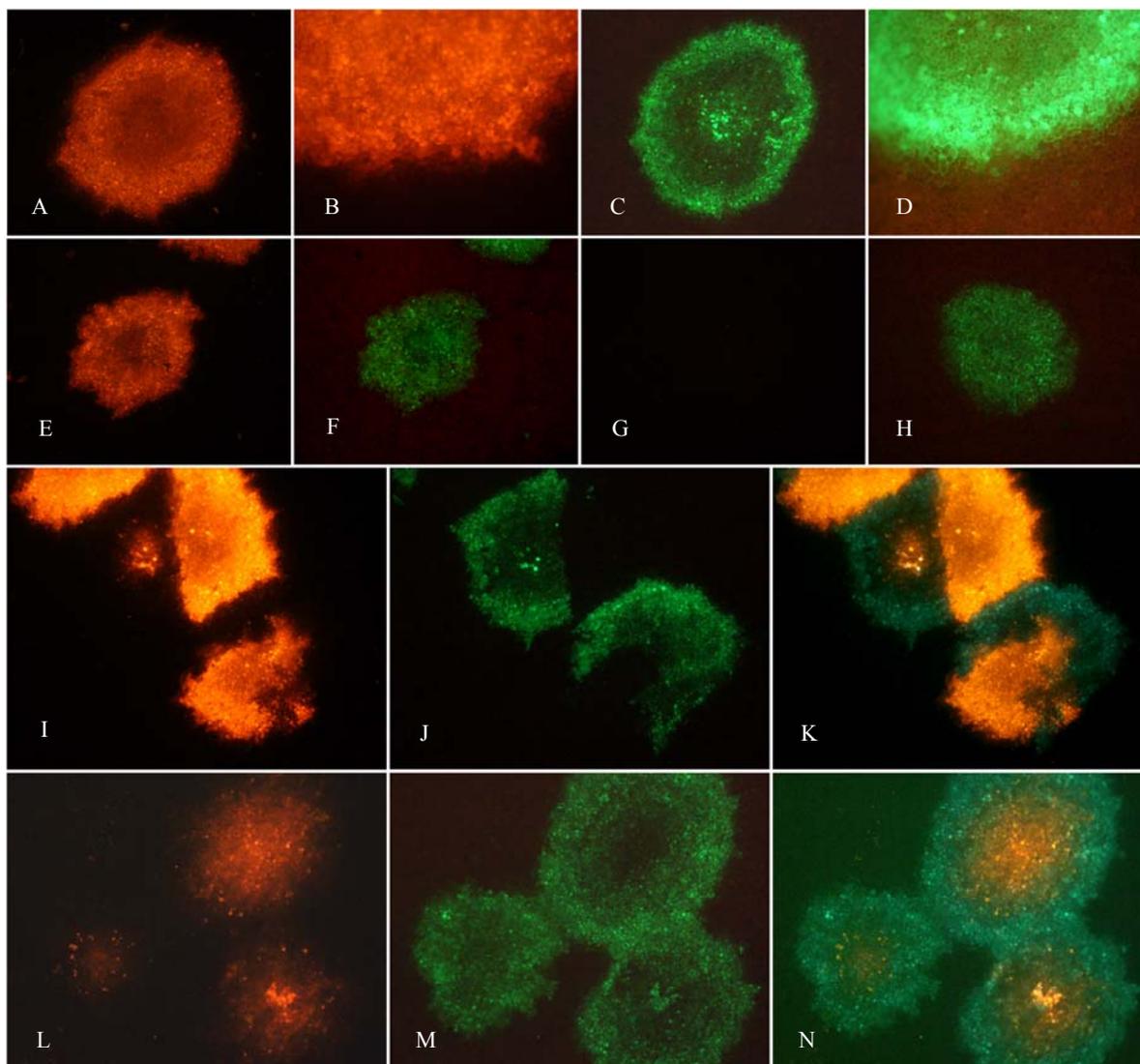


Figura 3.17. Profili di espressione della fluorescenza ottenuti 7 giorni dopo l'inoculo di Stras12 in miscela con i repliconi derivati dagli RNA3 di BNYVV e BSBMV. Espressione della RFP (A e B) e della GFP (C e D) in RepIII osservate nelle lesioni locali. Espressione della GFP e della RFP in Rep5-GFP e RepIII-RFP, rispettivamente, rilevate nella stessa lesione (E ed F). Quando viene aggiunto il trascritto dell'RNA3 di BNYVV l'espressione della RFP in RepIII-RFP non viene rilevata (G) mentre è rilevata l'espressione della GFP (H). Quando i repliconi derivanti dagli RNA3 sono co-inoculati più del 90% delle lesioni presentano un profilo d'espressione in cui RFP è espressa in una zona della lesione (I) e GFP in un'altra (J), altrimenti le lesioni presentano una sola delle proteine fluorescenti. Quando RepIII-RFP è miscelato con RepIII-GFP le lesioni appaiono rosse nella parte centrale (L) e verdi nel bordo (M). Unendo le immagini si può vedere l'intera lesione locale (K, N). Nelle immagini A, B, E, G, I e L è stato usato il filtro per l'RFP, nelle immagini C, D, F, H, J e M quello per la GFP.

prodotto di PCR, digerito con *NcoI* e *BamHI*, sintetizzato dal clone cDNA completo dell'RNA3 di BSBMV, utilizzando un primer reverse contenente la

sequenza complementare della proteina HA (haemagglutinin) (TAT CCT TAT GAT GTT CCT GAT TAT GCA TGA) del virus dell'influenza umana.

Trascrizione e inoculo dei cloni RepIII- P29HA, RepIII- GFP e RepIII-RFP

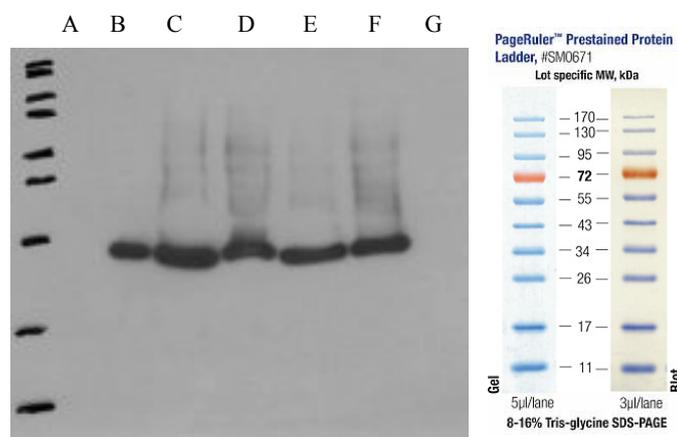


Figura 3.18. Western blot di campioni fogliari di piante di *C. quinoa* inoculate con: Stras12 (A), Stras12 con RepIII+p29HA (B-F), Stras12 e RepIII+GFP (G). (M) Marker Protein Ladder (Fermentas).

I cloni di RepIII-GFP, RepIII-RFP e RepIII-p29HA, una volta linearizzati con *HindIII*, sono serviti come stampo per la sintesi *in vitro* dei rispettivi trascritti RNA. Questi trascritti sono stati inoculati insieme a Stras12 su foglie di *C. quinoa*. Lesioni locali di colore verde clorotico sono state osservate dopo 7 giorni dall'inoculo nelle piante inoculate con Stras12 solo o in combinazione con i trascritti di RepIII-GFP o RepIII-RFP. Lesioni necrotiche sono comparse nelle foglie inoculate con Stras12 insieme al trascritto RepIII-p29HA.

L'espressione delle proteine fluorescenti è stata confermata mediante osservazione al microscopio a fluorescenza. In tutte le foglie inoculate con Stras12 e RepIII-GFP o RepIII-RFP le proteine GFP e FRP sono rispettivamente espresse (Figura 3.17 A, B, C e D). L'espressione della p29HA è stata rilevata, mediante western blot, in tutte le lesioni necrotiche saggiate impiegando un anticorpo specifico per la proteina HA (Figura 3.18). I sintomi prodotti in presenza della p29HA sono identici a quelli ottenuti a seguito dell'inoculo del trascritto dell'RNA3 di BSBMV (clone E).

L'RNA contenuto in tre singole lesioni locali è stato analizzato mediante northern blot. Il rilevamento di RepIII-RFP e RepIII-GFP conferma che la fluorescenza osservata nelle lesioni locali è dovuta alla replicazione competente

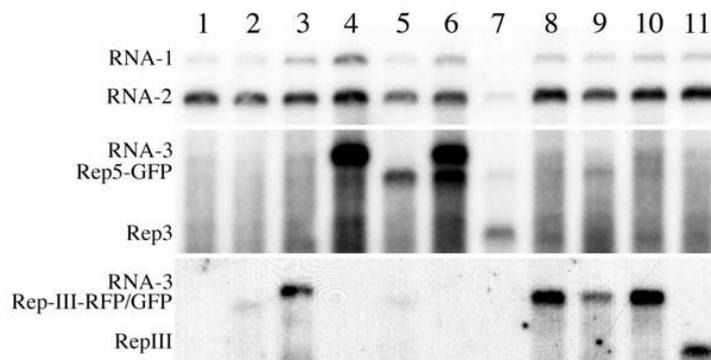


Figura 3.19. Confronto del contenuto in RNA virali nelle lesioni locali ottenute dopo 7 giorni su foglie di *C. quinoa*. Le miscele di inoculo contengono: Stras12 (1) a cui sono stati aggiunti (2-7): RepIII-RFP solo (2) o insieme all'RNA3 di BSBMV (3), l'RNA3 di BNYVV (4), Rep5-GFP (5), RNA3 di BNYVV+Rep5-GFP (6) e Rep3+Rep5-GFP (7) o con (8-11) RepIII-GFP solo (8) o con Rep3-RFP (9), RepIII-RFP (10) e RepIII+Rep3-RFP (11). La posizione delle specie di RNA è indicata a sinistra.

di specie del RepIII. Interessante è che RepIII-GFP è replicato in modo più efficiente rispetto a RepIII-RFP (Figura 3.19 in basso, comparare linee 2 e 8). La replicazione di RepIII nel contesto BNYVV non interferisce con l'accumulo degli RNA 1 e 2 di BNYVV, in quanto una quantità simile viene rilevata fra gli RNAs e gli RNA totali estratti (Figura 3.19 in alto, comparare linee 1, 2 e 8).

C'è competizione fra i repliconi derivati dagli RNA 3 di BSBMV (RepIII) e di BNYVV (Rep3), ma non fra RepIII e il replicone derivato dall'RNA5 di BNYVV (Rep5)

L'analisi complessiva dei risultati ottenuti mediante northern blot ha permesso di stabilire che non sono significativi gli effetti dell'inoculo sull'accumulo degli RNA1 e 2 di BNYVV (Figura 3.19 in alto). BNYVV Rep5-GFP così come l'RNA3 completo sono stati ritrovati all'interno delle progenie virali ogni volta che i corrispondenti trascritti erano presenti nell'inoculo (Figura 3.19 intermedia, linee 5, 6 e 7 per Rep5-GFP e linee 4 e 6 per RNA3 BNYVV). Il trascritto del clone E è simile all'RNA3 completo di BNYVV nel contesto BNYVV. Precedenti studi hanno rivelato la competizione fra RNA3 di BNYVV e il replicone da esso derivato (Rep3) (Laubert *et al.*, 1999). Al fine di verificare

eventuali competizioni nella replicazione RepIII e i suoi derivati sono stati inoculati, in presenza di Stras12, su foglie di *C. quinoa* insieme all'RNA3 di BNYVV o a Rep3. In funzione del tipo di inoculo, tipiche lesioni locali verde clorotico (CS), gialle (YS) e necrotiche (Nec) sono apparse dopo 7 giorni sulle

Inoculo Stras12 con:	Fluorescenza	Effetto
RepIII-RFP + t35	Nd	Competizione: inibizione RepIII, YS
RepIII-RFP + tUC31	Nd	Competizione: inibizione RepIII, Nec
RepIII-RFP + t35 + Rep5-GFP	GFP	Competizione: inibizione RepIII, YS
RepIII-RFP + Rep3 + Rep5-GFP	GFP	Competizione: inibizione RepIII, CS
RepIII-RFP + Rep5-GFP	RFP e GFP	No competizione, CS
RepIII-GFP + RepIII + Rep3-RFP	Nd	Competizione: Inibizione RepIII-GFP e Rep3-RFP, CS
RepIII-GFP + Rep3-RFP	GFP e RFP	Segregazione settoriale, CS
RepIII-GFP + RepIII-RFP	GFP e GFP	Segregazione, CS

Tabella 3.3. Riassunto delle proprietà competitive degli RNA e dei derivati degli RNA3 valutate tramite fluorescenza e caratterizzazione fenotipica. Le lesioni locali su *C. quinoa* sono apparse 7 giorni dopo l'inoculo con Stras12 miscelato a BSBMV (RepIII o trascritto dell'RNA3 di BSBMV) e/o BNYVV (Rep3, Rep5 o trascritto dell'RNA3 di BNYVV). Rep3 e RepIII corrispondono ai vettori vuoti. Nd, non rilevata; Nec, lesione necrotica; YS, lesione gialla; CS, lesione clorotica.

foglie inoculate (Tabella 3.3). Singole lesioni sono state analizzate al microscopio a fluorescenza (Figura 3.17) e mediante northern blot, (Figura 3.19) ed i risultati ottenuti riassunti in Tabella 3.3.

Le lesioni gialle sono indicative dell'espressione della p25 codificata dall'RNA3 di BNYVV (Jupin *et al.*, 1992) e le lesioni necrotiche indicano la presenza dell'RNA 3 completo di BSBMV (clone E). Co-inoculando RepIII-RFP con l'RNA3 di BNYVV o di BSBMV si ha la scomparsa dei derivati del RepIII, conseguente assenza di fluorescenza delle lesioni e mancanza delle lesioni gialle o necrotiche causate dagli RNA3, rispettivamente, di BNYVV e BSBMV (Tabella 3.3). Inoltre l'analisi northern blot conferma l'assenza di RepIII-RFP (Figura 3.19, linee 3 e 4) e dell'RNA3 di BSBMV (Figura 3.19 in basso, linea 3) o di BNYVV (Figura 3.19 intermedia, linea 4).

L'aggiunta del trascritto derivato da Rep5-GFP a queste combinazioni porta all'espressione della GFP e alla comparsa di lesioni gialle locali (Figura 3.17, H), suggerendo che il clone Rep5 non interferisce con l'accumulo dell'RNA3 di BNYVV (Figura 3.19 intermedia, linea 6), come precedentemente descritto (Schmidlin *et al.*, 2005), e non reintegra l'accumulo di RepIII (Figura 3.17, G e Tabella 3.3). Questo effetto di non competizione fra Rep5-GFP sull'RNA3 di BSBMV è stato confermato nell'interazione con RepIII-RFP in quanto in tutte le

lesioni locali sono state espresse entrambe le proteine fluorescenti (Figura 3.17, E ed F) e sono state rilevate entrambe le specie virali (Figura 3.19 intermedia e in basso, linea 5). L'origine della molecola derivata dall'RNA3 di BSBMV non ha quindi azione sull'effetto competitivo, Rep3 è inoltre in grado di inibire RepIII-RFP (Figura 3.19 intermedia e in basso, linea 7 e Tabella 3.3). Similmente RepIII inibisce l'accumulo di Rep3-RFP e la sua espressione (Figura 3.19 intermedia e in basso, linea 11 e Tabella 3.3). La contemporanea presenza di RepIII-GFP e Rep3-RFP nell'inoculo porta all'espressione di entrambe le proteine fluorescenti secondo un fenotipo settoriale (Figura 3.17, I, J e K e Tabella 3.3). L'analisi sul contenuto in RNA rivela la presenza di entrambi gli RNA Rep3-RFP e RepIII-GFP derivati dal vettore virale (Figura 3.19 intermedia e in basso, linea 9), anche se ne diminuisce l'accumulo. Un effetto simile, ma più debole si è ottenuto quando RepIII-RFP è stato miscelato nell'inoculo con RepIII-GFP. In questo caso si presenta un modello fenotipico differente da quello settoriale prima descritto in cui RFP sembra essere espressa maggiormente al centro delle lesioni che risultano contornante da un anello in cui viene espressa la GFP (Figura 3.17, L, M e N e Tabella 3.3). L'analisi Northern blot ha evidenziato la presenza RepIII in tutte le lesioni analizzate (Figura 3.19 in basso, linea 10).

3.2.3 Trascrizione e inoculo dell'RNA 4 di BSBMV

Il clone LB155 è stato linearizzato mediante digestione con l'enzima *BglII* e usato per la sintesi dell'RNA4 di BSBMV infettivo mediante trascrizione *in vitro* (Figura 3.20).

L'RNA trascritto è stato inoculato meccanicamente su foglie di *B. macrocarpa* e *C. quinoa* con una miscela contenente Stras12 con o senza l'aggiunta del trascritto dell'RNA3 di BNYVV o di BSBMV. Tipiche lesioni clorotiche caratterizzate dalla presenza di un anello necrotico

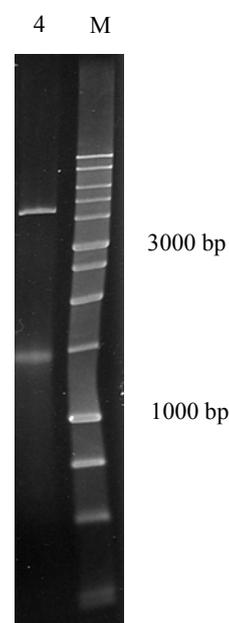


Figura 3.20. Migrazione su gel di agarosio della trascrizione *in vitro* dell'RNA4 di BSBMV prima del trattamento con l'enzima DNasi (4). (M) Marker 1 Kb DNA Ladder (Promega).

sono comparse dopo 7 giorni sulle foglie delle piante inoculate con Stras12 e il trascritto dell'RNA4 di BSBMV (Figura 3.21), mentre in presenza del trascritto dell'RNA3 di BSBMV o di BNYVV le lesioni sono apparse necrotiche o clorotiche rispettivamente.

La replicazione dell'RNA4 di BSBMV e il suo trans-incapsidamento da parte della proteina del capsidate di BNYVV sono state riscontrate in tutte le piante inoculate, mediante analisi northern blot delle estrazioni di RNA effettuate, rispettivamente, con i protocolli Trizol e TM .

L'aspetto delle lesioni locali, se comparate a quelle causate dall'isolato Stras12, indicano inoltre l'effettiva replicazione dell'RNA4 di BSBMV.

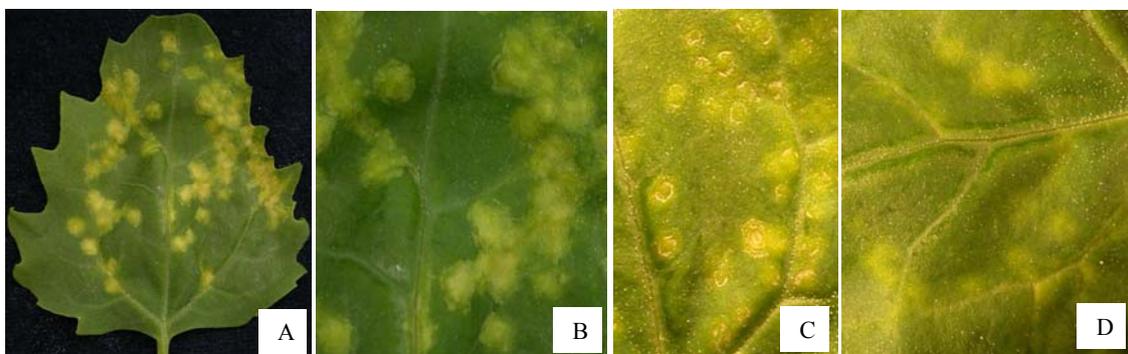


Figura 3.21. Sintomi fogliari clorotici con anello necrotico degli inoculi effettuati su foglie di *C. quinoa* con una miscela di Stras12 (D) insieme al trascritto dell'RNA 4 di BSBMV (A-C).

3.2.3.1 Inoculi seriali di BSBMV su *C. quinoa* hanno portato alla comparsa di una chimera RNA4-RNA3 del BSBMV

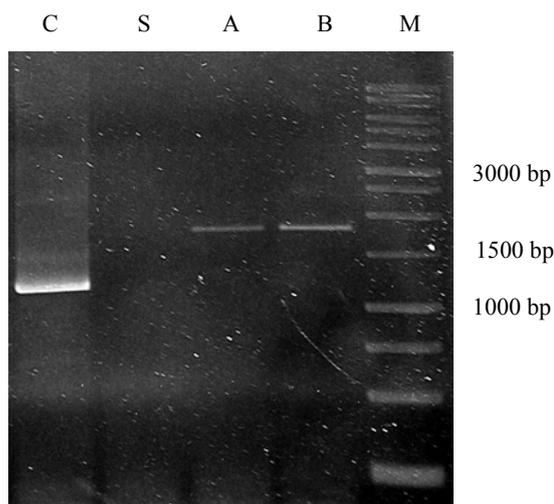


Figura 3.22. PCR di controllo con primer BSBMV4 NotI T7 F / OligodT21aVN BglIII R: (A) e (B) RNA4 completo; (S) Campione sano; (C) 21° inoculo seriale. (M) Marker 1kbp DNA Ladder (Promega).

Secondo quanto pubblicato da Bouzouba *et al.* (1991) il reinocolo meccanico di BNYVV su piante ospiti può determinare la scomparsa degli RNA accessori (RNA 3 e/o 4) o la comparsa di delezioni nella loro sequenza.

Radici di *Beta vulgaris* cv. Portland, infette da BSBMV, sono state macinate ed inoculate meccanicamente su foglie di *C.*

quinoa. Dopo 7 giorni sono state osservate lesioni necrotiche tipiche di BSBMV. Tre lesioni sono state re-inoculate su nuove foglie di *C. quinoa* ogni 7 giorni. Prima di ogni inoculo si è eseguita una reazione di RT-PCR di controllo al fine di verificare la presenza degli RNA3 e 4 di BSBMV e l'eventuale presenza di forme delete.

Sono stati attualmente eseguiti 55 inoculi seriali e l'RNA3 di BSBMV è sempre stato rilevato senza che siano state identificate forme delete. Per quel che riguarda l'RNA4 al 14° inoculo la reazione di RT-PCR ha mostrato un amplicone di circa 1310 bp esclusa la coda di poly(A). Il prodotto di PCR è stato inserito nel plasmide pUC19, ottenendo il clone LB55. Questo è stato sequenziato e la sequenza allineata con quella del clone LB155, dall'allineamento è stata messa in evidenza una delezione di 432 nucleotidi situati dal nucleotide 612 al 1043 sul clone LB155. Inoltre, la sequenza del clone LB55 è stata allineata con la sequenza pubblicata dell'RNA4 di BSBMV, fra le due è risultata un'identità del 91,6%, maggiore rispetto a quella ottenuta dall'allineamento fra la sequenza pubblicata e quella del clone LB155. Dall'allineamento della sequenza del clone LB55 con quella pubblicata dell'RNA4 di BSBMV viene messo in evidenza che il clone LB55 presenta 98 nucleotidi in più, dal nucleotide 603 al 701, che si inseriscono a livello del nucleotide 610 della sequenza pubblicata. Il clone delete presenta inoltre 9 sostituzioni rispetto alla sequenza pubblicata e 11 rispetto al clone LB155 (Appendice B7).

Al 21° inoculo la reazione di RT-PCR ha mostrato un amplicone di 1144 bp, esclusa la coda di poly(A) (Figura 3.22). Il prodotto di PCR è stato inserito in pUC19 ottenendo il clone LB89. Il clone LB89 è stato sequenziato e allineato con le sequenze pubblicate degli RNA 3 e 4 di BSBMV e di BNYVV

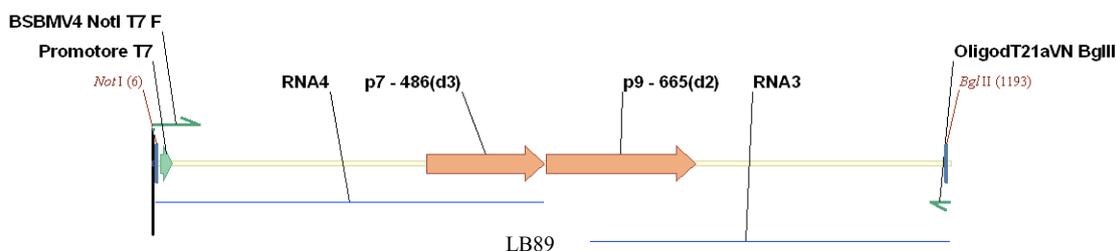


Figura 3.23. Mappa genetica del clone LB89, complementare alle estremità 3' dell'RNA4 di BSBMV e 5' dell'RNA3 di BSBMV.

(Appendice B8). Dall'allineamento è risultato che il clone LB89 presenta la porzione 5', dal nucleotide 1 al 556, identica alla regione 5' dell'RNA4 di BSBMV (clone LB155) e la porzione 3', dal nucleotide 556 al 1162, corrispondente ai nucleotidi 1132-1720 dell'RNA3 di BSBMV. Mediante il Software Vector NTI (Invitrogen) sono state inoltre individuate due ipotetiche ORF sul filamento senso della sequenza in grado di codificare due ipotetiche proteine: p7 e p9 (Figura 3.23). Infatti sulla sequenza sono presenti 2 codoni AUG (382-384 e 561-563) e 2 codoni di stop UGA (559-561 e 786-788) che danno origine alle due teoriche ORF comprese tra i nucleotidi 382-561 (p7) e 561-788 (p9).

Studio della chimera

Al fine di verificare se le ipotetiche proteine p7 e p9 sono tradotte *in vivo* sono stati sintetizzati due cloni, originati dal clone LB155, in cui è stata inserita la sequenza della proteina HA fusa all'estremità C-terminale delle ipotetiche proteine p7 e p9, ottenendo rispettivamente i cloni MD09 e MD10. Questi cloni sono stati utilizzati, dopo essere stati linearizzati con BglII, per la trascrizione *in vitro*.

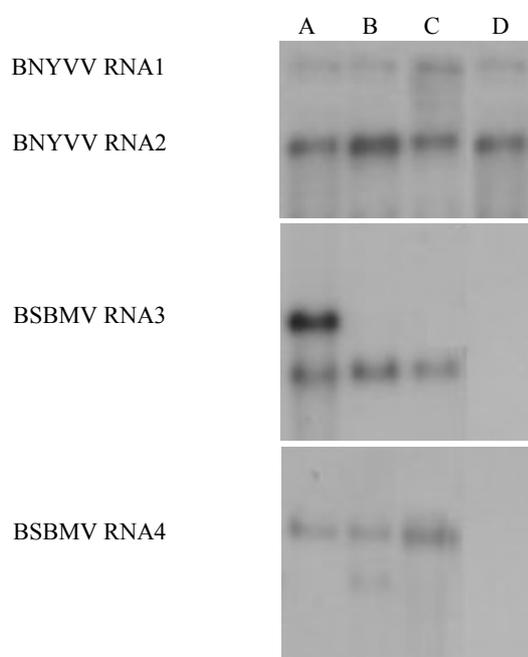


Figura 3.24. Confronto del contenuto in RNA virali nelle lesioni locali ottenute dopo 7 giorni sulle foglie di *C. quinoa* mediante saggio northern blot. Le miscele di inoculo contengono Stras12 (D) a cui è stato aggiunto: il trascritto dell'RNA3 di BSBMV e p9HA (A), p9HA (B), p7HA (C).

Gli RNA trascritti sono stati inoculati meccanicamente su foglie di *C. quinoa* con una miscela contenente Stras 12, a distanza di 7 giorni dall'inoculo su tutte le piante inoculate sono comparse lesioni clorotiche tipiche dell'infezione dell'isolato Stras12. Per verificare l'effettiva replicazione *in planta* degli RNA derivati dai cloni MD09 e MD10 sono stati estratti gli RNA totali da 3 lesioni e sono stati saggiati mediante northern blot usando sonde specifiche marcate con ^{32}P radioattivo (Figura 3.24). Sequenze specifiche dell'RNA3 e RNA4 di BSBMV sono state rilevate in tutte le piante inoculate ad eccezione della sola pianta di controllo inoculata solo con Stras12. Al fine di verificare la funzionalità delle due ipotetiche ORF p7 e p9 della chimera si è proceduto mediante saggio

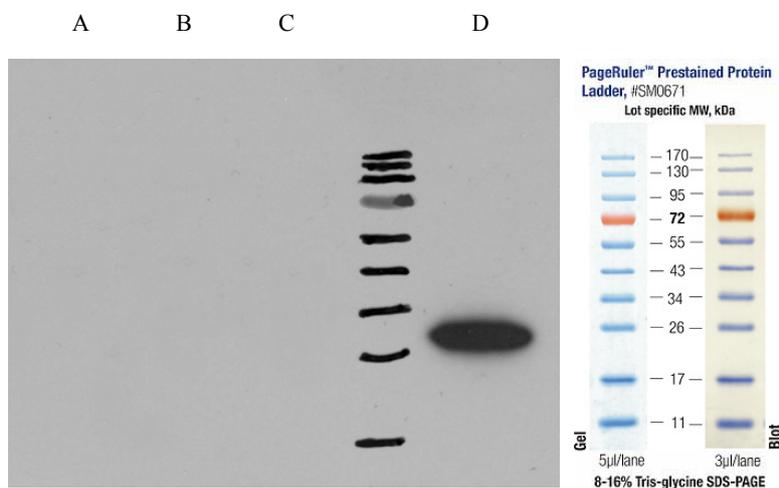


Figura 3.25. Western blot di campioni fogliari di piante di *C. quinoa* inoculate con Stras12 miscelato a: RNA3 BSBMV+p9HA (A), p9HA (B), p7HA (C) e p29HA (D). (M) Marker Protein Ladder (Fermentas).

western blot partendo da 3 lesioni fogliari. Entrambe le proteine p7HA e p9HA non sono visibili sulla lastra fotografica mentre è ben visibile la p29HA, utilizzata come controllo positivo della reazione e dell'inoculo (Figura 3.25).

3.3 Core Region RNA3 BNYVV

3.3.1 Sintesi di un clone cDNA della Core Region dell'RNA3 BNYVV

Con la coppia di primer BNYVV3Core F NcoI e BNYVV3Core R BamHI è stata amplificata la core region dell'RNA3 del BNYVV (226 bp). Il primer forward porta il sito di restrizione *NcoI* e il primer reverse *BamHI* per il clonaggio in RepIII e Rep3. Il prodotto di PCR purificato è stato tagliato con

NcoI e *BamHI* e ligato nei plasmidi RepIII e Rep3, tagliati nello stesso modo, ottenendo rispettivamente i plasmidi MD05 e MD06.

3.3.2 Trascrizione e inoculo della Core Region

I plasmidi MD05 (RepIII-Core Region) e MD06 (Rep3-Core Region) sono stati linearizzati con *HindIII* e utilizzati per la sintesi di RepIII-Core region e Rep3-Core region, rispettivamente, mediante trascrizione *in vitro*.

Gli RNA trascritti sono stati inoculati su foglie di *B. macrocarpa* in miscela con Stras12. Contemporaneamente sono stati trascritti e inoculati nelle medesime condizioni gli RNA3 di BSBMV e BNYVV. Dopo 7 giorni dall'inoculo su tutte le foglie inoculate sono comparse lesioni clorotiche, tipiche dello Stras12. Dopo 15 giorni sono comparsi sintomi sistemici solamente nelle piante inoculate con i trascritti degli RNA3 di BSBMV e BNYVV, mentre nessun sintomo sistemico è comparso nelle piante inoculate con i trascritti dei cloni MD05 o MD06.

3.4 Messa a punto di un metodo per l'infezione naturale attraverso il vettore *P. betae* di radici di barbabietola da zucchero con BSBMV e BNYVV

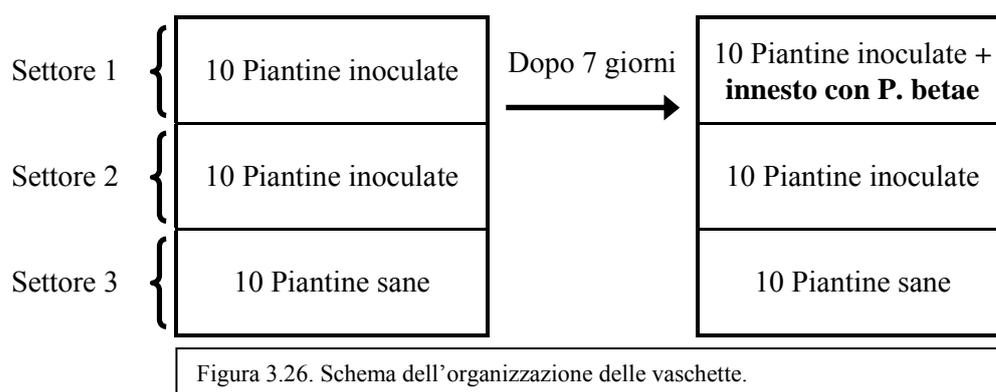
3.4.1 Protocollo per l'infezione naturale di piante di barbabietola da zucchero mediata da *P. betae*

A partire dal metodo di inoculo pubblicato da Koenig e Stein (1990) è stato messo a punto un protocollo che ha permesso di infettare radici di piante di barbabietola da zucchero tramite il vettore naturale dei virus oggetto di studio, *P. betae*. Questo metodo permette di riprodurre l'infezione che avviene in natura ed è stato utilizzato per studiare i cloni sintetici degli RNA virali ottenuti.

I migliori risultati sono stati ottenuti impiegando piantine di bietola (cv. Portland) di 10 giorni ottenute su sabbia sterile da seme sterilizzato con etanolo 70% e ipoclorito di sodio al 2%.

La fonte *in vivo* del vettore *P. betae* è stata ottenuta seminando semi di bietola sterilizzati su sabbia sterile miscelata a radici secche di bietole in cui è stata verificata la presenza del vettore e l'assenza di infezioni virali tramite reazione RT-PCR multiplex.

La sorgente d'inoculo virale *in vivo* è stata ottenuta infettando meccanicamente foglie di *C. quinoa* con miscele d'inoculo contenenti i trascritti degli RNA di BSBMV e BNYVV. Dopo 7 giorni dall'inoculo le lesioni fogliari di *C. quinoa* sono state macinate nello stesso tampone utilizzato per l'inoculo fogliare, in rapporto peso:volume 1:3. L'estratto ottenuto è stato passato in un tubo corex da 30 ml, contenente polvere di carborundo, e vi sono state immerse le radici di 20 piantine di bietola sane, private di ogni residuo di sabbia. Il tubo è stato agitato, con un agitatore meccanico, per 1 minuto e fatto riposare in ghiaccio per 5 minuti, con le radici immerse nella soluzione di inoculo. Le piantine sono state successivamente trapiantate in sabbia sterile. In particolare vaschette di plastica, di dimensioni di 10 cm x 10 cm, sono state idealmente suddivise in tre settori (Figura 3.26), in ciascuno dei settori 1 e 2 sono state trapiantate 10 piantine di bietola dopo l'inoculo radicale mentre nel settore 3 sono state trapiantate 10 piante di bietola sane.



Dopo 7 giorni dall'inoculo le piante del settore 1 sono state inoculate con un tampone innestato con *P. betae* irrorando sul colletto di ogni singola pianta 2 ml della soluzione preparata. Un ulteriore inoculo è stato effettuato a distanza di 90 minuti.

Il saggio mediante RT-PCR multiplex ha permesso di rilevare l'infezione virale e del vettore dopo 4 settimane nelle piantine del terzo settore. Dopo tale termine è possibile estirpare le piante del settore 3 e seccarne le radici all'aria. Le radici secche sono state miscelate a sabbia sterile sulla quale vengono seminati semi di bietola sterili. Le piantine che si sviluppano hanno evidenziato, mediante analisi RT-PCR multiplex, l'infezione del virus e del vettore 20 giorni dopo la semina.

3.4.2 Infezione naturale attraverso il vettore *P. betae* di radici di barbabietola da zucchero con BSBMV e BNYVV

Adottando il protocollo descritto nel paragrafo 3.6.1 sono state inoculate le radici di piantine di bietola con differenti miscele contenenti:

- A) Stras12+RNA4 BNYVV tipo B
- B) Stras12+RNA3 e 4 BNYVV tipo B
- C) PolyBSBMV
- D) Stras12+RNA3 BNYVV tipo B e RNA4 BSBMV

L'analisi RT-PCR multiplex nella fase finale del protocollo ha confermato l'infezione virale in tutte le piante saggiate evidenziando ampliconi specifici per l'RNA2 di tipo B nelle piante inoculate con le miscele A, B e D e per l'RNA2 di BSBMV per la miscela C.

CAPITOLO 4

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

4.1 Discussione

La complementazione fra segmenti di RNA provenienti da RNA virali con genoma multipartitico è considerato uno dei principali criteri per la classificazione delle specie virali (Van Regenmortel *et al.*, 1997). Nel caso del genoma tripartitico dei *Cucumovirus* gli RNA 1 e 2 codificano proteine fondamentali quali metiltransferasi, elicasi e polimerasi, e il materiale genetico può essere scambiato solo all'interno della stessa specie, quindi fra *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato aspermy virus* (TAV) e *Peanut stunt virus* (PSV), ma non fra differenti specie (Habili *et al.*, 1974; Hu *et al.*, 1998; Palukaitis *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 1981). Ciò nonostante l'RNA3 di questi virus, che codifica per le proteine del capsido e di movimento, può essere scambiato fra specie diverse (Habili *et al.*, 1974; Salanki *et al.*, 1997).

La comparazione delle sequenze fra il genoma del BSBMV e il genoma del BNYVV rivela geni essenziali conservati sull'RNA 1 e 2 e una bassa conservazione dei componenti del genoma che portano geni non essenziali (RNA 3 e 4) (Lee *et al.*, 2001).

La sequenza 3' UTR degli RNA del BSBMV è altamente conservata e comparabile con la sequenza degli RNA del BNYVV, ben caratterizzati dal punto di vista molecolare e funzionale (Bouzoubaa *et al.*, 1985, 1986).

BSBMV e BNYVV risultano molto simili dal punto di vista biologico, epidemiologico e sintomatologico ma, dal punto di vista genetico sono sufficientemente differenti da essere ascritti a due specie separate. Effetti sinergici e antagonistici delle infezioni virali sono inoltre già stati descritti per quel che riguarda BSBMV/BNYVV (Wiesler *et al.*, 2003).

In base queste osservazioni abbiamo ipotizzato una selezione dell'RNA virale conservata e un meccanismo di replicazione comune per entrambi i virus. L'elevata conservazione dei prodotti codificati dall'RdRp degli RNA 1 di BNYVV e BSBMV ha creato il presupposto per cui il complesso della replicazione del BNYVV e del BSBMV potesse replicare gli RNA dell'altro virus.

Queste informazioni ci hanno convinto che lo studio incrociato di BSBMV e BNYVV, sfruttandone le reciproche somiglianze e divergenze, possa

permettere di acquisire importanti informazioni per comprendere i meccanismi biochimici che si trovano alla base delle interazioni fra il virus e l'ospite.

La nostra ricerca si è perciò concentrata sull'ottenimento di cloni cDNA infettivi, degli RNA che compongono il genoma di BSBMV e BNYVV, per poter creare un sistema "sintetico", ben caratterizzato cioè da un punto di vista molecolare. Inserendo variabili note in tale sistema, come ad esempio mutazioni puntiformi specifiche nei geni virali coinvolti nella replicazione e/o nell'espressione dei sintomi, si potranno estrapolare informazioni essenziali per lo studio delle interazioni bio-molecolari che avvengono tra i due virus e la pianta ospite.

Numerose difficoltà, superate grazie all'impiego di diverse strategie di clonaggio, sono state incontrate durante la produzione dei cloni cDNA degli RNA 1 e 2, sia di BSBMV sia di BNYVV. L'instabilità del cDNA virale inserito in un vettore plasmidico batterico è stata infatti osservata in diversi processi per la produzione di cloni cDNA completi, per la trascrizione *in vitro* di RNA infettivi, di virus a singolo filamento positivo di RNA (Miyanishi *et al.*, 2002).

I trascritti ottenuti, a partire dai cloni LB160 e LB157 (RNA 1 e 2 di BSBMV rispettivamente) e dal clone LBS31 dell'RNA1 di BNYVV tipo P si sono dimostrati non replicativi e non infettivi *in planta*. Tali osservazioni, alla luce del fatto che le regioni 3' e 5' UTR del genoma di BNYVV intervengono in maniera decisiva nel meccanismo della replicazione virale (Gilmer *et al.*, 1992, 1993 e Lauber *et al.*, 1997) suggeriscono che i cloni fino ad ora ottenuti presentino una o più sostituzioni nucleotidiche, nelle regioni 3' e/o 5' UTR, che non ne permettono la replicazione. L'analisi delle sequenze dei cloni ottenuti, allineate con le rispettive sequenze pubblicate (Appendici B1, B3 e B4), hanno infatti evidenziato un basso numero di sostituzioni o delezioni nucleotidiche.

Precedenti studi, che hanno portato alla sintesi dei cloni completi infettivi degli RNA 1 e 2 di BNYVV di tipo B, hanno già evidenziato che una singola sostituzione nucleotidica può compromettere la funzionalità biologica dell'RNA virale (Jupin *et al.*, 1988). Risulta però particolarmente difficile discriminare sostituzioni nucleotidiche dovute alla naturale variabilità genetica del virus, da alterazioni della sequenza verificatesi durante il clonaggio. Tale discorso risulta particolarmente vero per il BNYVV tipo P del quale la bibliografia manca di una

sequenza completa dell'RNA1 e, prima del presente lavoro, dell'RNA2, ma anche per quel che riguarda BSBMV di cui si dispone della sequenza nucleotidica di un solo isolato (Lee *et al.*, 2001). Per questo motivo le sequenze dei cloni dell'RNA 1 e 2 di BNYVV tipo P sono state allineate con le sequenze complete degli RNA 1 e 2 di BNYVV di tipo A (NC_003514) e tipo B (gentilmente fornita dal Prof. D. Gilmer) e l'identità e il numero di sostituzioni sono state calcolate riferendosi alla sequenza di tipo A, a cui gli isolati di tipo P risultano molto simili (Rush, 2003).

I cloni LB160 e LB157 presentano diverse differenze nucleotidiche rispetto alle sequenze dell'isolato di Lee *et al.* (2001) che, non essendo state corrette da reazioni di RT-PCR, che amplificano specificatamente la sola porzione 5' degli

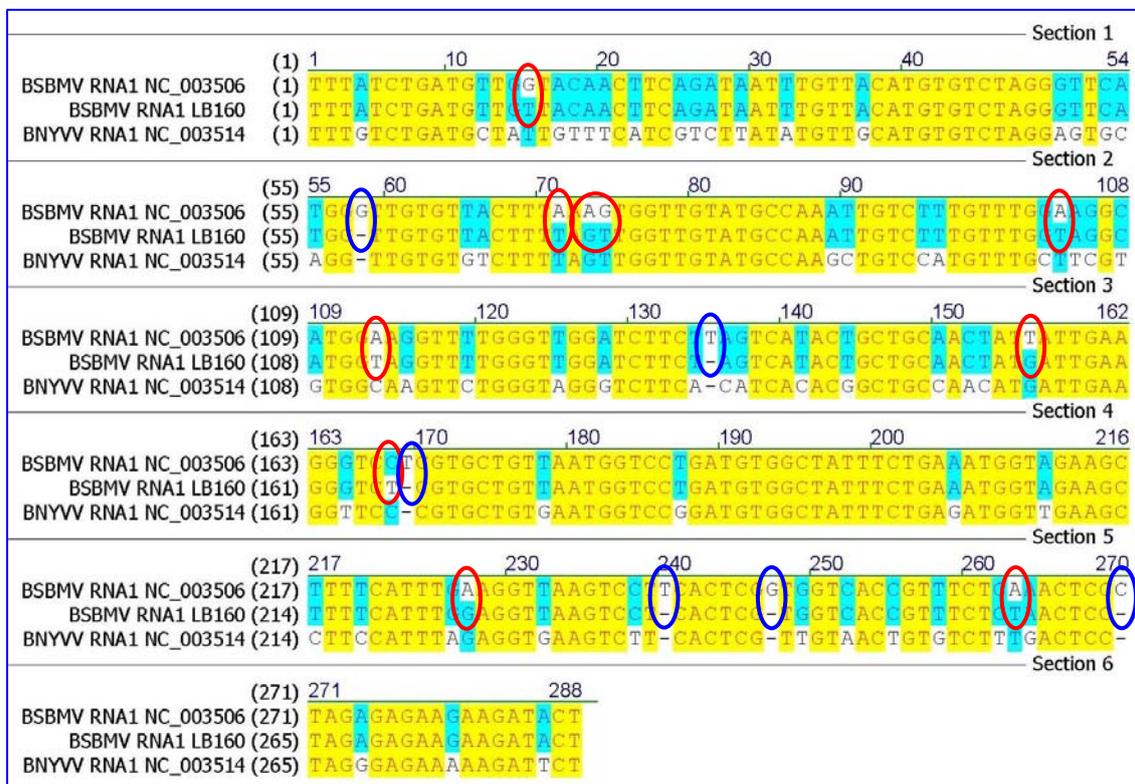


Figura 4.1. Allineamento della regione 5' UTR (nucleotidi da 460 a 741) del clone LB160 e degli RNA1 di BSBMV (NC_003506) e di BNYVV (NC_003514). Le ellissi indicano le divergenze fra la sequenza del clone LB160 e la sequenza NC_003506 che trovano corrispondenza nella sequenza NC_003514. Le sostituzioni sono indicate in rosso e le delezioni in blu.

RNA 1 e 2 di BSBMV, si suppone siano dovute alla variabilità genetica tra gli isolati virali. Un discorso a parte deve essere fatto per il clone LB160 la cui sequenza mostra la maggior parte delle differenze nucleotidiche, rispetto a quella dell'RNA1 di BSBMV (NC_003506), comprese tra i nucleotidi 460 e 741. La

maggior parte di tali differenze trovano sorprendentemente corrispondenza nella sequenza dell'RNA1 di BNYVV tipo A (NC_003514) (Figura 4.1). L'identità di sequenza del clone LB160 aumenta infatti dal 76,8% al 77,0 % nei confronti, rispettivamente, delle sequenze NC_003506 e NC_003514. Tale osservazione suggerisce, oltre alla validità del clone LB160, la possibilità che la sequenza NC_003506 sia stata soggetta a problemi di instabilità dell'inserito cDNA durante le fasi di clonaggio in accordo a quanto riportato, proprio nella regione codificante l'enzima metil-transferasi, durante il tentativo di clonazione dell'RNA1 del virus del mosaico comune del frumento (*Soil-borne cereal mosaic virus*, SBCMV) trasmesso da *Polymyxa graminis* (Miyanishi *et al.*, 2002).

Anche la sequenza dell'RNA2 di BSBMV riportata da Lee *et al.* (2001), su cui ci si è basati per costruire il clone LB157, presenta una particolare discordanza nei primi due nucleotidi (GG) della regione 5' UTR rispetto ai nucleotidi AA che mostrano le sequenze pubblicate degli altri RNA di BSBMV e di BNYVV.

Per individuare quali, tra le sostituzioni evidenziate, determinano la non infettività dei nostri cloni si procederà apportando correzioni puntiformi tramite mutagenesi per PCR e verificando l'infettività del clone *in planta* (Appendice A).

A conferma della difficoltà nel definire la corretta sequenza dei nostri cloni, il clone dell'RNA2 di BNYVV tipo P (LBS22) è risultato essere infettivo nonostante presenti ben 50 sostituzioni rispetto alla sequenza dell'RNA2 di BNYVV tipo A pubblicata (NC_003515).

L'inoculo meccanico dell'RNA trascritto dal clone LBS22, su foglie di *C. quinoa* in presenza:

- del trascritto dell'RNA1 di BNYVV tipo B,
- dell'isolato Stras12 (RNA 1 e 2 tipo B)
- dell'isolato PolyBSBMV

ci ha permesso di dimostrare, rispettivamente, per la prima volta che:

- l'RdRp dell'RNA1 di BNYVV tipo B è in grado di riconoscere e replicare in maniera efficiente il trascritto dell'RNA 2 di BNYVV tipo P.
- non c'è competizione nella replicazione tra l'RNA2 di BNYVV tipo B e l'RNA2 di BNYVV tipo P.

- l'RNA2 di BNYVV tipo P è riconosciuto e replicato dalla RdRp dell'RNA1 di BSBMV e non compete per la replicazione con l'RNA2 di BSBMV.

I risultati appena evidenziati rivestono particolare importanza nell'ottica dello studio incrociato dei due virus, in quanto dimostrano per la prima volta l'esistenza di una attiva interazione in pianta sia tra diversi tipi del BNYVV sia tra questi e il BSBMV e, di conseguenza, la possibile esistenza di meccanismi comuni di riconoscimento da parte dell'ospite.

La presente ricerca si è focalizzata anche sulle specie dell'RNA3 in quanto le strutture UTR all'estremità 5' e 3' dell'RNA3 di BNYVV sono state ben caratterizzate (Gilmer *et al.*, 1993; Lauber *et al.*, 1997). Su entrambe le specie di RNA3 la regione 3' UTR presenta infatti delle sequenze altamente conservate con mutazioni compensative in grado di permettere la formazione delle strutture secondarie necessarie per l'inizio della trascrizione (Figura 3.7). Interessante è che questa analisi ha permesso di confermare l'esistenza delle interazioni ipotizzate fra ¹⁷¹¹AAGA¹⁷¹⁴ e ¹⁷⁵⁵UCUU¹⁷⁵⁸ presenti sull'RNA3 di BNYVV (Figura 3.7) visto che le sequenze compensative ¹⁶⁵⁷GUAU¹⁶⁶⁰ e ¹⁷⁰¹GUAC¹⁷⁰⁴ sono state identificate nell'RNA 3 di BSBMV. Nella regione 5' UTR dell'RNA3 di BSBMV sono state rinvenute sequenze ripetute, invertite (Boxes) contenenti variazioni compensative di basi. Questi Boxes mantengono l'appaiamento delle basi e partecipano alla replicazione e all'incapsidazione dell'RNA3 di BNYVV (Gilmer *et al.*, 1993, 1992). Le nostre analisi ci hanno permesso di concludere che le regioni UTR dell'RNA3 di BSBMV possiedono strutture secondarie molto simili a quelle presenti nelle regioni UTR dell'RNA3 di BNYVV. Il rinvenimento della progenie dell'RNA3 di BSBMV dopo l'inoculo del clone completo trascritto *in vitro* in presenza dello Stras12 dimostra che l'RdRp del BNYVV è in grado di replicare l'RNA3 di BSBMV. Inoltre l'RNA3 del BSBMV viene anche incapsidato dalla proteina capsidica del BNYVV e promuove il movimento sistemico delle particelle di BNYVV in *B. macrocarpa* (Tabella 3.2). Fino ad ora, infatti, il determinante essenziale per il movimento vascolare è stato assegnato ad una regione dell'RNA3 di BNYVV, la core region, escludendo il ruolo di ogni prodotto genico dell'RNA3 (Lauber *et al.*, 1998). Di conseguenza abbiamo supposto che un motivo simile a questa core region fosse presente anche sull'RNA3 di BSBMV, in quanto in grado di determinare il movimento sistemico

del BNYVV in *B. macrocarpa*. L'allineamento dei cloni completi degli RNA 3 di BNYVV e BSBMV ha rivelato una identità nuclotidica del 61% e una sequenza di 20 bp (5'-GUCCGAAGACGUUAAACUAC-3') conservata in entrambi gli RNA (posizione 1236-1255 e 1237-1256 per RNA3 di BNYVV e BSBMV rispettivamente) chiamata 'coremin'. Abbiamo identificato la sequenza coremin nell'RNA5 di BNYVV, nell'RNA4 di BSBMV e in altre specie virali appartenenti al genere *Cucumovirus*: nell'RNA3 del CMV e del TAV. Interessante è che tale sequenza è presente sulla sequenza 5' leader del CMV, sugli RNA subgenomici del TAV (Blanchard *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1997) e nella sequenza 5' leader dell'RNA3 subgenomico di BNYVV (Balmori *et al.*, 1993). Tutto ciò sottolinea l'importante ruolo della sequenza coremin nell'interazione pianta virus ed in particolare per le infezioni sistemiche dei virus, come suggerito anche dai nostri risultati (Tabella 3.2).

L'infezione sistemica è risultata più efficiente per BNYVV (RNA 1-3) o BSBMV (RNA 1-4) piuttosto che per Stras12 inoculato con l'RNA 3 di BSBMV. In altri termini si è osservato che lo stesso RNA3 di BSBMV è in grado di indurre sintomatologie sistemiche di forte entità qualora si trovi in presenza degli RNA 1 e 2 di BSBMV ma sintomatologie lievi quando è co-inoculato con gli RNA 1 e 2 di BNYVV.

Tale differenza potrebbe essere collegata alla presenza di due motivi coremin in BSBMV (RNA 3 e 4) e l'elevato accumulo dell'RNA3 di BNYVV potrebbe compensare la mancanza di una seconda sequenza coremin. Interessante è che gli isolati di BNYVV che contengono tutti i 5 RNA possiedono anche una seconda regione coremin, fatto che potrebbe spiegare la loro maggiore aggressività in barbabietola da zucchero (Buttner *et al.*, 1990).

Tale ipotesi non può comunque escludere la presenza di altri motivi strutturali sull'RNA 1 e/o 2 di BNYVV che possono essere implicati nel movimento sistemico. La sequenza completa della "Core Region" di un isolato di BNYVV è stata infatti clonata in Rep3 ed in RepIII. I risultati dell'inoculo di tali cloni con l'isolato Stras12 su piante di *B. macrocarpa* hanno permesso di escludere che la "Core Region" abbia un ruolo "solista" nello sviluppo di sintomi sistemici.

Ciononostante i sintomi sistemici di Stras12 inoculato con l'RNA3 di BSBMV confermano che quest'ultimo è transincapsidato da parte della CP di BNYVV, come richiesto per il movimento a lunga distanza di BNYVV (Quillet *et al.*, 1989).

Lavori precedenti hanno riportato l'utilizzo di repliconi dell'RNA 3 e 5 di BNYVV come vettori di espressione (Bleykasten *et al.*, 1997; Schmidlin *et al.*, 2005). Il clone dell'RNA3 di BSBMV è servito per produrre un nuovo vettore virale, RepIII, che è stato impegnato per esprimere con successo le proteine GFP e RFP (Figura 3.17). La co-espressione di proteine utilizzando due repliconi derivanti dagli RNA 3 determina la perdita di competitività di una delle molecole di RNA3 all'interno della lesione locale (Lauber *et al.*, 1999) ad eccezione di quando entrambe le sequenze codificate dai repliconi sono richieste per un ciclo di replicazione efficiente (Lauber *et al.*, 1998). La co-espressione di proteine richiede perciò la presenza di molecole derivate dall'RNA3 di BSBMV e dall'RNA5 di BNYVV (Schmidlin *et al.*, 2005). La coinoculazione dei repliconi derivati dal BSBMV e dal BNYVV, insieme a Stras12, rivela una forte competizione fra gli RNA3, ma non con l'RNA5. Questa situazione suggerisce la stretta relazione fra i promotori della replicazione di ambo gli RNA 3 che risulta minore con quelli dell'RNA5, anche se l'RNA3 di BSBMV codifica la proteina p29 che è risultata molto più simile alla p26 codificata dall'RNA5 piuttosto che alla p25 codificata dall'RNA3 di BNYVV.

La competizione dell'RNA3 è espressa o dalla replicazione esclusiva e quindi selezione dei componenti parentali dell'RNA3 di BNYVV legata alla perdita degli RNA di BSBMV (ad esempio il trascritto dell'RNA3 di BNYVV o di Rep3 esclude il trascritto dell'RNA3 di BSBMV e di RepIII), o dalla replicazione di uno dei repliconi derivati dall'RNA3, conducendo alla casuale selezione dell'RNA e all'espansione settoriale della specie virale. Quest'ultima mancanza di pressione selettiva fra i repliconi derivati dall'RNA3 di BNYVV e BSBMV suggerisce la presenza di elementi *cis* sull'RNA3 di BSBMV e BNYVV che possono favorire il riconoscimento e/o la replicazione. Quando RepIII-GFP e RepIII-RFP sono miscelati insieme, entrambe le molecole vengono replicate. L'espressione dell'RFP risulta però inferiore (Figura 3.17) e tendenzialmente espressa nell'infezione tardiva al centro della lesione, mentre GFP viene

espressa nell'intera lesione (Figura 3.17). Questa situazione potrebbe perciò essere spiegata dalla replicazione di entrambi i vettori RepIII nelle fasi iniziali dell'infezione e nella selezione del componente RNA di RepIII-GFP. La ragione di tale selezione potrebbe essere dovuta ad alcune strutture dell'RNA più compatibili per la replicazione presenti in RepIII-GFP piuttosto che in RepIII-RFP. Effettivamente, sequenze presenti su entrambe le regioni 5' e 3' UTR si sono dimostrate in grado di facilitare o interferire con l'accumulo *in planta* di Rep3 (Lauber *et al.*, 1999).

Durante la presente ricerca abbiamo altresì supposto che l'RNA4 del BSBMV potesse essere replicato dal complesso della replicazione del BNYVV.

Il clone LB155 ottenuto si presenta con una lunghezza di 1767 nucleotidi e mostra, rispetto alla sequenza di riferimento pubblicata NC_003508, 630 nucleotidi in più, precisamente dal nucleotide 689 al 1219 con un'identità di sequenza nucleotidica del 69,1%. In termini di dimensioni e di organizzazione genomica la sequenza del clone LB155 risulta inoltre maggiormente simile a quella dell'RNA4 di BNYVV (NC_003517) nonostante l'identità nucleotidica risulti pari al 51,8% (Appendice B6).

A seguito dell'inoculo meccanico, in presenza dell'isolato Stras12, su foglie di *C. quinoa* del clone completo trascritto *in vitro* è stato dimostrato che l'RdRp del BNYVV è in grado di replicare anche l'RNA4 di BSBMV e che inoltre quest'ultimo viene transincapsidato dalla proteina capsidica del BNYVV.

La presenza dell'RNA4 di BNYVV è essenziale nella trasmissione tramite il vettore naturale *P.betae*, ma interviene anche nella comparsa dei sintomi (Rahim *et al.*, 2007). A seguito dell'inoculo meccanico di foglie di *C. quinoa* con una miscela contenente Stras12 e il trascritto del clone LB155 sono state osservate lesioni clorotiche caratterizzate dalla presenza di un anello necrotico (Figura 3.14), questa sintomatologia, differente da quella determinata dal solo Stras12 ci ha permesso di dimostrare per la prima volta che anche l'RNA4 di BSBMV interviene nell'induzione dei sintomi.

Il reinoculo meccanico di BNYVV su piante ospiti come *C. quinoa* ha permesso di evidenziare, in alcuni casi, la scomparsa degli RNA accessori (RNA 3 e/o 4) o la formazione di acidi ribonucleici deleti derivanti dagli RNA3 e RNA4 del BNYVV. Lo studio di tali forme delete ha permesso di acquisire

nuove conoscenze sulla funzionalità del genoma virale della rizomania (Bouzouba *et.al.*, 1991). In base a queste informazioni si può ipotizzare che l'isolato rinvenuto da Lee *et al.* (2001) potrebbe consistere in una forma deleta dell'RNA4, nonostante esso sia stato ritrovato, di dimensioni identiche, anche nelle estrazioni effettuate a partire da foglie di *B. vulgaris*.

Per questo motivo una parte della nostra ricerca ha indagato il comportamento degli RNA3 e 4 di BSBMV in seguito ad inoculi meccanici seriali su *C. quinoa*.

I dati raccolti durante i 55 inoculi seriali eseguiti non hanno evidenziato forme delete dell'RNA3 ma hanno permesso di rilevare la comparsa, al 14° reinocolo, di una forma deleta dell'RNA4 di BSBMV di 1310 bp esclusa la coda di poly(A), che presenta un'identità nucleotidica dell'83,6% con la sequenza pubblicata NC_003508. Al 21° reinocolo è scomparsa la forma deleta dell'RNA4 ed è comparsa una forma chimerica, un acido ribonucleico formato cioè dall'estremità 5' dell'RNA4 e dall'estremità 3' dell'RNA3 di BSBMV. La ricombinazione è un fenomeno frequente nei virus ad RNA, specialmente come risultato largamente influenzato dalla pressione selettiva. La chimera selezionatasi nelle condizioni di reinocolo si è mantenuta inalterata fino al 55° passaggio rivelandosi perciò una stabile risposta alla pressione selettiva a cui il virus è stato sottoposto.

Sulla sequenza della chimera sono state individuate due ipotetiche ORF in grado di codificare due ipotetiche proteine: p7 e p9. I risultati ottenuti esprimendo e inoculando in *C. quinoa* cloni della chimera fusi con la proteina HA suggeriscono la non funzionalità degli ipotetici ORF identificati. È stato però stato dimostrato che il clone dell'RNA chimerico viene replicato *in planta* indicando un possibile coinvolgimento della sola sequenza nucleotidica nel ciclo infettivo del virus senza produzione di alcuna proteina virale. Non si può però escludere che la causa della mancata espressione delle proteine p7HA e p9HA sia da imputare ad eventuali modifiche subite, in seguito all'inserimento della sequenza HA, dalla struttura secondaria dell'RNA e dei relativi siti di inizio della traduzione.

Infine, a completamento del sistema di studio che la presente ricerca ha costruito, si è resa necessaria la messa a punto di un protocollo che permetta di

trasferire i cloni ottenuti alle zoospore di *P. betae*. In questo modo sarà possibile studiare e verificare il comportamento dei virus sintetici in condizioni di inoculo naturali, mediate perciò dal protozoo vettore.

La piena funzionalità del protocollo ideato è stata verificata mediante infezione di *P. betae* con diverse miscele di RNA di BNYVV e BSBMV (Stras12+RNA4 BNYVV tipo B; Stras12+RNA3 e 4 BNYVV tipo B; PolyBSBMV; Stras12+RNA3 BNYVV tipo B e RNA4 BSBMV). Contemporaneamente è stato dimostrato, per la prima volta, che l'RNA4 di BSBMV è in grado di mediare la trasmissione attraverso *P. beate* degli RNA 1, 2 e 3 di BNYVV confermando la stretta relazione esistente fra i due virus oggetto di studio.

4.2 Conclusioni

La nostra ricerca ha raggiunto lo scopo prefissosi, ha prodotto infatti una collezione di cloni cDNA degli RNA di BNYVV e di BSBMV che, insieme al lavoro di precedenti gruppi di ricerca (Jupin *et al.*, 1988; Ziegler Graff *et al.*, 1988), permette la sintesi di copie sintetiche di entrambi i Benyvirus. Le difficoltà incontrate nel produrre i cloni LB160, LB157 e LBS31, non superate da altri gruppi di ricerca (Miyanishi *et al.*, 2002), ne hanno però ritardato il completamento. Tali cloni saranno resi infettivi tramite mutagenesi puntiforme specifica che verrà attuata in base alle sequenze ottenute.

Oltre a ciò la ricerca ha dimostrato, per la prima volta, la capacità degli RNA1 e 2 di BNYVV (Stras 12) di trans-replicare ed incapsidare l'RNA3 e l'RNA4 del BSBMV, e degli RNA 1 e 2 di BSBMV di replicare l'RNA2 di BNYVV verificando la stretta correlazione tra i due virus. Inoltre, l'RNA3 del BSBMV rende possibile il movimento sistemico degli RNA 1 e 2 di BNYVV inoculati in piante di *B. macrocarpa*. Siamo riusciti a produrre con successo un nuovo vettore virale (RepIII), derivato dalle regioni non codificanti dell'RNA3 del BSBMV, che ha consentito l'espressione delle proteine p29HA, GFP e RFP in piante di *C. quinoa*.

Abbiamo dimostrato che la "Core Region" non è l'unico dominio fondamentale per il movimento sistemico in *B. macrocarpa* del BSBMV e BNYVV: esistono altre regioni del genoma virale, forse localizzate sull'RNA1 o sull'RNA2, in grado di interagire positivamente tra loro consentendo il movimento sistemico del virus.

Gli effetti competitivi in una infezione mista di BNYVV/BSBMV in barbabietola sono stati descritti da Wisler *et al.* (2003), l'infezione di BNYVV riduce l'accumulo di BSBMV sia nelle specie suscettibili sia resistenti di barbabietola da zucchero. Nello stesso articolo gli autori menzionano la possibile competizione per un fattore cellulare necessario per formare i complessi di replicazione. Le nostre analisi non sono sufficienti per investigare questa ipotesi ma apportano nuove conoscenze a riguardo. Il complesso di replicazione di BNYVV è infatti in grado di replicare l'RNA3 di BSBMV, tale replicazione diviene però impossibile in presenza dell'RNA3 di BNYVV. Ne consegue che se l'RNA3 di BSBMV è necessario per adempire il ciclo virale di BSBMV, ci si

dovrebbe aspettare un calo del contenuto virale di BSBMV in infezione mista. Questa ipotesi potrebbe essere ripresa per le altre specie di RNA virali e questo spiegherebbe la maggior virulenza di BNYVV nelle piante. Nello stesso studio l'accumulazione preferenziale di BSBMV è descritta in un solo caso (Wisler *et al.*, 2003). In tale situazione sfavorevole sarebbe possibile la ricombinazione fra le due specie virali che condurrebbe ad un nuovo genotipo di virus non ancora descritto.

Di particolare interesse risulta il fatto che i sintomi indotti dall'RNA3 di BSBMV sulle foglie di *C. quinoa* sono risultati molto più simili alle lesioni locali necrotiche causate dalla p26, codificata dall'RNA5 di BNYVV, piuttosto che ha quelle clorotiche causate dalla p25 codificata dall'RNA3 di BNYVV. Come precedentemente riportato l'identità della sequenza amminoacidica fra p29 di BSBMV e p25 di BNYVV è del 23% (Lee *et al.*, 2001), ma questa identità cresce al 43% se comparata con la sequenza della p26 codificata dall'RNA5 di BNYVV. Questa ragione può spiegare la similitudine dei sintomi indotti dalla p29 e dalla p26, ma altri studi sono necessari per scoprire le proprietà funzionali della p29 di BSBMV e compararle con quelle della p26 di BNYVV (Link *et al.*, 2005).

È stata ottenuta una forma chimerica, derivata dalla fusione dell'estremità 5' dell'RNA4 ed estremità 3' dell'RNA3 di BSBMV, come risposta alla pressione selettiva ad inoculi meccanici seriali su *C. quinoa* del BSBMV "wild-type". Tale RNA chimerico sembra non esprimere alcuna proteina ma, essendo replicato e trascritto *in planta*, potrebbe rappresentare un importante strumento di studio per acquisire nuove conoscenze sulle interazioni *Benyvirus* – pianta.

In conclusione sono stati prodotti diversi strumenti, tra cui un sistema per l'analisi in condizioni naturali di inoculo tramite *P. betae*, e ottenute nuove conoscenze che permetteranno di affrontare i futuri esperimenti volti a investigare, sfruttando le loro somiglianze e divergenze, le interazioni molecolari fra BNYVV e BSBMV in barbabietola da zucchero.

APPENDICI

Appendice A. Sequenza nucleotidica dei primers utilizzati nella ricerca.

Nome	Sequenza	Regione	Accession number genbank o sequenza di riferimento
Primers utilizzati per l'ottenimento dei cloni			
BSBMV RNA1			
BSBMV1 NotI T7 F	AAAGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGAAATCTCTCCATTCGCCATCATTGAATCGTT	0-32	NC_003506
OligodT21 VN MluI	AAAACGCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV	poly(A)	NC_003506
BSBMV RNA2			
BSBMV2 NotI T7 F	AAAGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGGGATTCTAATTATTATCTCCATTGAATAGAA	0-31	NC_003503
BSBMV2 XmaI R	CTTTCAGTCTCCCGGCATAC	1794-1815	NC_003503
BSBMV2 XmaI F	GAGCGTATGCCGGGAAGAC	1790-1809	NC_003503
BSBMV2 Xba F	AAATGTCTAGAGAAATAACGGCCCGTGC	3271-3298	NC_003503
BSBMV2 XbaI R	AAATGCAGTCTAGACATTATCTATCTCCTCGAAAAGG	3254-3290	NC_003503
OligodT21 VN BglII	AAAAGATCTTTTTTTTTTTTTTTTTV	poly(A)	NC_003503
BSBMV RNA3			
BSBMV3 EcoRI T7 F	AAAGAATTCTAATACGACTCACTATAGAAATTTAAATCTATACCACATTAGGTATTAATTTATTCG	0-40	NC_003507
OligodT21 HindIII	AAAAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT	poly(A)	NC_003507
BSBMV RNA4			
BSBMV4 NotI T7 F	AAAGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGAAATCAAAACTCAAAAATAAATTTGTATTCC	0-35	NC_003508
OligodT21 BglII	AAAAGATCTTTTTTTTTTTTTTTTTV	poly(A)	NC_003508
BNYVV RNA1			
409-RNA1 F5NotI	AAAAGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGGAAATTCGATTCTTC	0-15	NC_003514
RNA1 R2	ACCACCAATGAACCATGC	1527-1545	NC_003514
409-RNA1 F1403	GGTTGCATTGTTCG	1403-1417	NC_003514
409-RNA1 R4750	CGTCGACATTCGACCCGGCCG	4730-4750	NC_003514
409-RNA1 F4512	GCAATCGTGGGCTAATGTGG	4512-4531	NC_003514
BNYVV 409-RNA1-R3	TTTTAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTATATCAATATACTGATAG	poly(A)	NC_003514
BNYVV RNA2			
409-RNA2 F5NotI	AAAAGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGGAAATCTAACTATTA	0-15	NC_0053515
RNA2 R107	AATTTGCCCAATCCGCAATGTCCGGG	2313-2338	NC_0053515
409-RNA2-F1823	CTGGTATACAAGGTGGCGCGC	1823-1843	NC_0053515
BNYVV 409-RNA2-R3	TTTTAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTCAATATACTGAAAACAG	Poly(A)	NC_0053515
Core region (BNYVV RNA3)			
BNYVV3 CoreF NcoI	AAAACCATGGTATGCAGGTGATGTTTAGATG	1023-1054	NC_003516
BNYVV3 CoreR BamHI	AAAGGATCCACGTGTAGTTAACCTCTTCG	1237-1266	NC_003516
p7 e p9 (chimera)			
BSBMVp9F	AAA CCA TGG CTG CAG TCG TAT ATT TGA GGG TGG	1201 - 1218	LB89
BSBMVp9PstI HA R	AAA CTG CAG TCA TGC ATA ATC AGG AAC ATC ATA AGG ATA ATG TGC GAG GAA CAC ATC ATT C	1176 - 1197	LB89
BSBMVp7F	AAA CTG CAG ATG GTG AAA ACA TTG ACG	973 - 990	LB89
BSBMVp7PstI HA R	AAA CTG CAG TCA TGC ATA ATC AGG AAC ATC ATA AGG ATA ACA AAT ATC ACG ACG ACG AAT C	949 - 970	LB89
primers sfruttati per la correzione dei cloni e la mutagenesi			
BSBMV RNA1			
BSBMV1R10	AAACGCGTAAAAATGATCCGG	1304-1317	NC_003506
BSBMV1R11	AAACGCGTACCAGTGAAGGACTTAACC	688-707	NC_003506
BSBMV1F10	CTTCACCTCGGTGGTCCAGCTTTCTCAAACCTCCCT	697-730	NC_003506
BSBMV1R12	GAAACGGTGACCCAGGATGAAAGGACTTAACCTTC	685-719	NC_003506
BSBMV1F11NotI	AAAGCGGCCGCTCTCATATGTTCTGTGCAC	5825-5843	NC_003506
BNYVV RNA1			
409-F1 Mut	AGGCGACCGGTGCGCAG	1418-1434	NC_003514
409-R2 Mut	GTGGACGTGGTTATTTGATA	2313-2332	NC_003514
409-F3 Mut	AAT GAA AAA GGG TAT CAC ATG GGC AGA	2226-2252	NC_003514
409-R4 Mut	AGC CTT CAA CCT ATC TGC CCA TG	2243-3365	NC_003514
Primers sfruttati per la sintesi delle sonde northern blot			
BSBMV1Fprobe	GGGTAATACTATTTAATGGGTGC	5887-5910	NC_003506
BSBMV2Fprobe	TGATATCCAAAATATGTGGC	3801-3821	NC_003503
BSBMV3Fprobe	GGTGAAAATATCCGTCTGC	923-942	NC_003507
BSBMV4Fprobe	GCTTATTGCTCTGGTATCTGC	926-946	LB155
BSBMV45Fprobe	CAAAACTCAAAAATAAATTTGTATTTC	579-603	LB155
BSBMV1RProbe	TTTAAATACACTGATAGCAAACCC	6659-6682	NC_003506
BSBMV2RProbe	TATAAACTGAAAATAAACCTTACAAGG	4589-4616	NC_003503
BSBMV3RProbe	TCTTCATATACTGAAGGTACACCC	1697-1720	NC_003507
BSBMV4RProbe	CATAAACTGAAAATACACCTTACAAG	1704-1730	LB155
BSBMV45Rprobe	ACATCAACAGAAACATTAATAGACG	579-603	LB155
BNYVV1FProbe	GATGATGGTTTTAAAGGCAG	5947-5967	NC_003514
BNYVV2FProbe	GAGTTGCGATATTTCAAAGC	3806-3825	NC_0053515
BNYVV3FProbe	CACGGTTAATTGTGTGTACG	972-992	NC_003516
BNYVV1RProbe	CAATATACTGATAGTAAACCTTTAACG	6715-6742	NC_003514
BNYVV2RProbe	TGAAAACAGACCTACATGG	4582-4601	NC_0053515

									Section 37	
	(2773)	2773	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2849	
BNYVV RNA1 NC_003514	(2773)	GGTTCTCAAGTTGTTGAATGCAGATGGAAAAGCTGAGTCTATGTATACATTTTCTATGTCACAAACTGAGGTTGATGA								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(2773)	GGTTCTCAAGTTGTTGAATGCAGATGGAAAAGCTGAGTCTATGTATACATTTTCTATGTCACAAACTGAGGTTGATGA								
									Section 38	
	(2850)	2850	2860	2870	2880	2890	2900	2910	2926	
BNYVV RNA1 NC_003514	(2850)	FTTTAGAAATGAGATTAAGGCTCAATCTATTGAAAAGGGGAAATCGTTTTGGTGAAATGTTAATAGGTGTACATCAGA								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(2850)	FTTTAGAAATGAGATTAAGGCTCAATCTATTGAAAAGGGGAAATCGTTTTGGTGAAATGTTAATAGGTGTACATCAGA								
									Section 39	
	(2927)	2927	2940	2950	2960	2970	2980	2990	3003	
BNYVV RNA1 NC_003514	(2927)	AAATTCCTACACAAGCCTTTGAGGTTTCAGTTCGACTCGAATATGTTAAAGGTGGGCCTGGTACGGGTAAATCTTTT								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(2927)	AAATTCCTACACAAGCCTTTGAGGTTTCAGTTCGACTCGAATATGTTAAAGGTGGGCCTGGTACGGGTAAATCTTTT								
									Section 40	
	(3004)	3004	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080
BNYVV RNA1 NC_003514	(3004)	CTTATAAGATCATTGGCTGACCCATCAGGGATCTTGTGGTGGCTCCGTTTCAAAAATGCGTCTGATTATCAGAA								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(3004)	CTTATAAGATCATTGGCTGACCCATCAGGGATCTTGTGGTGGCTCCGTTTCAAAAATGCGTCTGATTATCAGAA								
										Section 41
	(3081)	3081	3090	3100	3110	3120	3130	3140	3157	
BNYVV RNA1 NC_003514	(3081)	TCAACGAGTTGGTGTGAGCTTCTTTCTGGGACTTTCACACGCCTCACAAAGCATTGGATGTTACTGGTAAGCAAA								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(3081)	TCAACGAGTTGGTGTGAGCTTCTTTCTGGGACTTTCACACGCCTCACAAAGCATTGGATGTTACTGGTAAGCAAA								
										Section 42
	(3158)	3158	3170	3180	3190	3200	3210	3220	3234	
BNYVV RNA1 NC_003514	(3158)	TTATTTTGTGGTGTGAGTTTACAGCCTATGATTGGCGTTTACTAGCTGTGTGGCTTATAGAAATCATGCCCATACT								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(3158)	TTATTTTGTGGTGTGAGTTTACAGCCTATGATTGGCGTTTACTAGCTGTGTGGCTTATAGAAATCATGCCCATACT								
										Section 43
	(3235)	3235	3240	3250	3260	3270	3280	3290	3300	3311
BNYVV RNA1 NC_003514	(3235)	ATTTACTTAGTTGGTGTGAGCAGCAGACTGGTATTCAAGAGGGTCTGGGAGAAGGAATATCGATACCTAACAAAGT								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(3235)	ATTTACTTAGTTGGTGTGAGCAGCAGACTGGTATTCAAGAGGGTCTGGGAGAAGGAATATCGATACCTAACAAAGT								
										Section 44
	(3312)	3312	3320	3330	3340	3350	3360	3370	3388	
BNYVV RNA1 NC_003514	(3312)	TGATCTGTCTAAGGTTTCTACACATGTTCCAATCATGAACCTTAGAAATCCTGTCCGTTGATGTTAAGGTATTAAGTT								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(3312)	TGATCTGTCTAAGGTTTCTACACATGTTCCAATCATGAACCTTAGAAATCCTGTCCGTTGATGTTAAGGTATTAAGTT								
										Section 45
	(3389)	3389	3400	3410	3420	3430	3440	3450	3465	
BNYVV RNA1 NC_003514	(3389)	ATCTGTTTGGGTCTCGTATGGTTCCTATGCTTCCGTTGAAAAGGGATTTAGTTTCCGGGATGTTAAAGAATTTTCG								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(3389)	ATCTGTTTGGGTCTCGTATGGTTCCTATGCTTCCGTTGAAAAGGGATTTAGTTTCCGGGATGTTAAAGAATTTTCG								
										Section 46
	(3466)	3466	3480	3490	3500	3510	3520	3530	3542	
BNYVV RNA1 NC_003514	(3466)	TCTTTGTCAAAATATCCCAGACACTAAAATCATTCATTATCCGATGAGACTGGTGAACATATGATGCCTGATTACGT								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(3466)	TCTTTGTCAAAATATCCCAGACACTAAAATCATTCATTATCCGATGAGACTGGTGAACATATGATGCCTGATTACGT								
										Section 47
	(3543)	3543	3550	3560	3570	3580	3590	3600	3619	
BNYVV RNA1 NC_003514	(3543)	TAGGGGAGTGTCAAAAACACTGTCCGTTCAATCAGGGTAGTACCTACGATAATGTTGTTTTGCCTGTTTTACCAT								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(3543)	TAGGGGAGTGTCAAAAACACTGTCCGTTCAATCAGGGTAGTACCTACGATAATGTTGTTTTGCCTGTTTTACCAT								
										Section 48
	(3620)	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3696	
BNYVV RNA1 NC_003514	(3620)	CTGATTTGAACTGATTAACCTCAGCTGAGTTGAATTTGGTAGCTTTATCTCGTCACAGGAATAAGTTAACCATTTTA								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(3620)	CTGATTTGAACTGATTAACCTCAGCTGAGTTGAATTTGGTAGCTTTATCTCGTCACAGGAATAAGTTAACCATTTTA								
										Section 49
	(3697)	3697	3710	3720	3730	3740	3750	3760	3773	
BNYVV RNA1 NC_003514	(3697)	TTGGACAATGATGGTATGAATATTGGTGCTGTTTTGAAAGGCATGCTTGAGGGTGTGCCGGAAGAATCGAAAGAAG								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(3697)	TTGGACAATGATGGTATGAATATTGGTGCTGTTTTGAAAGGCATGCTTGAGGGTGTGCCGGAAGAATCGAAAGAAG								
										Section 50
	(3774)	3774	3780	3790	3800	3810	3820	3830	3840	3850
BNYVV RNA1 NC_003514	(3774)	GGATTACATTGTTGGGATGTACCTTGGGTTACATTTACCTATTAAGAAAGAGTCTTCTTTCTTGAGTCTGAGTTTG								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(3774)	GGATTACATTGTTGGGATGTACCTTGGGTTACATTTACCTATTAAGAAAGAGTCTTCTTTCTTGAGTCTGAGTTTG								
										Section 51
	(3851)	3851	3860	3870	3880	3890	3900	3910	3927	
BNYVV RNA1 NC_003514	(3851)	CTAAAFCGTTTAGATTAATGGTTGCTAAGTATGAGGCATTTGTACCTACGATAGTAAATTTGCCAACTTTGGTTTTA								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(3851)	CTAAFCGTTTAGATTAATGGTTGCTAAGTATGAGGCATTTGTACCTACGATAGTAAATTTGCCAACTTTGGTTTTA								
										Section 52
	(3928)	3928	3940	3950	3960	3970	3980	3990	4004	
BNYVV RNA1 NC_003514	(3928)	CAAGGAGATGTCGTTGTTTTGGACATAGCACGTGTGGAAAACGACATTAATGATGCCTTTAAATGTCAGATTCTTA								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(3928)	CAAGGAGATGTCGTTGTTTTGGACATAGCACGTGTGGAAAACGACATTAATGATGCCTTTAAATGTCAGATTCTTA								
										Section 53
	(4005)	4005	4010	4020	4030	4040	4050	4060	4070	4081
BNYVV RNA1 NC_003514	(4005)	TAATCTTGTGTCCTCGTCTCAACAATGTTTAGTAGTAGCTATTTTCAAGATGTTTAGGTGTGACGCTAGAAAAATTGG								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(4005)	TAATCTTGTGTCCTCGTCTCAACAATGTTTAGTAGTAGCTATTTTCAAGATGTTTAGGTGTGACGCTAGAAAAATTGG								
										Section 54
	(4082)	4082	4090	4100	4110	4120	4130	4140	4158	
BNYVV RNA1 NC_003514	(4082)	ACAATCTTATGCAAGCTAACGCTGTGACGCTTGATAAGTATCACGCGTGGTGTCTAAGAAGTCTCCATCAACTTGG								
BNYVV RNA1 Type P LBS31	(4082)	ACAATCTTATGCAAGCTAACGCTGTGACGCTTGATAAGTATCACGCGTGGTGTCTAAGAAGTCTCCATCAACTTGG								

									Section 73
(5545)	5545	5550	5560	5570	5580	5590	5600	5610	5621
BNYV RNA1 NC_003514 (5545)	AATGATTTGTTATTGAAGTCGTTAAACTCTAATGTTGTTTACGATAACACAATGCTCTGAGACCGAATTTGTTGGAAA								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (5545)	AATGATTTGTTATTGAAGTCGTTAAACTCTAATGTTGTTTACGATAACACAATGCTCTGAGACCGAATTTGTTGGAAA								
									Section 74
(5622)	5622	5630	5640	5650	5660	5670	5680		5698
BNYV RNA1 NC_003514 (5622)	AATAAATGCCGCCATGAATATAGTACCGGATAGTGCATAAAACGGGGTTATCGATGCTGCTGCTTGCATTCTGGGG								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (5622)	AATAAATGCCGCCATGAATATAGTACCGGATAGTGCATAAAACGGGGTTATCGATGCTGCTGCTTGCATTCTGGGG								
									Section 75
(5699)	5699	5710	5720	5730	5740	5750	5760		5775
BNYV RNA1 NC_003514 (5699)	AAGGGGTTTTTACCCAATTGATAGAAAGACATATTTATGCTGCTTTGGGCATTCTGACTTCTTTTTGGATTGGTAT								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (5699)	AAGGGGTTTTTACCCAATTGATAGAAAGACATATTTATGCTGCTTTGGGCATTCTGACTTCTTTTTGGATTGGTAT								
									Section 76
(5776)	5776	5790	5800	5810	5820	5830	5840		5852
BNYV RNA1 NC_003514 (5776)	TTCTCATTTTCGTGAGAAATATGTTATGCAGTCCAGATATGTCAGAGCACATATGTCTTATGTTAAGACTAGTGGAGA								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (5776)	TTCTCATTTTCGTGAGAAATATGTTATGCAGTCCAGATATGTCAGAGCACATATGTCTTATGTTAAGACTAGTGGAGA								
									Section 77
(5853)	5853	5860	5870	5880	5890	5900	5910		5929
BNYV RNA1 NC_003514 (5853)	ACCCGGCACTTTGCTTGGTAAACACCATTTTAAATGGGTGCTATGTTAAATGCTATGCTTCGTGGGACCGGACCATTTT								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (5853)	ACCCGGCACTTTGCTTGGTAAACACCATTTTAAATGGGTGCTATGTTAAATGCTATGCTTCGTGGGACCGGACCATTTT								
									Section 78
(5930)	5930	5940	5950	5960	5970	5980	5990		6006
BNYV RNA1 NC_003514 (5930)	GTATGGCCATGAAGGGCGATGATGGTTTTAAAGGCAGGCTAATTTGAAAAATTAACGATCAAAATGTTAAAGTTGATT								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (5930)	GTATGGCCATGAAGGGCGATGATGGTTTTAAAGGCAGGCTAATTTGAAAAATTAACGATCAAAATGTTAAAGTTGATT								
									Section 79
(6007)	6007	6020	6030	6040	6050	6060	6070		6083
BNYV RNA1 NC_003514 (6007)	AAAAAGGAAACGTCTTGGATTTCAAATGGATTTAAATGTTCCCTATCACTTTTGTGGTTATGCTTTATCTAATGG								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (6007)	AAAAAGGAAACGTCTTGGATTTCAAATGGATTTAAATGTTCCCTATCACTTTTGTGGTTATGCTTTATCTAATGG								
									Section 80
(6084)	6084	6090	6100	6110	6120	6130	6140	6150	6160
BNYV RNA1 NC_003514 (6084)	ACATTTGTTTCCAAGTGTTCACGTAAATTGACGAAGATAGCAGCACACAGGTTCCGTGAGTATAAGCATTTTTGTG								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (6084)	ACATTTGTTTCCAAGTGTTCACGTAAATTGACGAAGATAGCAGCACACAGGTTCCGTGAGTATAAGCATTTTTGTG								
									Section 81
(6161)	6161	6170	6180	6190	6200	6210	6220		6237
BNYV RNA1 NC_003514 (6161)	AATACCAGGAATCTTTGCGTGATGGATTAAAAATCTCCCAAAGACCCAGCTGTTTATGCTGATTTTTTGGAGTGT								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (6161)	AATACCAGGAATCTTTGCGTGATGGATTAAAAATCTCCCAAAGACCCAGCTGTTTATGCTGATTTTTTGGAGTGT								
									Section 82
(6238)	6238	6250	6260	6270	6280	6290	6300		6314
BNYV RNA1 NC_003514 (6238)	AATGCTAGCTTATCTTGTGCGCAATGTTGATGATGTTCAACGTTGGTTGGATGCTATTATCTCTGTGTCTCGAATTGG								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (6238)	AATGCTAGCTTATCTTGTGCGCAATGTTGATGATGTTCAACGTTGGTTGGATGCTATTATCTCTGTGTCTCGAATTGG								
									Section 83
(6315)	6315	6320	6330	6340	6350	6360	6370	6380	6391
BNYV RNA1 NC_003514 (6315)	CGGTGAGCAATTTATGATGATGTTCCCGATACGGGAAGTTTTATGTCATTGCCACCCGTTGAGGATAGTTTTGGGGT								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (6315)	CGGTGAGCAATTTATGATGATGTTCCCGATACGGGAAGTTTTATGTCATTGCCACCCGTTGAGGATAGTTTTGGGGT								
									Section 84
(6392)	6392	6400	6410	6420	6430	6440	6450		6468
BNYV RNA1 NC_003514 (6392)	AGTTATCTTCTACGAAAGTGGCTGTGCTATTGGGGACAATGTTTCTAATGTTGTTAGAAAAGGTTGCCGTTGTCGAT								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (6392)	AGTTATCTTCTACGAAAGTGGCTGTGCTATTGGGGACAATGTTTCTAATGTTGTTAGAAAAGGTTGCCGTTGTCGAT								
									Section 85
(6469)	6469	6480	6490	6500	6510	6520	6530		6545
BNYV RNA1 NC_003514 (6469)	ATGAAAAGTTTTAATGTGTAATATAGTAATATAAATACGTTGTATACTTGTGAGTAGTATAAGTTTAAAAATGAATA								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (6469)	ATGAAAAGTTTTAATGTGTAATATAGTAATATAAATACGTTGTATACTTGTGAGTAGTATAAGTTTAAAAATGAATA								
									Section 86
(6546)	6546	6560	6570	6580	6590	6600	6610		6622
BNYV RNA1 NC_003514 (6546)	AAGGCCATGCCACAGGCTCCTATCTTGATGAAGGTTGTTGTGGTTTTCTCATTACTGTTTTATTATGTTTGGAGTT								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (6546)	AAGGCCATGCCACAGGCTCCTATCTTGATGAAGGTTGTTGTGGTTTTCTCATTACTGTTTTATTATGTTTGGAGTT								
									Section 87
(6623)	6623	6630	6640	6650	6660	6670	6680		6699
BNYV RNA1 NC_003514 (6623)	GCTTATGTCGGTTCTTGATTATGTTGGTGCATAAATTATGAACAAATGTTTGTGGGTTGTAATGTACTGACTGGGT								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (6623)	GCTTATGTCGGTTCTTGATTATGTTGGTGCATAAATTATGAACAAATGTTTGTGGGTTGTAATGTACTGACTGGGT								
									Section 88
(6700)	6700	6710	6720	6730	6746				
BNYV RNA1 NC_003514 (6700)	GTGAATTGTACCAGTCGTTAAAGGGTTTACTATCAGTATATTGATA								
BNYV RNA1 Type P LBS31 (6700)	GTGAATTGTACCAGTCGTTAAAGGGTTTACTATCAGTATATTGATA								

									Section 43
(3235)	3235	3240	3250	3260	3270	3280	3290	3300	431
BNYVV RNA2 NC_003515 (3235)	GTGGAGTTAGTAAGTCTTGCACCCGGAGATACTTTTTGCGAAGATAGATAAATGTCTAGGGAAAATAACCGCTCGAGCCCA								3388
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (3235)	GTGGAGTTAGTAAGTCTTGCACCCGGAGATACTTTTTGCGAAGATAGATAAATGTCTAGGGAAAATAACCGCTCGAGCCCA								
									Section 44
(3312)	3312	3320	3330	3340	3350	3360	3370		3388
BNYVV RNA2 NC_003515 (3312)	ATAAGAATGTGCCTATTGTTGTTGGTGTGGTGTGGTCTTCTTTGTATTGCTGGCGTTTCATGCAGCAAAAACAT								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (3312)	ATAAGAATGTGCCTATTGTTGTTGGTGTGGTGTGGTCTTCTTTGTATTGCTGGCGTTTCATGCAGCAAAAACAT								
									Section 45
(3389)	3389	3400	3410	3420	3430	3440	3450	3465	
BNYVV RNA2 NC_003515 (3389)	AAGACACATTC TGGGGGCGATTACGGAGTCCCAACATTTTCTAACGGTGGTAAATACAGAGACGGTACAAGGTCAGC								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (3389)	AAGACACATTC TGGGGGCGATTACGGAGTCCCAACATTTTCTAACGGTGGTAAATATAGAGACGGCACAAAGGTCAGC								
									Section 46
(3466)	3466	3480	3490	3500	3510	3520	3530	3542	
BNYVV RNA2 NC_003515 (3466)	TGATTTTAATAGTAATAATCATCGTGTACGGGTGCGGTGGGTCTGGGGGTAGCGTTAGTAGTCGAGTCGGGCAGC								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (3466)	TGATTTTAATAGTAATAATCATCGTGTACGGGTGCGGTGGGTCTGGGGGTAGCGTTAGTAGTCGAGTCGGGCAGC								
									Section 47
(3543)	3543	3550	3560	3570	3580	3590	3600	3619	
BNYVV RNA2 NC_003515 (3543)	AACTTGTGTGTAGCTATTGTGTCTGTGTTAATAGTATCACTGTTACAACGATTAAGATCTCCACCAGAACATATT								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (3543)	AACTTGTGTGTAGCTATTGTGTCTGTGTTGATAGTATCACTGTTACAACGATTAAGATCTCCACCAGAACATATT								
									Section 48
(3620)	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3696	
BNYVV RNA2 NC_003515 (3620)	TGTAATGGTGCCTTGTGGTTAAAGTAGATTTATCTAATATTGTGTTGTATATAGTTGCCGGTTGTGTTGTTGTTAGCA								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (3620)	TGTAATGGTGCCTTGTGGTTAAAGTAGATTTATCTAATATTGTGTTGTATATAGTTGCCGGTTGTGTTGTTGTTAGCA								
									Section 49
(3697)	3697	3710	3720	3730	3740	3750	3760	3773	
BNYVV RNA2 NC_003515 (3697)	TGTTGTACTCACCATTTTTCAGCAACGATGTTAAAGCGTCCAGCTATGCGGGGAGCAGTTTTTAAAGGGAGTGGCTGT								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (3697)	TGTTGTACTCACCATTTTTCAGCAACGATGTTAAAGCGTCCAGCTATGCGGGGAGCAGTTTTTAAAGGGAGTGGCTGT								
									Section 50
(3774)	3774	3780	3790	3800	3810	3820	3830	3840	3850
BNYVV RNA2 NC_003515 (3774)	ATCATGGACAGGAATTCGTTTGTCTCAATTTGGGAGTTGCGATATCCAAAGCATGTAGCCGAGTCCATCACTAAGGT								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (3774)	ATCATGGACAGGAATTCGTTTGTCTCAATTTGGGAGTTGCGATATCCGAAAGCATGTAGCCGAGTCCATCACTAAGGT								
									Section 51
(3851)	3851	3860	3870	3880	3890	3900	3910	3927	
BNYVV RNA2 NC_003515 (3851)	TGCTACCAAAGAGCAGCATGCTGATATAAATGGTAAAAAGAGGTGAAGTGACCCTTCGTGTTGTGACTCTCACCAGAA								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (3851)	TGCTACCAAAGAGCAGCATGCTGATGTAATGGTAAAAAGAGGTGAAGTGACCCTTCGTGTTGTGACTCTCACCAGAA								
									Section 52
(3928)	3928	3940	3950	3960	3970	3980	3990	4004	
BNYVV RNA2 NC_003515 (3928)	CTCTTTTTCATAATATTATCTAGATTGTTGGTTGGCGGTGTTTTGTTTCATGATATGTTAATGTCTATAGTTTGG								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (3928)	CTCTTTTTCATAATATTATCTAGATTGTTGGTTGGCGGTGTTTTGTTTCATGATATGTTAATGTCTATAGTTTGG								
									Section 53
(4005)	4005	4010	4020	4030	4040	4050	4060	4070	4081
BNYVV RNA2 NC_003515 (4005)	TTTTGGTGTATAGATAAATTTGGTGAAGTGAATGAGTATGGGGATGGTAGATAGTTTGTGTGTGTTTGGTGGTGG								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (4005)	TTTTGGTGTATAGATAAATTTGGTGAAGTGAATGAGTATGGGGATGGTAGATAGTTTGTGTGTGTTTGGTGGTGG								
									Section 54
(4082)	4082	4090	4100	4110	4120	4130	4140	4158	
BNYVV RNA2 NC_003515 (4082)	ATAACTGAGGGATCTGAAAGTGTGAGGGTGTGGAACGGTTTTCCATTAAAGTTAGTGAAGTGGAAATTGTTCCACC								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (4082)	ATAACTGAGGGATCTGAAAGTGTGAGGGTGTGGAACGGTTTTCCATTAAAGTTAGTGAAGTGGAAATTGTTCCACC								
									Section 55
(4159)	4159	4170	4180	4190	4200	4210	4220	4235	
BNYVV RNA2 NC_003515 (4159)	CGCGGTGTACGTTGAATATCGTCAGTTAGGTGAGAAAGAGTGTAGTTTGAAGGATGTTGGTAGGTTACATTTTAATA								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (4159)	CGCGGTGTACGTTGAATATCGTCAGTTAGGTGAGAAAGAGTGTAGTTTGAAGGATGTTGGTAGGTTACATTTTAATA								
									Section 56
(4236)	4236	4250	4260	4270	4280	4290	4300	4312	
BNYVV RNA2 NC_003515 (4236)	TGTCATGTGTGAAATGCTGTCAAAAACCTAAATGCAAGAAACAAAATAAAAATCATAGTAAACACGTCAAAAATGGA								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (4236)	TGTCATGTGTGAAATGCTGTCAAAAACCTAAATGCAAGAAACAAAATAAAAATCATAGTAAACACGTCAAAAATGGA								
									Section 57
(4313)	4313	4320	4330	4340	4350	4360	4370	4389	
BNYVV RNA2 NC_003515 (4313)	TATTTACGCAAGGTGCGTAATTTTCCATTTTAGGTGTTGCGGGTATTGTTGTGAGTCTTTTACACTGCGGACGA								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (4313)	TATTTACGCAAGGTGCGTAATTTTCCATTTTAGGTGTTGCGGGTATTGTTGTGAGTCTTTTACACTGCGGACGA								
									Section 58
(4390)	4390	4400	4410	4420	4430	4440	4450	4466	
BNYVV RNA2 NC_003515 (4390)	AAAACATCATGTTATTGTCTGATCCTGAGGTGTAAAGGTTTATTCAAGAGACTATGTTAATATTAATAATCAGGG								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (4390)	AAAACATCATGTTATTGTCTGATCCTGAGGTGTAAAGGTTTATTCAAGAGACTATGTTAATATTAATAATCAGGG								
									Section 59
(4467)	4467	4480	4490	4500	4510	4520	4530	4543	
BNYVV RNA2 NC_003515 (4467)	CCATGCCACAGGCCTCCTATTGGGTTGTTCCGAAGGTTGTTGTTGTTTATATTGCTTATTGGTAAGTGATTTGATTA								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (4467)	CCATGCCACAGGCCTCCTATTGGGTTGTTCCGAAGGTTGTTGTTGTTTATATTGCTTATTGGTAAGTGATTTGATTA								
									Section 60
(4544)	4544	4550	4560	4570	4580	4590	4609		
BNYVV RNA2 NC_003515 (4544)	AGGTTGCAGTGTACTGACTGGGTGTGAATTGTACCAGTCCATGTAGGGTCTGTTTTCAGTATATTG								
BNYVV RNA2 Type P LBS22 (4544)	AGGTTGCAGTGTACTGACTGGGTGTGAATTGTACCAGTCCATGTAGGGTCTGTTTTCAGTATATTG								

									Section 19
(1423)	1423	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1501
BSBMV RNA1 NC_003506 (1423)	TACGGGTGCGCAGACTGCTGTTGGTTATATGGCTTTGCCAAATGAGTTGTTATTTGAACATTATCCTATCTCTGATTAT								
BSBMV RNA1 LB160 (1414)	TACGGGTGCGCAGACTGCTGTTGGTTATATGGCTTTGCCAAATGAGTTGTTATTTGAACATTATCCTATCTCTGATTAT								
									Section 20
(1502)	1502	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580
BSBMV RNA1 NC_003506 (1502)	TATGATTATTGGGAAGGTATTGAAAAACATGGTGCCTTTGGGGGGTATCACTATTTCCCCATTAAAGAATGGGCAAGTTG								
BSBMV RNA1 LB160 (1493)	TATGATTATTGGGAAGGTATTGAAAAACATGGTGCCTTTGGGGGGTATCACTATTTCCCCATTAAAGAATGGGCAAGTTG								
									Section 21
(1581)	1581	1590	1600	1610	1620	1630	1640		1659
BSBMV RNA1 NC_003506 (1581)	TTGGTATGCCAAAGGGTGTTCCTCAAGCTTCACAGTTTGTAAATTCAGCTGCTGGGCTCGGGATTCTGGGTCCAAGAT								
BSBMV RNA1 LB160 (1572)	TTGGTATGCCAAAGGGTGTTCCTCAAGCTTCACAGTTTGTAAATTCAGCTGCTGGGCTCGGGATTCTGGGTCCAAGAT								
									Section 22
(1660)	1660	1670	1680	1690	1700	1710	1720		1738
BSBMV RNA1 NC_003506 (1660)	GGGAAGTGTGAAACGTATCATATGTCATATGTCAGACGGCTTTGGCAACGGGTATAATCATGTTAAGAGTGATTGGCAA								
BSBMV RNA1 LB160 (1651)	GGGAAGTGTGAAACGTATCATATGTCATATGTCAGACGGCTTTGGCAACGGGTATAATCATGTTAAGAGTGATTGGCAA								
									Section 23
(1739)	1739	1750	1760	1770	1780	1790	1800		1817
BSBMV RNA1 NC_003506 (1739)	ACATTGCTTAAGAATCCAATTTTAGCGTCACCCAAATATAATTTTGCATATAGAGGTAGACTTGCAAGGACGTTATGGGT								
BSBMV RNA1 LB160 (1730)	ACATTGCTTAAGAATCCAATTTTAGCGTCACCCAAATATAATTTTGCATATAGAGGTAGACTTGCAAGGACGTTATGGGT								
									Section 24
(1818)	1818	1830	1840	1850	1860	1870	1880		1896
BSBMV RNA1 NC_003506 (1818)	GTCTTGCCACTTTTCGTCGACGCGAGTCACCGGCGTGAAGTATGTTGCTAGAAGTATTAAGTATAGACCTGAGGATAG								
BSBMV RNA1 LB160 (1809)	GTCTTGCCACTTTTCGTCGACGCGAGTCACCGGCGTGAAGTATGTTGCTAGAAGTATTAAGTATAGACCTGAGGATAG								
									Section 25
(1897)	1897	1910	1920	1930	1940	1950	1960		1975
BSBMV RNA1 NC_003506 (1897)	ATATGTTTCGTGTGCTAGATTGCTACATATGTTGCGTAGTATAAGGCAGAAAGGACACGCTGGTCTTAGAGAACCCTAT								
BSBMV RNA1 LB160 (1888)	ATATGTTTCGTGTGCTAGATTGCTACATATGTTGCGTAGTATAAGGCAGAAAGGACACGCTGGTCTTAGAGAACCCTAT								
									Section 26
(1976)	1976	1990	2000	2010	2020	2030	2040		2054
BSBMV RNA1 NC_003506 (1976)	CAATAATTTCCCTGTTTATAAGCGTGAGGTTGATACCCTGCTCGTATTGTTTTCAATAGCTGAAAAGTCTCTGACTG								
BSBMV RNA1 LB160 (1967)	CAATAATTTCCCTGTTTATAAGCGTGAGGTTGATACCCTGCTCGTATTGTTTTCAATAGCTGAAAAGTCTCTGACTG								
									Section 27
(2055)	2055	2060	2070	2080	2090	2100	2110	2120	2133
BSBMV RNA1 NC_003506 (2055)	TGCAGAACATTGCAAAATTTTATTCGACATCACATTGGTGGGGTGTCTTTGGTTAATAAGGAGCTTGTCTGCTGGAG								
BSBMV RNA1 LB160 (2046)	TGCAGAACATTGCAAAATTTTATTCGACATCACATTGGTGGGGTGTCTTTGGTTAATAAGGAGCTTGTCTGCTGGAG								
									Section 28
(2134)	2134	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2212
BSBMV RNA1 NC_003506 (2134)	GTTGAATCCGCAACTTGTACCGTCTTCGCGCTATGCTGTTTATTTTTATGTTATTAATTTGAGAGGCGAATTAGATGGT								
BSBMV RNA1 LB160 (2125)	GTTGAATCCGCAACTTGTACCGTCTTCGCGCTATGCTGTTTATTTTTATGTTATTAATTTGAGAGGCGAATTAGATGGT								
									Section 29
(2213)	2213	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2291
BSBMV RNA1 NC_003506 (2213)	ATGTTGGAGAAGTTGATGAAGAAGGGTATCACTTGGTCAGATCGACTGAAAAGCTAAATGTATCTGCTTTTTGAGAGATA								
BSBMV RNA1 LB160 (2204)	ATGTTGGAGAAGTTGATGAAGAAGGGTATCACTTGGTCAGATCGACTGAAAAGCTAAATGTATCTGCTTTTTGAGAGATA								
									Section 30
(2292)	2292	2300	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370
BSBMV RNA1 NC_003506 (2292)	TGGTTGATCCATTAGCTTTCTTTGGACATGGTTATTTGAGCGTCTTTAGTCGATCAAATTTTGGAGGATGGTACCGA								
BSBMV RNA1 LB160 (2283)	TGGTTGATCCATTAGCTTTCTTTGGACATGGTTATTTGAGCGTCTTTAGTCGATCAAATTTTGGAGGATGGTACCGA								
									Section 31
(2371)	2371	2380	2390	2400	2410	2420	2430		2449
BSBMV RNA1 NC_003506 (2371)	TGTTTTTTATCAGATGGATCGTCTTGTGGATGATAAGGCATTAAGTTGAGTGAACATTTAAATGTCACCTCGTGAT								
BSBMV RNA1 LB160 (2362)	TGTTTTTTATCAGATGGATCGTCTTGTGGATGATAAGGCATTAAGTTGAGTGAACATTTAAATGTCACCTCGTGAT								
									Section 32
(2450)	2450	2460	2470	2480	2490	2500	2510		2528
BSBMV RNA1 NC_003506 (2450)	TTTATGCCGGCTGACACTTTATGCCCAGGGGATGGGTTTTGGATGATTGGGAGAAGGCTCCAGATAGTCTGAAGACTT								
BSBMV RNA1 LB160 (2441)	TTTATGCCGGCTGACACTTTATGCCCAGGGGATGGGTTTTGGATGATTGGGAGAAGGCTCCAGATAGTCTGAAGACTT								
									Section 33
(2529)	2529	2540	2550	2560	2570	2580	2590		2607
BSBMV RNA1 NC_003506 (2529)	TGTCCGCTGCTGCTTCCCTACCTATCGAATGTGGGACTATTAATTTGTTGGCAAACTTTCAAGAGTATCCGCTCTCT								
BSBMV RNA1 LB160 (2520)	TGTCCGCTGCTGCTTCCCTACCTATCGAATGTGGGACTATTAATTTGTTGGCAAACTTTCAAGAGTATCCGCTCTCT								
									Section 34
(2608)	2608	2620	2630	2640	2650	2660	2670		2686
BSBMV RNA1 NC_003506 (2608)	GTTGCCACCACTCTGCTTACCTCTCCTGTTGAGCAGTTTTTCAAAGCTGGCGGCAAAATTTGAAAATGATAGTGAGTTT								
BSBMV RNA1 LB160 (2599)	GTTGCCACCACTCTGCTTACCTCTCCTGTTGAGCAGTTTTTCAAAGCTGGCGGCAAAATTTGAAAATGATAGTGAGTTT								
									Section 35
(2687)	2687	2700	2710	2720	2730	2740	2750		2765
BSBMV RNA1 NC_003506 (2687)	GCTGAGTTGTTGAGCGCTCATTATCGTTGGCAAAATGGACAATTCGTTTTGTGCTTGTGAGGTTTGTCTGCTTTAACAG								
BSBMV RNA1 LB160 (2678)	GCTGAGTTGTTGAGCGCTCATTATCGTTGGCAAAATGGACAATTCGTTTTGTGCTTGTGAGGTTTGTCTGCTTTAACAG								
									Section 36
(2766)	2766	2780	2790	2800	2810	2820	2830		2844
BSBMV RNA1 NC_003506 (2766)	GTCAGACTGGCTCCAGGTTGTTGAATGTAGATGGAAAGAAGAGTCTTTGTATACTTTTCTATGTCGCAAAACCGAGGT								
BSBMV RNA1 LB160 (2757)	GTCAGACTGGCTCCAGGTTGTTGAATGTAGATGGAAAGAAGAGTCTTTGTATACTTTTCTATGTCGCAAAACCGAGGT								

										Section 37
(2845)	2845	2850	2860	2870	2880	2890	2900	2910	2923	
BSBMV RNA1 NC_003506 (2845)	TGACGATTTTAGAAATGAAGTTAAGGCTCAGTCTATTGAAAAAGGGAATCGGTTTGGAGAGTTATTGGTAGGTGTACAT									
BSBMV RNA1 LB160 (2836)	TGACGATTTTAGAAATGAAGTTAAGGCTCAGTCTATTGAAAAAGGGAATCGGTTTGGAGAGTTATTGGTAGGTGTACAT									
										Section 38
(2924)	2924	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990	3002	
BSBMV RNA1 NC_003506 (2924)	CAAAAAATTCCAACTCAAGCTTTTGTAGGTTTCTGTGCGGCTTGAATATATCAAGGGTGGGCCGGCCTGGTAAAGTCCCT									
BSBMV RNA1 LB160 (2915)	CAAAAAATTCCAACTCAAGCTTTTGTAGGTTTCTGTGCGGCTTGAATATATCAAGGGTGGGCCGGCCTGGTAAAGTCCCT									
										Section 39
(3003)	3003	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3081	
BSBMV RNA1 NC_003506 (3003)	TTCTGATAAGGTCTTTAGCTGATCCTATAAGGGATCTTGTGTGGCTCCTTTTATCAAATTGAGGTCGGATTATCAAAA									
BSBMV RNA1 LB160 (2994)	TTCTGATAAGGTCTTTAGCTGATCCTATAAGGGATCTTGTGTGGCTCCTTTTATCAAATTGAGGTCGGATTATCAAAA									
										Section 40
(3082)	3082	3090	3100	3110	3120	3130	3140	3150	3160	
BSBMV RNA1 NC_003506 (3082)	FCAACGTGTGGGTGATGACGTTGTTTCTTGGGATTTTCACACTCCGCATAAAGGCTTTGGGATATCACAGGTAAGCAGGTG									
BSBMV RNA1 LB160 (3073)	FCAACGTGTGGGTGATGACGTTGTTTCTTGGGATTTTCACACTCCGCATAAAGGCTTTGGGATATCACAGGTAAGCAGGTG									
										Section 41
(3161)	3161	3170	3180	3190	3200	3210	3220		3239	
BSBMV RNA1 NC_003506 (3161)	ATTTTCGTGGATGAATTTACGCTTACGATTGGCGTTTGGCTGTGTTTGGCTTATCGAAATCATGCTCATACCATAT									
BSBMV RNA1 LB160 (3152)	ATTTTCGTGGATGAATTTACGCTTACGATTGGCGTTTGGCTGTGTTTGGCTTATCGAAATCATGCTCATACCATAT									
										Section 42
(3240)	3240	3250	3260	3270	3280	3290	3300		3318	
BSBMV RNA1 NC_003506 (3240)	ATCTTGTGGGGATGAGCAACAACTGGTATACAAGAGGGTCGTGGTGAAGGGGTTCCATTCTTAATAGGATTGATT									
BSBMV RNA1 LB160 (3231)	ATCTTGTGGGGATGAGCAACAACTGGTATACAAGAGGGTCGTGGTGAAGGGGTTCCATTCTTAATAGGATTGATT									
										Section 43
(3319)	3319	3330	3340	3350	3360	3370	3380		3397	
BSBMV RNA1 NC_003506 (3319)	ATCTAAGATCTCAACACATGTTCCCTATTATGAATTTAGAAATCCCGTTCGAGATGTTAAGGCTTGAATTTATTTATTT									
BSBMV RNA1 LB160 (3310)	ATCTAAGATCTCAACACATGTTCCCTATTATGAATTTAGAAATCCCGTTCGAGATGTTAAGGCTTGAATTTATTTATTT									
										Section 44
(3398)	3398	3410	3420	3430	3440	3450	3460		3476	
BSBMV RNA1 NC_003506 (3398)	GGTGCCTCGCATGGTTCCAATGTCTAGTATTGAGCAGGGTTTTGTTTCGGGGATATTAAGATTTTTCTTCTTTATCTA									
BSBMV RNA1 LB160 (3389)	GGTGCCTCGCATGGTTCCAATGTCTAGTATTGAGCAGGGTTTTGTTTCGGGGATATTAAGATTTTTCTTCTTTATCTA									
										Section 45
(3477)	3477	3490	3500	3510	3520	3530	3540		3555	
BSBMV RNA1 NC_003506 (3477)	ATATACTGATACTAAGATCGTTTCACTATTCTGACGAGACCGGTGAGCATATGATGCCTGACTATGTTAGGGGATTTTC									
BSBMV RNA1 LB160 (3468)	ATATACTGATACTAAGATCGTTTCACTATTCTGACGAGACCGGTGAGCATATGATGCCTGACTATGTTAGGGGATTTTC									
										Section 46
(3556)	3556	3570	3580	3590	3600	3610	3620		3634	
BSBMV RNA1 NC_003506 (3556)	FAAGACCCTGTACGTGCTAATCAAGGAAGCACTTATGATAATGTTGTGTTGCCTGTCTACCATCTGATTTGAAATTTG									
BSBMV RNA1 LB160 (3547)	FAAGACCCTGTACGTGCTAATCAAGGAAGCACTTATGATAATGTTGTGTTGCCTGTCTACCATCTGATTTGAAATTTG									
										Section 47
(3635)	3635	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3713	
BSBMV RNA1 NC_003506 (3635)	ATCAACTCTCAGGAATTTGAATTTGGTTGCTTGTCTCGACATAAGAACAATAAACCATTTTGTGGACAACGATGGCA									
BSBMV RNA1 LB160 (3626)	ATCAACTCTCAGGAATTTGAATTTGGTTGCTTGTCTCGACATAAGAACAATAAACCATTTTGTGGACAACGATGGCA									
										Section 48
(3714)	3714	3720	3730	3740	3750	3760	3770	3780	3792	
BSBMV RNA1 NC_003506 (3714)	TGAATATAGGTGCTACTTTAAAGGGTATGATTGAAGGTGTGCCTGAGGAACCTGAACGTAAGGATTACATTATTGGTAT									
BSBMV RNA1 LB160 (3705)	TGAATATAGGTGCTACTTTAAAGGGTATGATTGAAGGTGTGCCTGAGGAACCTGAACGTAAGGATTACATTATTGGTAT									
										Section 49
(3793)	3793	3800	3810	3820	3830	3840	3850	3860	3871	
BSBMV RNA1 NC_003506 (3793)	GTATTTGGGCAATCATCTACCTATTAAGAAAGAGTCTTCTTCCGGAGTCTGAATTTGCAAAATCTTTTAGATTGATG									
BSBMV RNA1 LB160 (3784)	GTATTTGGGCAATCATCTACCTATTAAGAAAGAGTCTTCTTCCGGAGTCTGAATTTGCAAAATCTTTTAGATTGATG									
										Section 50
(3872)	3872	3880	3890	3900	3910	3920	3930	3940	3950	
BSBMV RNA1 NC_003506 (3872)	GTTGCGAAGTATGAGGCTTTTGTGCCTTATGATAGCGATTTACCAACTTTGGTTTCGAGGGTGATGTCGTTGTTTGG									
BSBMV RNA1 LB160 (3863)	GTTGCGAAGTATGAGGCTTTTGTGCCTTATGATAGCGATTTACCAACTTTGGTTTCGAGGGTGATGTCGTTGTTTGG									
										Section 51
(3951)	3951	3960	3970	3980	3990	4000	4010		4029	
BSBMV RNA1 NC_003506 (3951)	ATGTTTCTCGTGTGAGAACGACATTAACGACACATTTGAGTGTGCTGATTTTACAACTTGATTTCTCGACCAAACAA									
BSBMV RNA1 LB160 (3942)	ATGTTTCTCGTGTGAGAACGACATTAACGACACATTTGAGTGTGCTGATTTTACAACTTGATTTCTCGACCAAACAA									
										Section 52
(4030)	4030	4040	4050	4060	4070	4080	4090		4108	
BSBMV RNA1 NC_003506 (4030)	CTGTTTGGTTGTAGCCATTTCTGAATGCCTGGGTGTCACCTTGAAAACTAGATAATTTGATGCGAGGCCAATGTCGCT									
BSBMV RNA1 LB160 (4021)	CTGTTTGGTTGTAGCCATTTCTGAATGCCTGGGTGTCACCTTGAAAACTAGATAATTTGATGCGAGGCCAATGTCGCT									
										Section 53
(4109)	4109	4120	4130	4140	4150	4160	4170		4187	
BSBMV RNA1 NC_003506 (4109)	ACTATTTCAAAGTATCACAATTTGGTTGAGAAAGAAGACACCTTCCACATGGGAGGATTGTAGGTTGTTTCGCTGATGCTT									
BSBMV RNA1 LB160 (4100)	ACTATTTCAAAGTATCACAATTTGGTTGAGAAAGAAGACACCTTCCACATGGGAGGATTGTAGGTTGTTTCGCTGATGCTT									
										Section 54
(4188)	4188	4200	4210	4220	4230	4240	4250		4266	
BSBMV RNA1 NC_003506 (4188)	TGAAGTTTCTATGCATGTTAAGGTGTTGCTGATAAACCTTATGATTTAAATTTATTTGGTTGATGGGGCGGCATCTAA									
BSBMV RNA1 LB160 (4179)	TGAAGTTTCTATGCATGTTAAGGTGTTGCTGATAAACCTTATGATTTAAATTTATTTGGTTGATGGGGCGGCATCTAA									

									Section 55	
	(4267)	4267	4280	4290	4300	4310	4320	4330		4345
BSBMV RNA1 NC_003506 (4267)		CATTACTCTTCATTTTGCTTGGGAAAAGAAAGCGACGGTCACTTTGTGGCAGCACCTATTTCGGTGGTAGCGCTTCTACT								
BSBMV RNA1 LB160 (4258)		CATTACTCTTCATTTTGCTTGGGAAAAGAAAGCGACGGTCACTTTGTGGCAGCACCTATTTCGGTGGTAGCGCTTCTACT								
									Section 56	
	(4346)	4346	4360	4370	4380	4390	4400	4410		4424
BSBMV RNA1 NC_003506 (4346)		TCTTCTGGTAATAATAATAGTGCTTCTAGCTCCACTTCATCTGAGGATGATGAAGAGTTTGACGTTACTAATTTATTTG								
BSBMV RNA1 LB160 (4337)		TCTTCTGGTAATAATAATAGTGCTTCTAGCTCCACTTCATCTGAGGATGATGAAGAGTTTGACGTTACTAATTTATTTG								
									Section 57	
	(4425)	4425	4430	4440	4450	4460	4470	4480	4490	4503
BSBMV RNA1 NC_003506 (4425)		CTGATAGTGGTGTGTCTCCAACCTGATATGGACGCTTTTTCGGTGGTGGAGGCTACTATTATGACTTATTTTGATAA								
BSBMV RNA1 LB160 (4416)		CTGATAGTGGTGTGTCTCCAACCTGATATGGACGCTTTTTCGGTGGTGGAGGCTACTATTATGACTTATTTTGATAA								
									Section 58	
	(4504)	4504	4510	4520	4530	4540	4550	4560	4570	4582
BSBMV RNA1 NC_003506 (4504)		GCATGATTTGCCAAATCTGATTTGGGCACACCCTGTTGATGGTGGTGGATATTATCAGATAAATGTTGAGAAATTC								
BSBMV RNA1 LB160 (4495)		GCATGATTTGCCAAATCTGATTTGGGCACACCCTGTTGATGGTGGTGGATATTATCAGATAAATGTTGAGAAATTC								
									Section 59	
	(4583)	4583	4590	4600	4610	4620	4630	4640	4650	4661
BSBMV RNA1 NC_003506 (4583)		GGGTTGTCTGAGTGTGTCAAGCTTTCTTCGCGCTTTGGATGTGTTCAAACCTGATAGTTCGCAGAAAAAGGTAGTGT								
BSBMV RNA1 LB160 (4574)		GGGTTGTCTGAGTGTGTCAAGCTTTCTTCGCGCTTTGGATGTGTTCAAACCTGATAGTTCGCAGAAAAAGGTAGTGT								
									Section 60	
	(4662)	4662	4670	4680	4690	4700	4710	4720	4730	4740
BSBMV RNA1 NC_003506 (4662)		ACAAGTGGCTTCGTAGTGCCCTTAAAGATAAACAATTCATTGGCGGGCCACTCCTGGTAACACGTCGGCTAGTTCATC								
BSBMV RNA1 LB160 (4653)		ACAAGTGGCTTCGTAGTGCCCTTAAAGATAAACAATTCATTGGCGGGCCACTCCTGGTAACACGTCGGCTAGTTCATC								
									Section 61	
	(4741)	4741	4750	4760	4770	4780	4790	4800		4819
BSBMV RNA1 NC_003506 (4741)		TGGATCTGATGTTGATAATGATTTTGTAACTAGCCGGTGGTAAGACTAAATCTAAGTCGAGTGTGATGTCGCTCCG								
BSBMV RNA1 LB160 (4732)		TGGATCTGATGTTGATAATGATTTTGTAACTAGCCGGTGGTAAGACTAAATCTAAGTCGAGTGTGATGTCGCTCCG								
									Section 62	
	(4820)	4820	4830	4840	4850	4860	4870	4880		4898
BSBMV RNA1 NC_003506 (4820)		GCTGATACTTTGAGACAAAGTTTATGGATTATGCTTCGGAGTTCATACCTATTTTAAATTGCTGATGCCCTGCTGTTT								
BSBMV RNA1 LB160 (4811)		GCTGATACTTTGAGACAAAGTTTATGGATTATGCTTCGGAGTTCATACCTATTTTAAATTGCTGATGCCCTGCTGTTT								
									Section 63	
	(4899)	4899	4910	4920	4930	4940	4950	4960		4977
BSBMV RNA1 NC_003506 (4899)		TGCCCTTGGTTGAACCCGACCTATTGTTTCCAAATGATGGTCCCGAATTCGATGCTTTTTTATTAATCAAGGAATT								
BSBMV RNA1 LB160 (4890)		TGCCCTTGGTTGAACCCGACCTATTGTTTCCAAATGATGGTCCCGAATTCGATGCTTTTTTATTAATCAAGGAATT								
									Section 64	
	(4978)	4978	4990	5000	5010	5020	5030	5040		5056
BSBMV RNA1 NC_003506 (4978)		TGATTGGGATAATGGGGCTGATGAGTACCAATGTTCTTACCTTAATGAAGCTGTTGCCAATCGTATTGGCGATAAATTT								
BSBMV RNA1 LB160 (4969)		TGATTGGGATAATGGGGCTGATGAGTACCAATGTTCTTACCTTAATGAAGCTGTTGCCAATCGTATTGGCGATAAATTT								
									Section 65	
	(5057)	5057	5070	5080	5090	5100	5110	5120		5135
BSBMV RNA1 NC_003506 (5057)		GTTTCAGGTGTTTGGATACTGATATCATTTCCTCCATTGAACCTTGGCTGGGCATCCTGTTTCCGAGACTGTGAAATATC								
BSBMV RNA1 LB160 (5048)		GTTTCAGGTGTTTGGATACTGATATCATTTCCTCCATTGAACCTTGGCTGGGCATCCTGTTTCCGAGACTGTGAAATATC								
									Section 66	
	(5136)	5136	5150	5160	5170	5180	5190	5200		5214
BSBMV RNA1 NC_003506 (5136)		ATAGTATGTGCGTAGCACCTGCCCAAATTTACTTTAAGCGTAATCAGTGGCAAGAGTTGCAGGTGCAGCAGGCTAGGTA								
BSBMV RNA1 LB160 (5127)		ATAGTATGTGCGTAGCACCTGCCCAAATTTACTTTAAGCGTAATCAGTGGCAAGAGTTGCAGGTGCAGCAGGCTAGGTA								
									Section 67	
	(5215)	5215	5220	5230	5240	5250	5260	5270	5280	5293
BSBMV RNA1 NC_003506 (5215)		TTTGTTCGGAAAGGTTGTAACCTCACCCCTCTTCTACCCAGGACACAGTTGCTCGTATGGTGGTTCAGATGTTTGTTC								
BSBMV RNA1 LB160 (5206)		TTTGTTCGGAAAGGTTGTAACCTCACCCCTCTTCTACCCAGGACACAGTTGCTCGTATGGTGGTTCAGATGTTTGTTC								
									Section 68	
	(5294)	5294	5300	5310	5320	5330	5340	5350	5360	5372
BSBMV RNA1 NC_003506 (5294)		GATTGCTTAGTACCTAATGTTGCTGAGGTATTTTCAACATCTAATTTGTGGAGAATCATGGATAAGGCTATGCATGATA								
BSBMV RNA1 LB160 (5285)		GATTGCTTAGTACCTAATGTTGCTGAGGTATTTTCAACATCTAATTTGTGGAGAATCATGGATAAGGCTATGCATGATA								
									Section 69	
	(5373)	5373	5380	5390	5400	5410	5420	5430	5440	5451
BSBMV RNA1 NC_003506 (5373)		TGGTCACAAAAAATATCAGGGGCAGATGGAAGAAGAATTCACCTCGAAATGCGAGGTTGTACAGATTCCAATTGAAAGA								
BSBMV RNA1 LB160 (5364)		TGGTCACAAAAAATATCAGGGGCAGATGGAAGAAGAATTCACCTCGAAATGCGAGGTTGTACAGATTCCAATTGAAAGA								
									Section 70	
	(5452)	5452	5460	5470	5480	5490	5500	5510	5520	5530
BSBMV RNA1 NC_003506 (5452)		TATTGAAAAACCTTTAAAGGATCTGAGACTGATCTTGCTAAAGCTGGGCAAGGCATTTTAGCTTGGTCCAAAGAGGGC								
BSBMV RNA1 LB160 (5443)		TATTGAAAAACCTTTAAAGGATCTGAGACTGATCTTGCTAAAGCTGGGCAAGGCATTTTAGCTTGGTCCAAAGAGGGC								
									Section 71	
	(5531)	5531	5540	5550	5560	5570	5580	5590		5609
BSBMV RNA1 NC_003506 (5531)		CATGTGAAGTTTATGGTAGCTTTTAGAGTTTGAATGATTTATTATTGAAATCTCTTAACTCCAATGTTGTGTATGATA								
BSBMV RNA1 LB160 (5522)		CATGTGAAGTTTATGGTAGCTTTTAGAGTTTGAATGATTTATTATTGAAATCTCTTAACTCCAATGTTGTGTATGATA								
									Section 72	
	(5610)	5610	5620	5630	5640	5650	5660	5670		5688
BSBMV RNA1 NC_003506 (5610)		ATACAATGTCAGAGGTGAAGTTTGGTCCAAACATTAATGCTGCCATGAGTACTGTTCCGGGGAGTGCTATTAATGGAGT								
BSBMV RNA1 LB160 (5601)		ATACAATGTCAGAGGTGAAGTTTGGTCCAAACATTAATGCTGCCATGAGTACTGTTCCGGGGAGTGCTATTAATGGAGT								

Appendice B4. Allineamento della sequenza nucleotidica del clone dell'RNA2 di BSBMV (LB157) con la sequenza NC_003503.

												Section 1
BSBMV RNA2 NC_003503	(1)	1	10	20	30	40	50	60				79
BSBMV RNA2 LB157	(1)	GGATTCTAATTATTATCTCCATTGAATAGAAATTCACCAACTATTGTCTGATATCTTGTCCCTGGGGGCAATTTTATTCA										
												Section 2
BSBMV RNA2 NC_003503	(80)	80	90	100	110	120	130	140				158
BSBMV RNA2 LB157	(80)	GTGCCCTAACTTTGGAAATACGTGCGAGTAATAAGTAGCCCCCGTCCAGGAGAAGTTGCTTACAATATGGTTGATGAAG										
												Section 3
BSBMV RNA2 NC_003503	(159)	159	170	180	190	200	210	220				237
BSBMV RNA2 LB157	(158)	GTAGATATATGACATGGAAAGATGCAACTCATAATAAGTTGATGACCGACCGATGGGCACCGTATCAAGCGTCCAGGG										
												Section 4
BSBMV RNA2 NC_003503	(238)	238	250	260	270	280	290	300				316
BSBMV RNA2 LB157	(237)	GACCAATTAACCAGGCTTTGAGCCTCGATCTGTCTAAAGCCGCAAGCTTACCTGTTATTAAGGCCAATTTTAGTAGTCTC										
												Section 5
BSBMV RNA2 NC_003503	(317)	317	330	340	350	360	370	380				395
BSBMV RNA2 LB157	(316)	GGTGC TAATTGGTCTGAAGATGGTGTGTGTTGTGGCACCTATGGTTCGGTTTCCAGTTACCCCTCAATCAATTTGGTG										
												Section 6
BSBMV RNA2 NC_003503	(396)	396	410	420	430	440	450	460				474
BSBMV RNA2 LB157	(395)	CATTGGTTTTGTGGCTCAACTTATCTGACCCCTGCTTTCGCTATTCTTATGACGAAAAGTTTTTACGTTGACTAATGCCGG										
												Section 7
BSBMV RNA2 NC_003503	(475)	475	480	490	500	510	520	530	540			553
BSBMV RNA2 LB157	(474)	TGGAGCCGACAAATGCCCTCCGCCAGTTTACCGTGTGAAGTTGTGGCTGGGAGCCGACCCGAAAACCTCTGGTAAAGTCTGTA										
												Section 8
BSBMV RNA2 NC_003503	(554)	554	560	570	580	590	600	610	620			632
BSBMV RNA2 LB157	(553)	GGTACCGATGAGAGTGGCAGTTATACCTTTGACCACCCTTTACAAGCTTTTAAATCAAGCTATCCGCTTACCTGAGGTTTC										
												Section 9
BSBMV RNA2 NC_003503	(633)	633	640	650	660	670	680	690	700			711
BSBMV RNA2 LB157	(632)	TGTGGACTCGTGATAAGTTTGAACGGGAGTGAATCTGCCATGGACCCCTACTAGGGGTGTTACTCCTGCCGTTCCACG										
												Section 10
BSBMV RNA2 NC_003503	(712)	712	720	730	740	750	760	770	780			790
BSBMV RNA2 LB157	(711)	CACCAATTAGCAATTAATGCTGCTCGAACTATGGCACATAATCGAGCAGCATTAAGGCCGCGTCTGTATCCTGGTGAC										
												Section 11
BSBMV RNA2 NC_003503	(791)	791	800	810	820	830	840	850				869
BSBMV RNA2 LB157	(790)	AGTATTGAGTGGGTTGGATGGGTGCAATAGTTACCCCCCTCCACCATATGATGGGTACGATGTCCGCTTTTAGATATTA										
												Section 12
BSBMV RNA2 NC_003503	(870)	870	880	890	900	910	920	930				948
BSBMV RNA2 LB157	(869)	TAAATGAGAACTTGTCTGCTGATGATGTTGGTGGTTGGTGTACCTACACCTGATATTCCTGGTGGTCCCAATTTTGA										
												Section 13
BSBMV RNA2 NC_003503	(949)	949	960	970	980	990	1000	1010				1027
BSBMV RNA2 LB157	(948)	GGTCTCCGAGGATATTGAGCAAACTGGTCGGAATGGTTGTGGTTGATGGTCGGGTTGCTATTAGCTGCCCTGGCTGTT										
												Section 14
BSBMV RNA2 NC_003503	(1028)	1028	1040	1050	1060	1070	1080	1090				1106
BSBMV RNA2 LB157	(1027)	GGTGTGGGACTGCTGCCATACCATCGTCGCAAGTTGCGTAGTGGTTAGTTGACTAAAGAGTCTATGGTTTTCTAGGG										
												Section 15
BSBMV RNA2 NC_003503	(1107)	1107	1120	1130	1140	1150	1160	1170				1185
BSBMV RNA2 LB157	(1106)	GTTCTGGTGGCGGGGTTGATTTCACTGTTGAGTTACCAACTAGAACTACTGATGCCCTTAGTTTAGGTACCCTATTTC										
												Section 16
BSBMV RNA2 NC_003503	(1186)	1186	1200	1210	1220	1230	1240	1250				1264
BSBMV RNA2 LB157	(1185)	TGAACATGCTCCACCTCCTGTAGGTACTATGCGTCACTCGTTCCGACTACGGCGACTGATAGTCATGAGGCCCTTCCTTTT										
												Section 17
BSBMV RNA2 NC_003503	(1265)	1265	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330			1343
BSBMV RNA2 LB157	(1264)	GAAACATGGGTTTATTTAAATCTCTCTCGTGTGATTTTAGTATCGGGTGTCTGATCTCTTTTATGCGACTAGAGAAT										
												Section 18
BSBMV RNA2 NC_003503	(1344)	1344	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410			1422
BSBMV RNA2 LB157	(1343)	TTGTTACTGTGTTTAAATGGGGAGTTTGGGGTCTTATCGAACTACTGAGGCCGCTGATGAGGATGATGGTGTTTATAC										

										Section 19
(1423)	1423	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1501	
BSBMV RNA2 NC_003503 (1423)	TGATGCTGAGAGTGTCTCATTGTGGGTACTAGTGTATTGTTAATGACCAGGATCAATTTGATCTCAATACTGTGATT									
BSBMV RNA2 LB157 (1422)	TGATGCTGAGAGTGTCTCATTGTGGGTACTAGTGTATTGTTAATGACCAGGATCAATTTGATCTCAATACTGTGATT									
										Section 20
(1502)	1502	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	
BSBMV RNA2 NC_003503 (1502)	CTTGAAGGAGCATAAAGTTTAAACGGCTTCTTTAGAGGAGGCGGAACCTTAATCGTCAGGAGTCTGTFGACCATCGAGT									
BSBMV RNA2 LB157 (1501)	CTTGAAGGAGCATAAAGTTTAAACGGCTTCTTTAGAGGAGGCGGAACCTTAATCGTCAGGAGTCTAFGACCATCGAGT									
										Section 21
(1581)	1581	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1659		
BSBMV RNA2 NC_003503 (1581)	TTGCCGATGAGGAACGTCGTACGCTCATGCATAAGTTAGAAAGCGATAGACTTGAGGCGACGCATAAGGTGAATAAGGC									
BSBMV RNA2 LB157 (1580)	TTGCCGATGAGGAACGTCGTACGCTCATGCATAAGTTAGAAAGCGATAGACTTGAGGCGACGCATAAGGTGAATAAGGC									
										Section 22
(1660)	1660	1670	1680	1690	1700	1710	1720	1738		
BSBMV RNA2 NC_003503 (1660)	TGCTGCTGATGCTGAGGCAGCTCTATCAGTTGCTGTTCTGGCTGCTAAAGAGGCTCGTACTTATGATGATAAATGGCT									
BSBMV RNA2 LB157 (1659)	TGCTGCTGATGCTGAGGCAGCTCTATCAGTTGCTGTTCTGGCTGCTAAAGAGGCTCGTACTTATGATGATAAATGGCT									
										Section 23
(1739)	1739	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1817		
BSBMV RNA2 NC_003503 (1739)	TTTGATAGAGCTTGTAAGGAAAAGGAGCTAAGGCTAAGAGAGCTTGAGGTTGAGCGTATGCCCGGGAAGACTGAAAGAT									
BSBMV RNA2 LB157 (1738)	TTTGATAGAGCTTGTAAGGAAAAGGAGCTAAGGCTAAGAGAGCTTGAGGTTGAGCGTATGCCCGGGAAGACTGAAAGAT									
										Section 24
(1818)	1818	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1896		
BSBMV RNA2 NC_003503 (1818)	ATATTCACACAGGTATACAAGGTGGTGTCAACTCGCTGGTGTCTTAGCTGTCCGGTAGTATGTTACGAACACGTGGTGT									
BSBMV RNA2 LB157 (1817)	ATATTCACACAGGTATACAAGGTGGTGTCAACTCGCTGGTGTCTTAGCTGTCCGGTAGTATGTTACGAACACGTGGTGT									
										Section 25
(1897)	1897	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1975		
BSBMV RNA2 NC_003503 (1897)	TAGTAATATAACTCCGAGTAATGCTAGTGGTAGTCCACCCTGATTGGTCGTGTTCCGTAGTGTCTCAGCCCGTACCC									
BSBMV RNA2 LB157 (1896)	TAGTAATATAACTCCGAGTAATGCTAGTGGTAGTCCACCCTGATTGGTCGTGTTCCGTAGTGTCTCAGCCCGTACCC									
										Section 26
(1976)	1976	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2054		
BSBMV RNA2 NC_003503 (1976)	ACTAGTTTGTCTGGTGGTCTGTTCTGGGGCTAATAATAATAATAGTGTGGCAGTGTAGTTCAGGAAGTAGGGGTAG									
BSBMV RNA2 LB157 (1975)	ACTAGTTTGTCTGGTGGTCTGTTCTGGGGCTAATAATAATAATAGTGTGGCAGTGTAGTTCAGGAAGTAGGGGTAG									
										Section 27
(2055)	2055	2060	2070	2080	2090	2100	2110	2120	2133	
BSBMV RNA2 NC_003503 (2055)	AGTCGTTAGGGTATAATTCGGCTATTCGCAATCATAACACCTTTTGGTCCAAACTTCGTATTGGAAGTGAATGGCGCCA									
BSBMV RNA2 LB157 (2054)	AGTCGTTAGGGTATAATTCGGCTATTCGCAATCATAACACCTTTTGGTCCAAACTTCGTATTGGAAGTGAATGGCGCCA									
										Section 28
(2134)	2134	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2212	
BSBMV RNA2 NC_003503 (2134)	GAACAGCATAAGCAGAATGCAGCGAGACCGCTAGCGGGCGCGGGAATTCCTCCGTCGCTCCCGCGGTATGAGTAAGG									
BSBMV RNA2 LB157 (2133)	GAACAGCATAAGCAGAATGCAGCGAGACCGCTAGCGGGCGCGGGAATTCCTCCGTCGCTCCCGCGGTATGAGTAAGG									
										Section 29
(2213)	2213	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2291	
BSBMV RNA2 NC_003503 (2213)	ATGACTGGTCTGTCACCCACCCAGATGATGTTTCTCTATTATTGAGAAAACATTGGTGGAGGATGGGTACAAATGGCA									
BSBMV RNA2 LB157 (2212)	ATGACTGGTCTGTCACCCACCCAGATGATGTTTCTCTATTATTGAGAAAACATTGGTGGAGGATGGGTACAAATGGCA									
										Section 30
(2292)	2292	2300	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	
BSBMV RNA2 NC_003503 (2292)	TGGGGTAAAACCCGGTCAATTCGATTGGGATAAGCTAGAGCAGTCTGGTGCATTAAGAATTTAAAGGTACTTTAGAA									
BSBMV RNA2 LB157 (2291)	TGGGGTAAAACCCGGTCAATTCGATTGGGATAAGCTAGAGCAGTCTGGTGCATTAAGAATTTAAAGGTACTTTAGAA									
										Section 31
(2371)	2371	2380	2390	2400	2410	2420	2430	2449		
BSBMV RNA2 NC_003503 (2371)	GGCGAGGTGCGATAGTAGTTGTTTCATTAAACATGTAACGCCGCGGCAATTAAGTTGGATATAGTAGAAAAGATTAGACGTGT									
BSBMV RNA2 LB157 (2370)	GGCGAGGTGCGATAGTAGTTGTTTCATTAAACATGTAACGCCGCGGCAATTAAGTTGGATATAGTAGAAAAGATTAGACGTGT									
										Section 32
(2450)	2450	2460	2470	2480	2490	2500	2510	2528		
BSBMV RNA2 NC_003503 (2450)	CTTCTGACTGGTCCGCTCGGGTAGGCATTGTGTTAGGTGCGCCTGGTGTGGGAAAATCGACTTCAATTAAGCACATCTT									
BSBMV RNA2 LB157 (2449)	CTTCTGACTGGTCCGCTCGGGTAGGCATTGTGTTAGGTGCGCCTGGTGTGGGAAAATCGACTTCAATTAAGCACATCTT									
										Section 33
(2529)	2529	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2607		
BSBMV RNA2 NC_003503 (2529)	GGACACTTATGGTTCGTTATAAAATGGTGTATGTTTACCAGTCAAACAGTTACTCGACGGGGTGTTCGGGTAGA									
BSBMV RNA2 LB157 (2528)	GGACACTTATGGTTCGTTATAAAATGGTGTATGTTTACCAGTCAAACAGTTACTCGACGGGGTGTTCGGGTAGA									
										Section 34
(2608)	2608	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2686		
BSBMV RNA2 NC_003503 (2608)	ATGGACACTTTTCTGATTGATGACATATTTAGTCGCTCTGTAGACTATGGTAAGTACCACACTATGTTAGTAGACGAGA									
BSBMV RNA2 LB157 (2607)	ATGGACACTTTTCTGATTGATGACATATTTAGTCGCTCTGTAGACTATGGTAAGTACCACACTATGTTAGTAGACGAGA									
										Section 35
(2687)	2687	2700	2710	2720	2730	2740	2750	2765		
BSBMV RNA2 NC_003503 (2687)	TCACTCGCGTTCATATGTGTGAGGTCCTGGTGTGGCTGGTTATTTAGGCATTAAAAATGTTATATGTTTCGGCGACCC									
BSBMV RNA2 LB157 (2686)	TCACTCGCGTTCATATGTGTGAGGTCCTGGTGTGGCTGGTTATTTAGGCATTAAAAATGTTATATGTTTCGGCGACCC									
										Section 36
(2766)	2766	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2844		
BSBMV RNA2 NC_003503 (2766)	TGCACAAGGTATTAACTTTAAAGGCAGGGTCTGCTGTTAACTATAACTTTCCTGTTATTGCTGAGTGTACTCTAGTCGT									
BSBMV RNA2 LB157 (2765)	TGCACAAGGTATTAACTTTAAAGGCAGGGTCTGCTGTTAACTATAACTTTCCTGTTATTGCTGAGTGTACTCTAGTCGT									

									Section 37
(2845)	2845	2850	2860	2870	2880	2890	2900	2910	2923
BSBMV RNA2 NC_003503 (2845)	AGGTTTCGGGGTTGCCACGGCTGATCTCATAAACTCCTGCAATGGTGGTGGGAAATCAGTTGTTGGTAATAACGATGTTA								
BSBMV RNA2 LB157 (2844)	AGGTTTCGGGGTTGCCACGGCTGATCTCATAAACTCCTGCAATGGTGGTGGGAAATCAGTTGTTGGTAATAACGATGTTA								
									Section 38
(2924)	2924	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990	3002
BSBMV RNA2 NC_003503 (2924)	AAGACAACCTGGACATTTGAAGAATTTGCGCGTAAAAATCGAGGAAATGTCCACTGTGCTTGTGCAACACACGCCACAAA								
BSBMV RNA2 LB157 (2923)	AAGACAACCTGGACATTTGAAGAATTTGCGCGTAAAAATCGAGGAAATGTCCACTGTGCTTGTGCAACACACGCCACAAA								
									Section 39
(3003)	3003	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3081
BSBMV RNA2 NC_003503 (3003)	GGAGTTCTTAGCTGATGATGGCATTGAAGCTGTATATTACGAAGATGCACAAGGTATGACTTATGATGTGGTTACCATT								
BSBMV RNA2 LB157 (3002)	GGAGTTCTTAGCTGATGATGGCATTGAAGCTGTATATTACGAAGATGCACAAGGTATGACTTATGATGTGGTTACCATT								
									Section 40
(3082)	3082	3090	3100	3110	3120	3130	3140	3150	3160
BSBMV RNA2 NC_003503 (3082)	GTGCTTAAGGATGAGTTTGACGACGATGCCATCTGTGATAGCAATGTGAGAGCTGTGTTGTTAACTAGGGCTAGAAAAG								
BSBMV RNA2 LB157 (3081)	GTGCTTAAGGATGAGTTTGACGACGATGCCATCTGTGATAGCAATGTGAGAGCTGTGTTGTTAACTAGGGCTAGAAAAG								
									Section 41
(3161)	3161	3170	3180	3190	3200	3210	3220		3239
BSBMV RNA2 NC_003503 (3161)	GCGGTTTACTTAAGGTTGATCCTAATATTGCGGCCAGGTTTAAAAATGGTGTATTTTAAATTCACGTGGAGTTAGTAAGGC								
BSBMV RNA2 LB157 (3160)	GCGGTTTACTTAAGGTTGATCCTAATATTGCGGCCAGGTTTAAAAATGGTGTATTTTAAATTCACGTGGAGTTAGTAAGGC								
									Section 42
(3240)	3240	3250	3260	3270	3280	3290	3300		3318
BSBMV RNA2 NC_003503 (3240)	TTGCACAGGTGATACCTTTTTCGAGGATAGATAATGTCTAGAGAAAATACGGCCCGTCTAAATAAGAAATGTGCCATTATG								
BSBMV RNA2 LB157 (3239)	TTGCACAGGTGATACCTTTTTCGAGGATAGATAATGTCTAGAGAAAATACGGCCCGTCTAAATAAGAAATGTGCCATTATG								
									Section 43
(3319)	3319	3330	3340	3350	3360	3370	3380		3397
BSBMV RNA2 NC_003503 (3319)	TTGTTGGTGTGTTGTTGTTGCTTTCTTTGATTGCTGGCTTTCATGCAACAAAAACATAAGACGCCTCTGTTGGCGA								
BSBMV RNA2 LB157 (3318)	TTGTTGGTGTGTTGTTGTTGCTTTCTTTGATTGCTGGCTTTCATGCAACAAAAACATAAGACGCCTCTGTTGGCGA								
									Section 44
(3398)	3398	3410	3420	3430	3440	3450	3460		3476
BSBMV RNA2 NC_003503 (3398)	TTACGGGGTTCCAACCTTTTTCGAACGGTGGAAAGTATAGGGATGGGACTAGGCTCGCGGACTTAAATAGTAATAATCAT								
BSBMV RNA2 LB157 (3397)	TTACGGGGTTCCAACCTTTTTCGAACGGTGGAAAGTATAGGGATGGGACTAGGCTCGCGGACTTAAATAGTAATAATCAT								
									Section 45
(3477)	3477	3490	3500	3510	3520	3530	3540		3555
BSBMV RNA2 NC_003503 (3477)	CGTGCCTATGGCTGTGGAGGTTCTAAATCTAGTGTGACTGGCAAGGTTGGGCAGCAGCTGCTTGTGCTTGCCCTAGTAG								
BSBMV RNA2 LB157 (3476)	CGTGCCTATGGCTGTGGAGGTTCTAAATCTAGTGTGACTGGCAAGGTTGGGCAGCAGCTGCTTGTGCTTGCCCTAGTAG								
									Section 46
(3556)	3556	3570	3580	3590	3600	3610	3620		3634
BSBMV RNA2 NC_003503 (3556)	TAGCTGTCTTTGTTTGTTCATGCGTGGTGTGCTGGTCTCTCTGAGCATATTTGCAATGGTCTTGTGGTTAAGGTTG								
BSBMV RNA2 LB157 (3555)	TAGCTGTCTTTGTTTGTTCATGCGTGGTGTGCTGGTCTCTCTGAGCATATTTGCAATGGTCTTGTGGTTAAGGTTG								
									Section 47
(3635)	3635	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3713
BSBMV RNA2 NC_003503 (3635)	ATTTTCTACTATAGTTTGTATATAGTTGCTGGTGTGTTAGTTGTGAGTGTGCTGTACTCACCATTCTTTAGTAATGA								
BSBMV RNA2 LB157 (3634)	ATTTTCTACTATAGTTTGTATATAGTTGCTGGTGTGTTAGTTGTGAGTGTGCTGTACTCACCATTCTTTAGTAATGA								
									Section 48
(3714)	3714	3720	3730	3740	3750	3760	3770	3780	3792
BSBMV RNA2 NC_003503 (3714)	AGTGAAGGCTGGCGGTTATGCCGGTGCCATTTTCCAAATGGGGGTTGCATTATGGATAGGAATTCGTTTGCACAGTTT								
BSBMV RNA2 LB157 (3713)	AGTGAAGGCTGGCGGTTATGCCGGTGCCATTTTCCAAATGGGGGTTGCATTATGGATAGGAATTCGTTTGCACAGTTT								
									Section 49
(3793)	3793	3800	3810	3820	3830	3840	3850	3860	3871
BSBMV RNA2 NC_003503 (3793)	GGTGGTTGTGATATCCCAAAATATGTGGCTGATTCATCTCTCGTGTGGCCATCAAGGAATTAGACGCCGATATAAAAG								
BSBMV RNA2 LB157 (3792)	GGTGGTTGTGATATCCCAAAATATGTGGCTGATTCATCTCTCGTGTGGCCATCAAGGAATTAGACGCCGATATAAAAG								
									Section 50
(3872)	3872	3880	3890	3900	3910	3920	3930	3940	3950
BSBMV RNA2 NC_003503 (3872)	CCGACTTGAATAGTGTGTTGCTAAAAGAGTAGTGTGTACGAAGGTTTGGCACAGTTATGTTATAGGGTTTCTCTTG								
BSBMV RNA2 LB157 (3871)	CCGACTTGAATAGTGTGTTGCTAAAAGAGTAGTGTGTACGAAGGTTTGGCACAGTTATGTTATAGGGTTTCTCTTG								
									Section 51
(3951)	3951	3960	3970	3980	3990	4000	4010		4029
BSBMV RNA2 NC_003503 (3951)	GTTGGTGTGTTTGTTCATGGTGTGTTTAAATGTTGTTGTGTGGTTTTGGTATCATAGTTAATTAGGTGAACGCATCTTA								
BSBMV RNA2 LB157 (3950)	GTTGGTGTGTTTGTTCATGGTGTGTTTAAATGTTGTTGTGTGGTTTTGGTATCATAGTTAATTAGGTGAACGCATCTTA								
									Section 52
(4030)	4030	4040	4050	4060	4070	4080	4090		4108
BSBMV RNA2 NC_003503 (4030)	TTATTAGTAATGGAGAAAAGTAATAGCATAGGGGTGATGTTAAGGACCCTATCACAAATGATTTGATGTTGTTTAGCG								
BSBMV RNA2 LB157 (4029)	TTATTAGTAATGGAGAAAAGTAATAGCATAGGGGTGATGTTAAGGACCCTATCACAAATGATTTGATGTTGTTTAGCG								
									Section 53
(4109)	4109	4120	4130	4140	4150	4160	4170		4187
BSBMV RNA2 NC_003503 (4109)	TTAAATGTGGCAACTGGTGCATTATTCACAAATCATGTTTTTGTGACTTACCCTGGAAAGAACGATGATGAGAAAAGTCGT								
BSBMV RNA2 LB157 (4108)	TTAAATGTGGCAACTGGTGCATTATTCACAAATCATGTTTTTGTGACTTACCCTGGAAAGAACGATGATGAGAAAAGTCGT								
									Section 54
(4188)	4188	4200	4210	4220	4230	4240	4250		4266
BSBMV RNA2 NC_003503 (4188)	TAAAGACACGTGATAGTTGCAATTTTCACGTAATAATGTGATCTTGTCCAGTAAAGTCACTTTTAAAGCGAACACACAGA								
BSBMV RNA2 LB157 (4187)	TAAAGACACGTGATAGTTGCAATTTTCACGTAATAATGTGATCTTGTCCAGTAAAGTCACTTTTAAAGCGAACACACAGA								

									Section 55	
	(4267)	4267	4280	4290	4300	4310	4320	4330	4345	
BSBMV RNA2 NC_003503 (4267)		GATCATTTGGAAATGGTTGTCTAAAGGTTTCGTTTCGTGTTAATAGAAATTTTCTATTGTAGGTGCTTGTAGTAAGTGCC								
BSBMV RNA2 LB157 (4266)		GATCATCTGGAAATGGTTGTCTAAAGGTTTCGTTTCGTGTTAATAGAAATTTTCTATTGTAGGTGCTTGTAGTAAGTGCC								
									Section 56	
	(4346)	4346	4360	4370	4380	4390	4400	4410	4424	
BSBMV RNA2 NC_003503 (4346)		GCGGTGTGTTTGATAGTTGTGCGCAGCAAGATGAGTTGGACAACAATGTTGTCTAACTCTTTAAAGAGACTGTTGTATA								
BSBMV RNA2 LB157 (4345)		GCGGTGTGTTTGATAGTTGTGCGCAGCAAGATGAGTTGGACAACAATGTTGTCTAACTCTTTAAAGAGACTGTTGTATA								
									Section 57	
	(4425)	4425	4430	4440	4450	4460	4470	4480	4490	4503
BSBMV RNA2 NC_003503 (4425)		TATAATAATCAGGGCCATGCCACAGGCCTCCCATTTGGGTTGTTCCGAGGGTTGTTGTGGTGATATAAATGATATTATTA								
BSBMV RNA2 LB157 (4424)		TATAATAATCAGGGCCATGCCACAGGCCTCCCATTTGGGTTGTTCCGAGGGTTGTTGTGGTGATATAAATGATATTATTA								
										Section 58
	(4504)	4504	4510	4520	4530	4540	4550	4560	4570	4582
BSBMV RNA2 NC_003503 (4504)		ATAATAATAATAGTGCATCGGTAATATATTATTGTTACTGGTGTAAAGGTTGTAATGACTGACCGGGTGTGAATTGT								
BSBMV RNA2 LB157 (4503)		ATAATAATAATAGTGCATCGGTAATATATTATTGTTACTGGTGTAAAGGTTGTAATGACTGACCGGGTGTGAATTGT								
										Section 59
	(4583)	4583	4590	4600	4616					
BSBMV RNA2 NC_003503 (4583)		ACCGGTCCTTGTAGGGTTTATTTTCAGTTTATTTG								
BSBMV RNA2 LB157 (4582)		ACCGGTCCTTGTAGGGTTTATTTTCAGTTTATTTG								

		Section 19									
	(1423)	1423	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1501	
BSBMV RNA3 NC_003507	(1423)	GAACAAGTGATCCTCGGAAATATCCTTGCCTTCACAAACGTGTATGGCGTGTTCCTGCCTATCTGGGTTTTACTATG									
BSBMV RNA3 clone E	(1423)	GAACAAGTGATCCTCGGAAATATCCTTGCCTTCACAAACGTGTATGGCGTGTTCCTGCCTATCTGGGTTTTACTATG									
		Section 20									
	(1502)	1502	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	
BSBMV RNA3 NC_003507	(1502)	AGCCTTTATATTTCAAATATAAGAATACATAGTAGTTAACAGGCTCGTTTGCAGCCTCCCATTGGGTTTTATGCAGA									
BSBMV RNA3 clone E	(1502)	AGCCTTTATATTTCAAATATAAGAATACATAGTAGTTAACAGGCTCGTTTGCAGCCTCCCATTGGGTTTTATGCAGA									
		Section 21									
	(1581)	1581	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1659		
BSBMV RNA3 NC_003507	(1581)	CACAAAAGATGGCTTATTGGTTATGCTTAACCTCATATCTATATCTTTATCGTTATATTTATGTTTTATTTGGTTGTA									
BSBMV RNA3 clone E	(1581)	CACAAAAGATGGCTTATTGGTTATGCTTAACCTCATATCTATATCTTTATCGTTATATTTATGTTTTATTTGGTTGTA									
		Section 22									
	(1660)	1660	1670	1680	1690	1700	1710	1720			
BSBMV RNA3 NC_003507	(1660)	TTGTACTGACTGGGTGTGAAATGTACCAGTCCTTGTAGGGTGTACCTTCAGTATATGAG									
BSBMV RNA3 clone E	(1660)	TTGTACTGACTGGGTGTGAAATGTACCAGTCCTTGTAGGGTGTACCTTCAGTATATGAG-									

Appendice B6. Allineamento delle sequenze nucleotidiche del clone dell'RNA4 di BSBMV (LB155) con la sequenza NC_003508.

		Section 1																					
		(1)	1	10	20	30	40	50	60					79									
BSBMV RNA4 NC_003508	(1)	AAATTC	AAAACT	CAAAA	TATAA	TTTTG	TATTCC	AGTTG	ATTAT	CTGTAA	AAATAA	ATCTCG	GTTAA	CTAGTT	TGCCG	AT							
BSBMV RNA4 LB155	(1)	AAATTC	AAAACT	CAAAA	TATAA	TTTTG	TATTCC	AGTTG	ATTAT	CTGTAA	AAATAA	ATCTCG	GTTAA	CTAGTT	TGCCG	AT							
		Section 2																					
		(80)	80	90	100	110	120	130	140					158									
BSBMV RNA4 NC_003508	(80)	TAACA	ACTCG	AGTCT	GATCT	GCTTA	AAAGAT	CCCCA	AATATT	TATCA	AATATT	TATCA	AATTTA	ACGTC	GCTACT	CTC							
BSBMV RNA4 LB155	(80)	TAACA	ACTCG	AGTCT	GATCT	GCTTA	AAAGAT	CCCCA	AATATT	TATCA	AATATT	TATCA	AATTTA	ACGTC	GCTACT	CTC							
		Section 3																					
		(159)	159	170	180	190	200	210	220					237									
BSBMV RNA4 NC_003508	(159)	ATCTA	CTGTT	GTTG	ATTG	TGGT	TGGT	AGTCA	TGGAA	AGGTGC	CTGTG	CTTGG	TGTG	CATG	ATCAG	TCCGG	TTTGT	GG					
BSBMV RNA4 LB155	(159)	ATCTA	CTGTT	GTTG	ATTG	TGGT	TGGT	AGTCA	TGGAA	AGGTGC	CTGTG	CTTGG	TGTG	CATG	ATCAG	TCCGG	TTTGT	GG					
		Section 4																					
		(238)	238	250	260	270	280	290	300					316									
BSBMV RNA4 NC_003508	(238)	TTGCA	GAAAG	CTACT	AGGT	GAGGC	TAAAGCC	CGTGT	PCGGA	ACCTT	AGATT	CACG	AGCCC	CGC	GTG	ATTA	ATCG	GGTT	T				
BSBMV RNA4 LB155	(238)	TTGCA	GAAAG	CTACT	AGGT	GAGGC	TAAAGCC	CGTGT	PCGGA	ACCTT	AGATT	CACG	AGCCC	CGC	GTG	ATTA	ATCG	GGTT	T				
		Section 5																					
		(317)	317	330	340	350	360	370	380					395									
BSBMV RNA4 NC_003508	(317)	GTCAC	TGGGA	TCCGG	TCTAT	CAGTA	AGAGC	TATTC	CTTGT	TAATAC	CCCTT	TTGG	TAGT	AACA	AATAT	GGCC	GATG	T					
BSBMV RNA4 LB155	(317)	GTCAC	TGGGA	TCCGG	TCTAT	CAGTA	AGAGC	TATTC	CTTGT	TAATAC	CCCTT	TTGG	TAGT	AACA	AATAT	GGCC	GATG	T					
		Section 6																					
		(396)	396	410	420	430	440	450	460					474									
BSBMV RNA4 NC_003508	(396)	GGAGA	TTTGC	CGATG	TCAGG	ATAGT	CAAGG	AACTT	TGCTT	AAATG	TACC	GGAT	ATGAT	CTTAC	TCTC	GTGT	GATG	TTT					
BSBMV RNA4 LB155	(394)	GGAGA	TTTGC	CGATG	TCAGG	ATAGT	CAAGG	AACTT	TGCTT	AAATG	TACC	GGAT	ATGAT	CTTAC	TCTC	GTGT	GATG	TTT					
		Section 7																					
		(475)	475	480	490	500	510	520	530	540					553								
BSBMV RNA4 NC_003508	(475)	GAGCG	AATTG	ATATT	GGCCC	CTTAG	GGGTG	TGTG	CAATAT	CGGTG	TGTT	TATTC	ATAT	GTCC	GTGAT	TCGTC	CGT	CGT	G				
BSBMV RNA4 LB155	(473)	GAGCG	AATTG	ATATT	GGCCC	CTTAG	GGGTG	TGTG	CAATAT	CGGTG	TGTT	TATTC	ATAT	GTCC	GTGAT	TCGTC	CGT	CGT	G				
		Section 8																					
		(554)	554	560	570	580	590	600	610	620					632								
BSBMV RNA4 NC_003508	(554)	ATATT	TTTCC	TTGGC	TTAAC	AAGATT	ACG	-----															
BSBMV RNA4 LB155	(552)	ATATT	TTTCC	TTGGC	TTAAC	AAGATT	ACG	CTAT	TAA	TGTT	TCTG	TGAT	GTG	CCAG	TAGT	AGT	TTT	CGC	GT	TGG			
		Section 9																					
		(633)	633	640	650	660	670	680	690	700					711								
BSBMV RNA4 NC_003508	(583)	-----																					
BSBMV RNA4 LB155	(631)	TCAGT	GTCCG	GTGTT	GTGTTT	TACAT	GTGAT	AGAGT	TGGT	GTCTT	CCATG	TTGG	CAAG	TGAT	CCCT	GGAT	GT	TT	CAT				
		Section 10																					
		(712)	712	720	730	740	750	760	770	780					790								
BSBMV RNA4 NC_003508	(583)	-----																					
BSBMV RNA4 LB155	(710)	GGTGC	ACCAT	GTTATA	ATGGT	TAAAT	GTGTT	GTCCA	CGAT	GA	ACTTG	TGAC	GTGG	CTATT	GATA	ACGA	ATTGG	CTG	TTT				
		Section 11																					
		(791)	791	800	810	820	830	840	850					869									
BSBMV RNA4 NC_003508	(599)	-----																					
BSBMV RNA4 LB155	(789)	TTAGC	TGTG	TTTCT	CTCG	AGC	TATG	ATCC	GATG	SATG	GAT	TAA	GGAT	TTTGT	TCC	TGAT	TCG	GA	AG	ATTG	TATG	TTG	
		Section 12																					
		(870)	870	880	890	900	910	920	930					948									
BSBMV RNA4 NC_003508	(611)	-----																					
BSBMV RNA4 LB155	(868)	GAGT	GATG	TCA	TATAG	ATG	TGG	ATC	AGT	ATAC	CCCT	TCC	CTA	ATG	AGA	ATG	GGT	TG	GCT	TAT	TG	CT	G
		Section 13																					
		(949)	949	960	970	980	990	1000	1010					1027									
BSBMV RNA4 NC_003508	(611)	-----																					
BSBMV RNA4 LB155	(947)	TTTTA	TAGT	ACCC	CGCG	CTATT	GCGG	TGCT	CTTT	TCG	TAT	CCAT	CAAC	ACCT	CCT	TGTT	TCG	TTTT	TAT	TAG			
		Section 14																					
		(1028)	1028	1040	1050	1060	1070	1080	1090					1106									
BSBMV RNA4 NC_003508	(611)	-----	CTTTT	-----	-----																		
BSBMV RNA4 LB155	(1026)	TCAAC	GACG	AATT	GT	TAA	TAA	ACG	TGG	CACT	CAAC	GAT	TTG	TGC	GT	GGT	TGG	TG	AG	CC	GAT	GG	CT
		Section 15																					
		(1107)	1107	1120	1130	1140	1150	1160	1170					1185									
BSBMV RNA4 NC_003508	(617)	-----	CTACA	ATT	-----				TGTGG	TGTC	AG	GATT	ATGG	TGAT	GT	TATAC	AT						
BSBMV RNA4 LB155	(1105)	TAAT	CGAC	CA	ATT	CTA	AG	AA	TGG	TGG	CG	CG	CT	TTG	CTACA	AAT	TGTGG	TGTC	AG	GATT	ATGG	TGAT	GT
		Section 16																					
		(1186)	1186	1200	1210	1220	1230	1240	1250					1264									
BSBMV RNA4 NC_003508	(657)	-----																					
BSBMV RNA4 LB155	(1184)	TGTAC	GCTGG	CGCG	GGTAT	ATGTT	GTGTT	TTC	GAA	CAAG	ATTT	CAGT	GATT	ATTT	TG	TGAT	TGTT	AGT	CCG	AT	GAT	GT	
		Section 17																					
		(1265)	1265	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330					1343								
BSBMV RNA4 NC_003508	(736)	-----																					
BSBMV RNA4 LB155	(1263)	TGTTT	TACT	TATC	GTAC	GAAT	TTTGG	TATG	ATAG	TGTAT	GTCC	GAAG	ACG	TAA	ACT	TAC	TGT	AGT	GATA	ACT	GTAA		
		Section 18																					
		(1344)	1344	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410					1422								
BSBMV RNA4 NC_003508	(815)	-----																					
BSBMV RNA4 LB155	(1342)	CTATA	TGTT	TG	TAT	CAG	TTC	GAT	TGG	TGT	TCC	TGC	AT	TAA	T	CG	TAT	TTG	AG	GGT	GGT	AA	

		Section 19									
		1423	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1501	
BSBMV RNA4 NC_003508 (894)	(1423)	TGGTTTTCCCGACTCTTGGTGTGAACCGAGTGATCCTTGGAAACATCCTTTCGTCTCACAAACGGTATGGCGTGT									
BSBMV RNA4 LB155 (1421)	(1421)	TGGTTTTCCCGACTCTTGGTGTGAACCGAGTGATCCTTGGAAACATCCTTTCGTCTCACAAACGGTATGGCGTGT									
		Section 20									
		1502	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	
BSBMV RNA4 NC_003508 (973)	(1502)	CCTGCTTACCTGGGTTTCTACTATGAGCCCTTATATTTCAAATATAAAGAATACATAGTTGTTTAAACAGGCTCSTCTGC									
BSBMV RNA4 LB155 (1500)	(1500)	CCTGCTTACCTGGGTTTCTACTATGAGCCCTTATATTTCAAATATAAAGAATACATAGTTGTTTAAACAGGCTTGT									
		Section 21									
		1581	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1659		
BSBMV RNA4 NC_003508 (1052)	(1581)	AAGCCTCCCATTTGGGTTTATGCAGACACAAAAGATGGCTTATTGGTTATGCTAAACCTCATATCTTTGTATTTGTG-T									
BSBMV RNA4 LB155 (1579)	(1579)	AAGCCTCCCATTTGGGTTTATGCAGACACAAAAGATGGCTTATTGGTTATGCTAAACCTCATATCTTTGTATTTGTG-T									
		Section 22									
		1660	1670	1680	1690	1700	1710	1720	1733		
BSBMV RNA4 NC_003508 (1130)	(1660)	GGTTTGGTTTGGTTGTATTGTACTGACTGGGTGTGAAATGTACCAGTCCTTGTAGGGTGTATTTTCAGTTTATTG									
BSBMV RNA4 LB155 (1657)	(1657)	GGTTTGGTTTGGTTGTATTGTACTGACTGGGTGTGAAATGTACCAGTCCTTGTAGGGTGTATTTTCAGTTTATTG									

		Section 16									
	(1186)	1186		1200	1210	1220	1230	1240	1250		1264
BSBMV RNA3 NC_003507	(1172)	----	GACGACGCTA	ACACAG	ATGATGGTGATTAA	ATTTT	TCGTCTC	-----	TTGACGTTAAACATCTATG		
BSBMV LB89 chimera	(597)	----	GACGACGCTA	ACACAG	ATGATGGTGATTAA	ATTTT	TCGTCTC	-----	TTGACGTTAAACATCTATG		
BSBMV RNA4 NC_003508	(638)	TTAT	GTGATGTTATACA	TTGTACGCTGGC	CGGTATATGTTGTT	TGTTC	GAACAAGA	TTT	CAGTGA	TTATTGGTG	
		Section 17									
	(1265)	1265	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330		1343
BSBMV RNA3 NC_003507	(1234)	----	TTAGTCCGAAGA	GTTAAACTACG	TGTCGT	-----	TTTA	FATGA	AGTGTGGG	TCCGAAGACGT	AAACTA
BSBMV LB89 chimera	(659)	----	TTAGTCCGAAGA	GTTAAACTACG	TGTCGT	-----	TTTA	FATGA	AGTGTGGG	TCCGAAGACGT	AAACTA
BSBMV RNA4 NC_003508	(717)	ATTG	TTAGTCCGATGATG	TGTTGTTT	TAGTTA	TCGTAC	GAAATA	TTTGTG	TATGATAGTGTAT	GTCCGAAGACGT	AAACTA
		Section 18									
	(1344)	1344	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410		1422
BSBMV RNA3 NC_003507	(1300)	CATATAGTAATG	ATTGTA	ACTATGTG	TTCGGTAGCA	ATCCGAATG	ATGTTG	TTCCTCGCA	CATTGATCGTATA	TTTGAGG	
BSBMV LB89 chimera	(725)	CATATAGTAATG	ATTGTA	ACTATGTG	TTCGGTAGCA	ATCCGAATG	ATGTTG	TTCCTCGCA	CATTGATCGTATA	TTTGAGG	
BSBMV RNA4 NC_003508	(796)	CATG	TAGTGATAAC	TGTA	ACTATA	TGTTGTGAT	CAGTTCGAT	TGGTGTG	TTCCTCGCAT	ATTAA	TTCGTATTTGAGG
		Section 19									
	(1423)	1423	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490		1501
BSBMV RNA3 NC_003507	(1379)	GTGGTAGGTA	AAAAATA	GTGTG	TGGTTATCCCGACTCT	TGTTTGAAC	A	AGTGATCCTCGGAAA	TATCCTTC	CGT	
BSBMV LB89 chimera	(804)	GTGGTAGGTA	AAAAATA	GTGTG	TGGTTATCCCGACTCT	TGTTTGAAC	A	AGTGATCCTCGGAAA	TATCCTTC	CGT	
BSBMV RNA4 NC_003508	(874)	GTGGTAGGTA	AAAAATA	GTGTG	TGGTTATCCCGACTCT	TGTTGAA	CGAGTGATCCT	TGGAAA	CATCCT	T	CGT
		Section 20									
	(1502)	1502	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570		1580
BSBMV RNA3 NC_003507	(1456)	CACAAACG	TGTATGGCGT	GTTTCCTG	CTATCTGGGTTT	TACTATGAGCC	TTATATTTCAA	AATATAAGA	AATACATA		
BSBMV LB89 chimera	(882)	CACAAACG	TGTATGGCGT	GTTTCCTG	CTATCTGGGTTT	TACTATGAGCC	TTATATTTCAA	AATATAAGA	AATACATA		
BSBMV RNA4 NC_003508	(951)	CACAAACG	TGTATGGCGT	GTTTCCTG	CTATCTGGGTTT	TACTATGAGCC	TTATATTTCAA	AATATAAGA	AATACATA		
		Section 21									
	(1581)	1581	1590	1600	1610	1620	1630	1640			1659
BSBMV RNA3 NC_003507	(1534)	GTAGTTTAA	CAGGCTCGT	TGCAAGCCT	CCCATTGGGTTT	ATGCAGACACAAAA	AGATGGCT	TATTGGTTATGCT	TAA		
BSBMV LB89 chimera	(960)	GTAGTTTAA	CAGGCTCGT	TGCAAGCCT	CCCATTGGGTTT	ATGCAGACACAAAA	AGATGGCT	TATTGGTTATGCT	TAA		
BSBMV RNA4 NC_003508	(1030)	GTAGTTTAA	CAGGCTCGT	TGCAAGCCT	CCCATTGGGTTT	ATGCAGACACAAAA	AGATGGCT	TATTGGTTATGCT	TAA		
		Section 22									
	(1660)	1660	1670	1680	1690	1700	1710	1720			1738
BSBMV RNA3 NC_003507	(1613)	CTCATATCTA	TATCTTTAT	CGTTATATTTA	TGTTT	TTTGGTTG	TATTGTACTGACT	GGGTGTGAAAT	GTACCAGTCC		
BSBMV LB89 chimera	(1039)	CTCATATCTA	TATCTTTAT	CGTTATATTTA	TGTTT	TTTGGTTG	TATTGTACTGACT	GGGTGTGAAAT	GTACCAGTCC		
BSBMV RNA4 NC_003508	(1109)	CTCATATCTA	TATCTTTAT	CGTTATATTTA	TGTTT	TTTGGTTG	TATTGTACTGACT	GGGTGTGAAAT	GTACCAGTCC		
		Section 23									
	(1739)	1739	1750		1767						
BSBMV RNA3 NC_003507	(1692)	TTGTAGGGT	GTA	CTTCAGT	TATTG	AAG					
BSBMV LB89 chimera	(1118)	TTGTAGGGT	GTA	CTTCAGT	TATTG	---					
BSBMV RNA4 NC_003508	(1178)	TTGTAGGGT	GTA	TTTCAGT	TATTG	---					

BIBLIOGRAFIA

- Adams M. 2002. Plant virus vector interactions. *Advances in Botanical Research* vol. 36 chap. Fungi San Diego, California, USA: Academic Press 47–64
advances in Botanical Research incorporating Advances in Plant Pathology.
- Balmori, E., D. Gilmer, K. Richards, H. Guilley, G. Jonard. 1993. Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Biochimie*, 75:517-21.
- Blanchard, C. L., T. J. Higgins, B. J. Anderson. 1997. RNAs 4A and 5 are present in tomato aspermy virus and both subgroups of cucumber mosaic virus. *Archives of virology*, 142:1273-83.
- Bleykasten C., D. Gilmer, H. Guilley, K.E. Richards, G. Jonard. 1996. The beet necrotic yellow vein virus 42 kDa triple gene block protein binds nucleic acids in vitro. *The journal of general virology*, 77: 889-897.
- Bleykasten Grosshans C., H. Guilley, S. Bouzoubaa, K.E. Richards, G. Jonard. 1997. Independent Expression of the First Two Triple Gene Block Proteins of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Complements Virus Defective in the Corresponding Gene but Expression of the Third Protein Inhibits Viral Cell-to-Cell Movement. *Molecular plant-microbe interactions*, 10 (2): 240-246.
- Bongiovanni G.C. 1964. La diffusione della rizomania in Italia. *Informatore fitopatologico*, 14 (10): 263-265.
- Bouzoubaa S., H. Guilley, G. Jonard, K.E. Richards, C. Putz. 1985. Nucleotide sequence analysis of RNA 3 and RNA 4 of beet necrotic yellow vein virus, isolates F2 and G1. *The journal of general virology*, 66, 1553-1564.
- Bouzoubaa S., V. Ziegler, D. Beck, H. Guilley, K.E. Richards, G. Jonard. 1986. Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA 2. *The journal of general virology*, 67: 1689-1700.
- Bouzoubaa S., L. Quillet, H. Guilley, G. Jonard, K.E. Richards. 1987. Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA 1. *The journal of general virology*, 68: 615-626.
- Bouzoubaa S., U. Niesbach-Klosgen, I. Jupin, H. Guilley, K.E. Richards, G. Jonard. 1991. Shortened forms of beet necrotic yellow vein virus RNA 3 and RNA 4. *The journal of general virology*, 72: 259-66.

- Büttner, G., K. Bürcky. 1990. Content and distribution of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in sugar beet varieties with different degrees of susceptibility to rhizomania. *Proceedings of the First Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, Braunschweig, Eugen Ulmer, Stuttgart.:83-86.
- Canova A. 1959. Appunti di patologia della barbabietola. *Informatore fitopatologico*, 9 (20): 390-396.
- Canova A. 1959. Appunti di patologia della barbabietola. *Informatore fitopatologico*, 9 (20), 390-396.
- Canova A. 1975. Malattie da virus. *In: Manuale di patologia vegetale. Edizione Agricole*, 770.
- Casarini Camangi P. 1987. Incidenza della rizomania sulla produzione qualitativa della barbabietola da zucchero. *L'informatore Agrario*, 43: 149-152.
- Chang S., J. Puryear, J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant molecular biology reporter*, 11: 113-116.
- Donald R.G.K., H. Shou, A.O. Jackson. 1993. Serological analysis of barley stripe mosaic virus-encoded proteins in infected barley. *Virology*, 195: 659-668.
- Erhardt M., M. Morant, C. Ritzenthaler, C. Stussi-Garaud, H. Guilley, K.E. Richards, G. Jonard, S. Bouzoubaa, D. Gilmer. 2000. P42 movement protein of Beet necrotic yellow vein virus is targeted by the movement protein P13 and P15 to punctate bodies associated with plasmodesmata. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 13 (5): 520-528.
- FAO. 2005. FAOSTAT Agriculture Statistics Database. Pagina Web: <http://faostat.fao.org/site/336/default.aspx>
- Gilmer D., K.E. Richards, G. Jonard, H. Guilley. 1992. Cis-active sequences near the 5'-terminus of beet necrotic yellow vein virus RNA 3 and 4. *Virology*, 190: 55-67.
- Gilmer D., S. Bouzoubaa, A. Hehn, H. Guilley, K. Richards, G. Jonard. 1992a. Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology*: 189, 40-47.

- Gilmer D., C. Allmang, C. Ehresmann, H. Guilley, K. Richards, G. Jonard, B. Ehresmann. 1993. The secondary structure of the 5'-noncoding region of beet necrotic yellow vein virus RNA3: evidence for a role in viral RNA replication. *Nucleic acids research*, 21(6):1389-95.
- Gorbalenya A.E., E.V. Koonin. 1988. Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucleic acids research*, 17: 8413-8440
- Habili, N., R. I. Francki. 1974. Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. III. Further studies on relationship and construction of a virus from parts of the two viral genomes. *Virology*, 61:443-9.
- Haeberlè A.M. and C. Stussi-Garaud. 1995. *In situ* localization of the non-structural protein P25 encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 *The journal of general virology*, 76: 643-650.
- Harveson R., C. Rush and T. Wheeler. 1996. The spread of beet necrotic yellow vein virus from point source inoculations as influenced by irrigation and tillage. *Phytopathology*, 86: 1242-1247.
- Heidel GB, C. Rush, T.L. Kendal, S.A. Lommel, R.C. Franch. 1997. Characteristics of beet soilborne mosaic virus, a furo-like virus infecting sugar beet. *Plant disease*, 81: 1070-1076
- Heijbroek W., P.M.S. Muster, A.H.L. Schoone. 1999. Variation in pathogenicity and multiplication of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in relation to the resistance of sugar beet cultivars. *European journal of plant pathology*, 105: 397-405.
- Hleibieh K., C. Peltier, E. Klein, A. Schirmer, L. Schmidlin, L. Covelli, C. Ratti, A. Legrève, C. Bragard, D. Gilmer. 2007. Étiologie de la rhizomanie de la betterave sucrière. *Virologie*, 11 (6) : 409-21.
- Hodgman T.C. 1988. A new superfamily of replicative proteins. *Nature*, 333: 22-23.
- Hu, C. C., M. Sanger, S. A. Ghabrial. 1998. Production of infectious RNA transcripts from full-length cDNA clones representing two subgroups of peanut stunt virus strains: mapping satellite RNA support to RNA1. *The journal of general virology*, 79 (Pt 8):2013-21.
- Jupin I., L. Quillet, V. Ziegler-Graff, H. Guilley, K.E. Richards. 1988. *In vitro* translation of

- natural and synthetic beet necrotic yellow vein virus RNA-1. *The journal of general virology*, 69: 2359-2367.
- Jupin, I., K. Richards, G. Jonard, H. Guilley, C.W. Pleij. 1990. Mapping sequences required for productive replication of beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Virology*, 178: 273-80.
- Jupin I., H. Guilley, K.E. Richards, G. Jonard. 1992. Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves. *EMBO Journal*, 11: 479-488.
- Keskin, B. 1964. Polymyxa betae ein Parasit in den Wurzeln von Beta vulgaris Tournee., besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. *Archiv für microbiologie*, 49: 348-374.
- Kiguchi T, M. Saito, T. Tamada. 1996. Nucleotide sequence analysis of RNA 5 of five isolates of beet necrotic yellow vein virus and the identity of a deletion mutant. *The journal of general virology*, 77: 575-580.
- Klein E., D. Link, A Schirmer. M. Erhardt, D. Gilmer. 2007. Sequence variation within Beet necrotic yellow vein virus p25 protein influences its oligomerization and isolate pathogenicity on Tetragonia expansa. *Virus research*, 126 (1-2): 53-61.
- Koenig R., B Stein. 1990. Distribution of beet necrotic yellow vein virus in mechanically inoculated sugarbeet plantlets of cultivars with different degrees of rhizomania resistance. Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, vol. 1. Proceedings of the First Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Braunschweig, Germany, August 21-2.
- Koenig R. and D.E. Lesemann. 2005. Genus Benyvirus. *Virus Taxonomy VIII*. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. pp. 1043-1048.
- Koenig R., W. Jarausch, Y. Li, U. Commandeur, W. Burgermeister, M. Gehrke, P. Lueddecke. 1991. Effect of recombinant beet necrotic yellow vein virus with different composition on mechanically inoculated sugarbeets. *The journal of general virology*, 72: 2243-2246.
- Koenig R., P. Lueddecke, A.M. Haeberlé. 1995. Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining

- single-stranded conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *The journal of general virology*, 76: 2051-2055.
- Koenig R., A.M. Haeberlé, U. Commandeur. 1997. Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA 5 in a sugarbeet growing area in Europe. *Archives of virology*, 142: 1499-1504.
- Koenig R., B.L. Lennefors. 2000. Molecular analyses of European A, B and P type sources of Beet necrotic Yellow Vein Virus and detection of the rare P Type in Kazakhstan. *Archives of virology*, 145: 1551-1570.
- Kruse M., R. Koenig, A. Hoffmann, A. Kaufmann, U. Commandeur, A.G. Solovyev, I. Savenkov, W. Burgermeister. 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription PCR products reveals the existence of two major strain groups of beet necrotic yellow vein virus. *The journal of general virology*, 75: 1835-1842.
- Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227; 680–685.
- Lain S., J.L. Riechmann, J.A. Garcia. 1990. RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic acids research*, 18; 7003-7006.
- Lain S., M.T. Martin, J.L. Riechmann, J.A. Garcia. 1991. Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *Journal of virology*, 65: 1-6.
- Lauber E., H. Guilley, K. Richards, G. Jonard, D. Gilmer. 1997. Conformation of the 3'-end of beet necrotic yellow vein benevirus RNA 3 analysed by chemical and enzymatic probing and mutagenesis. *Nucleic acids research*, 25 (23): 4723-9.
- Lauber E., H. Guilley, T. Tamada, K.E. Richards, G. Jonard. 1998. Vascular movement of beet necrotic yellow vein virus in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA 3 sequence domain rather than a gene product. *The journal of general virology*, 79: 385-393.
- Lauber, E., G. Jonard, H. Guilley, D. Gilmer. 1999. Effects of structural modifications upon the accumulation in planta of replicons derived from

- beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Archives of virology*, 144 (6): 1201-8.
- Lee L., E.B. Telford, J.S. Batten, K.B. Scholthof, C.M. Rush. 2001. Complete nucleotide sequence and genome organization fo Beet soilborne mosaic virus, a proposed member of the genus Benyvirus. *Archives of virology*, 146 (12):2443-53.
- Lemaire O., M. Beuve, C. Weber, A. Schirmer, D. Link, A. Meunier, C. Bragard, D. Gilmer. 2003. Etiolgy and molecular epidemiology of a severe rhizomania disease occurring in confined locations in Europe: Hypotesis for the implication of the RNA-3 and/or -5 of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)-P pathotype. *1st joint IIRB-ASSBT congress*, 26th Feb.1st March 2003, San Antonio (USA). 303-318.
- Lewellen R.T., E. Biancardi. 1990. Breeding and performance of rhizomania resistant sugar beet. *In: Proc. 53rd I.I.R.B. Winter Congr. Imprimerie J. Duculot*. Brussels, Belgium, 69-87.
- Lewellen R.T., A.F. Wrona. 1997. Solarizion and host-plant resistence as alternatives to soil fumigation to control rhizomania of sugar beet. *In: Proc. 60th I.I.R.B. Congress. Imprimerie J. Duculot*. Brussels, Belgium, 189-201.
- Lewellen R.T., I.O. Skoyen, A.W. Erichsen. 1987. Breeding sugar beet for resistance to rhizomania: Evaluation of host-plant reactions and selection for and inheritance of resistance. *In: Proc. 50th I.I.R.B. Winter Congr. Imprimerie J. Duculot*. Brussels, Belgium, 1990, 139-156.
- Link D., L. Schmidlin, A. Schirmer, E. Klein, M. Erhardt, A. Geldreich, O. Lemaire, D. Gilmer. 2005. Functional characterization of the Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants. *The journal of general virology*, 86 (Pt 7): 2115-25.
- Mahmood T., C. Rush. 1999. Evidence of cross-protection between beet soilborne mosaic virus and beet necrotic yellow vein virus in sugar beet. *Plant disease*, 83: 521-526.
- Meulewater F., P. Soetaert, J. Van Emmelo. 1989. Structural analysis of the coat protein gene in different BNYVV isolates. *Mededeling van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijkuniversiteit Gent*, 54: 465-468.

- Miyaniishi M., S. H. Roh, A. Yamamiya, S. Ohsato, Y. Shirako. 2002. Reassortment between genetically distinct Japanese and US strains of *Soil-borne wheat mosaic virus*: RNA1 from a Japanese strain and RNA2 from a US strain make a pseudorecombinant virus. *Archives of virology*, 147: 1141–1153.
- Niesbach-Klosgen U., H. Guilley, G. Jonard, K.E. Richards. 1990. Immunodetection *in vivo* of beet necrotic yellow vein virus encoded proteins. *Virology*, 178: 52-61.
- Orita M., Y. Suzuki, T. Sekiya, K. Hayashi. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5: 874-879.
- Palukaitis, P., M. J. Roossinck, R. G. Dietzgen, R. I. Francki. 1992. Cucumber mosaic virus. *Advances in virus research*, 41:281-348.
- Prillwitz H, E. Schlosser. 1993. Interactions between Beet soilborne virus (BSBV-2) and Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV). See Ref. 48, pp. 71–74.
- Putz C. 1977. Composition and structure of beet necrotic yellow vein virus. *The journal of general virology*, 35: 397-401.
- Putz C., L. Pink, M. Pink, C. Fritsch. 1983. Identification of 3' and 5' ends of beet necrotic yellow vein virus RNAs. Presence of a poly(A) sequences. *FEBS Letters*, 156: 41-56.
- Quillet L., H. Guilley, G. Jonard, K. Richards. 1989. In vitro synthesis of biologically active beet necrotic yellow vein virus RNA. *Virology*, 172(1): 293-301.
- Rahim, M. D., I. B. Andika, C. Han, H. Kondo, T. Tamada, 2007. RNA4-encoded p31 of beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *The journal of general virology*, 88 (Pt 5): 1611-9.
- Rana G.L., A. Di Franco, M. Russo. 1978. La rizomania della barbabietola in Italia meridionale. *Informatore fitopatologico*, 28(2): 5-7.
- Rao, A.L.N., R.I.B. Francki. 1981. Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. VI. Partial compatibility of genome segments from the two viruses. *Virology*, 114:573-575.

- Ratti C., L. Bianchi, R. Resca, M. De Biaggi, V.A. Harju, C.M. Henry, E. Jackeviciene, B. Cvjetkovic, C. Rubies Autonell. 2005. Incidence of sugar beet soil-borne viruses in sugar beet growing countries. In: Rush C.M., (eds.) Proc. of the sixth symposium of the IWGPVFFV, Bologna, September 5-7 2005, pp. 158-161.
- Rubies Autonell C., C. Ratti, R. Resca, M. De Biaggi, J. Ayala García. 2006. First report of Beet virus Q in Spain. *Plant disease*, 90: 110.
- Rush C. 2003. Ecology and epidemiology of *Benivirus* and plasmodiophorid vectors. *Annual review of phytopathology*, 41: 567-592.
- Rush C., G.B. Heidel. 1995. Furovirus diseases of sugar beets in the United States. *Plant disease*, 79: 868-875.
- Richards K.E., T. Tamada. 1992. Mapping functions on the multipartite genome of beet necrotic yellow vein virus. *Annual review of phytopathology*, 30: 291-313.
- Saito M., T. Kiguchi, T. Kusume, T. Tamada. 1996. Complete nucleotide sequence of the Japanese isolate S of the beet necrotic yellow vein virus RNA and comparison with European isolates. *Archives of virology*, 141: 2163-2175.
- Salanki, K., I. Carrere, M. Jacquemond, E. Balazs, M. Tepfer. 1997. Biological properties of pseudorecombinant and recombinant strains created with cucumber mosaic virus and tomato aspermy virus. *The journal of virology*, 71:3597-602.
- Schmidlin, L., D. Link, J. Mutterer, H. Guilley, D. Gilmer. 2005. Use of a Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-derived replicon as a new tool for gene expression. *Journal of general virology*, 86 (Pt 2): 463-7.
- Scholten O., W. Lange. 2000. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review *Euphytica*, 112: 219–231.
- Shi, B., S. Ding, R. H. Symons. 1997. Two novel subgenomic RNAs derived from RNA 3 of tomato aspermy cucumovirus. *The journal of general virology*, 78 (Pt 3):505-10.
- Shirako Y., N. Suzuki, R. French. 2000. Similarity and divergence among viruses in the genus Furovirus. *Virology*, 270: 201–207.
- Steven A.C., B.L. Trus, C. Putz, M. Wurtz. 1981. The

- molecular organization of beet necrotic yellow vein virus. *Virology*, 113: 428-438.
- Tamada T., T. Baba. 1973. Beet necrotic yellow vein virus from rizomania affected sugar beet in Japan. *Annals of the phitopatological society of Japan*, 39: 325-332.
- Tamada T., T. Kusume. 1991. Evidence that the 75K readthrough protein of beet necrotic yellow vein virus RNA 2 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *The journal of general virology*, 72: 1497-1504
- Tamada T., Y. Shirago, H. Abe, M. Saito, T. Kiguchi, T. Harada. 1989. Production and pathogenicity of isolates of beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. *The journal of general virology*, 70: 3399-3409.
- Tamada T., M. Saito, T. Kiguchi, T. Kusume. 1990. Effect of isolates of beet necrotic yellow vein virus with different RNA components on the developmet of rizomania symptoms. *In: R. Koenig, (edit), Proc. Symp. Int. Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, 1st., Stuttgart: Eugen Ulmer GmbH, 41-44.
- Tamada T., T. Kusume, H. Uchino, T. Kiguchi, M. Saito. 1996. Evidence that beet necrotic yellow vein virus RNA 5 is involved in symptom development of sugar beet roots. *In: Sherwood J.L., Rush C.M., (eds.), Proc. 3rd Symp. of the Intern. Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, Dundee, August 6-7, 1996, 49-52.
- Torrance L., M.A. Mayo. 1997. Proposed re-classification of *Furoviruses*. *Archives of virology*, 142: 435-439.
- Turina M., R. Resca, C. Rubies Autonell. 1996. Survey of soil-borne virus diseases of sugar-beet in Italy. *In: Sherwood J.L., Rush C.M., (eds.), Proc. 3rd Symp. of the Intern. Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, Dundee, August 6-7, 1996, 121-124.
- Turina M., R. Resca, V. Cerreta, C. Ratti, A. Canova, C. Rubies Autonell. 1999. *In: Sherwood J.L., Rush C.M., (eds.), Preliminary molecular characterization of italian isolates of beet necrotic yellow vein benyvirus (BNYVV)*. 4rd Symp. of the Intern. *Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, Asilomar Center, October 5-8, 1999, 69-72.

- Van Regenmortel, M.H., D.H. Bishop, C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, C. Calisher. 1997. Guidelines to the demarcation of virus species. *Archives of virology* 142 (7): 1505-18.
- Ward, L., R. Koenig, G. Budge, C. Garrido, C. McGrath, H. Stubbley, N. Boonham. (2007). Occurrence of two different types of RNA-5-containing beet necrotic yellow vein virus in the UK. *Archives of virology*, 152 (1): 59-73.
- Whitney E.D., J.E. Duffus, 1986. Compendium of beet diseases and insects. St. Paul, USA: *APS Books*, 76.
- Wisler G.C., R.T. Lewellen, J.L. Sears, H.Y. Liu, J.E. Duffus. 1999. Specificity of TAS-ELISA for beet necrotic yellow vein virus and its application for determining rhizomania in field grown sugar beets. *Plant disease*, 83: 864-870.
- Wisler G.C. R.T. Lewellen, J.L. Sears, J.W. Wasson, H.Y. Liu, W.M. Wintermantel. 2003. Interactions between beet necrotic yellow vein virus and beet soilborne mosaic virus in sugar beet. *Plant disease*, 87: 1170-1175.
- Yao H., Y. Liu, C. Zhunan, Z. Yu. 1993. The cloning and sequencing of coat protein gene from beet necrotic yellow vein virus. *Chinese journal of biotechnology*, 2: 147-151.
- Ziegler V., K.E. Richards, H. Guilley, G. Jonard, C. Putz. 1985. Cell-free translation of beet necrotic yellow vein virus: readthrough of the coat protein cistron. *The journal of general virology*, 66, 2079-2087.
- Ziegler Graff V., S. Bouzoubaa, I. Jupin, H. Guilley, G. Jonard, K. Richards. 1988. Biologically Active Transcripts of Beet Necrotic Yellow Vein Virus RNA-3 and RNA-4. *The journal of general virology*, 69 (9): 2347-2357.