

FRANCESCO FAGGIOLI

Università La Sapienza

27 Ottobre 2016

**I VIROIDI:
i più piccoli agenti patogeni
ad oggi conosciuti
ovvero
fossili molecolari dalle
caratteristiche moderne**

I Viroidi

- Sono i più piccoli patogeni conosciuti
- Presenti solo nel mondo vegetale (?)

Sono costituiti esclusivamente da ssRNA circolare a basso peso molecolare (**246-399 basi = 130.000 Dalton**) non incapsidato ed in grado di replicarsi nella piante ospiti autonomamente ovvero in assenza di un virus ausiliare



La scoperta dei viroidi

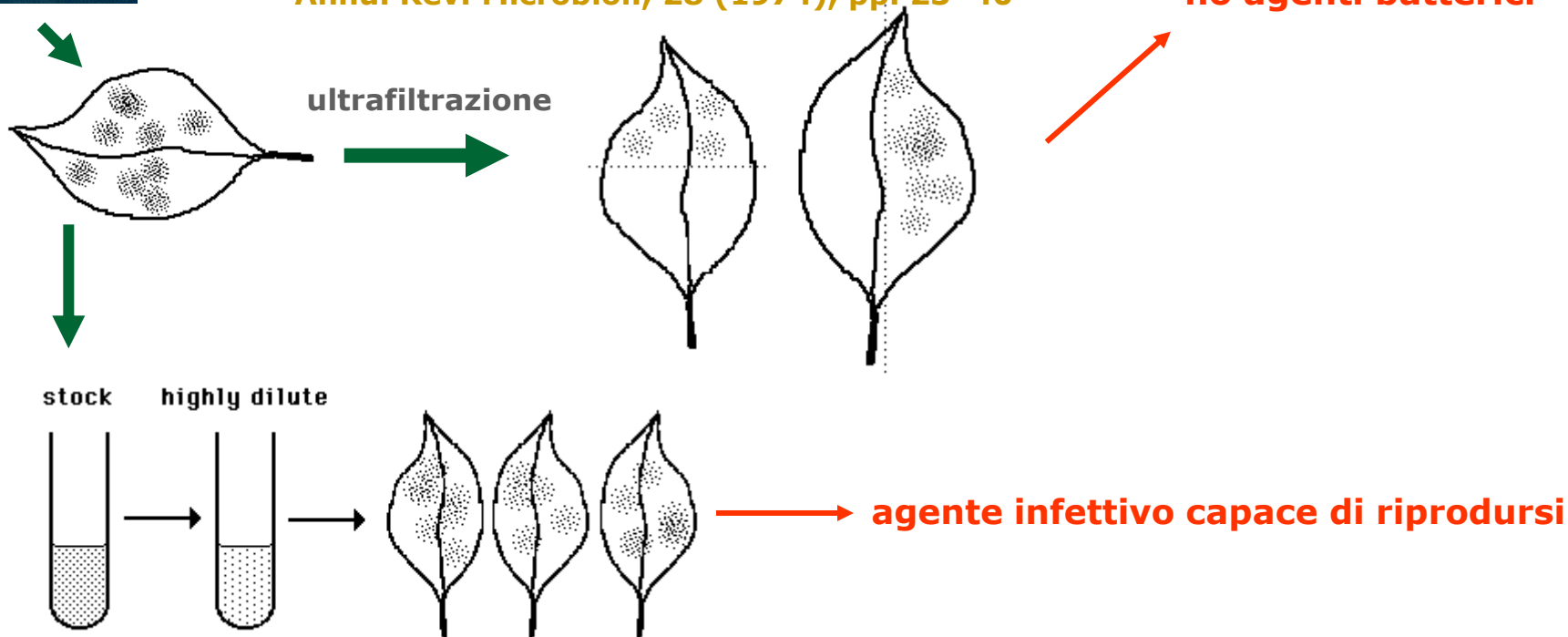
Theodor Otto Diener

Diener, T. O. 1971. Potato spindle tuber "virus". IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology* 45:411-428



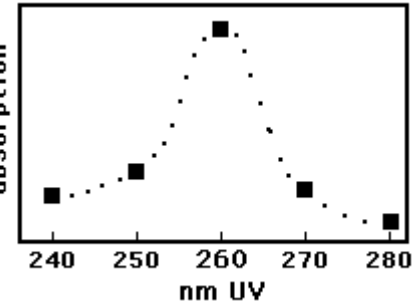
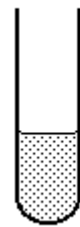
Viroids: the smallest known agents of infectious disease
Annu. Rev. Microbiol., 28 (1974), pp. 23-40

no agenti batterici

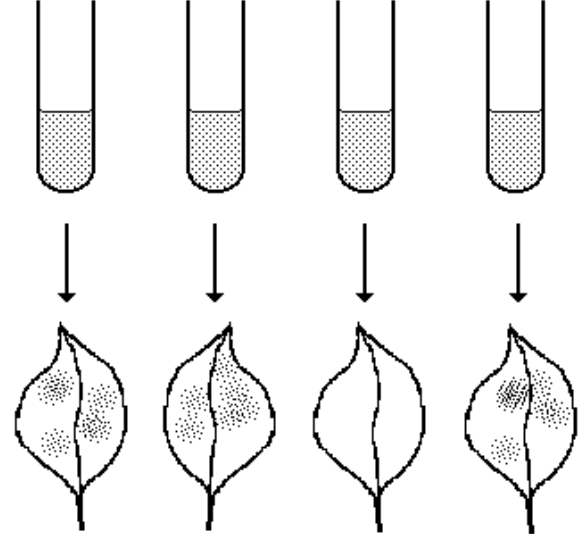




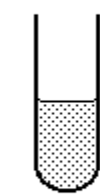
stock



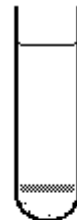
protease lipase RNase no treatment



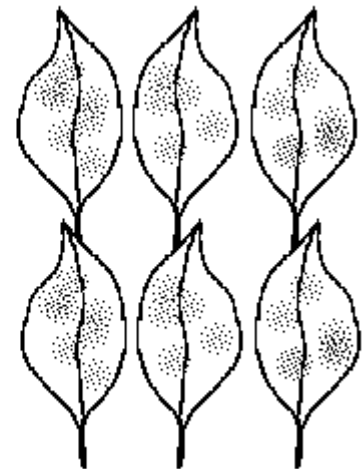
stock



Density gradient



Sedimentation gradient



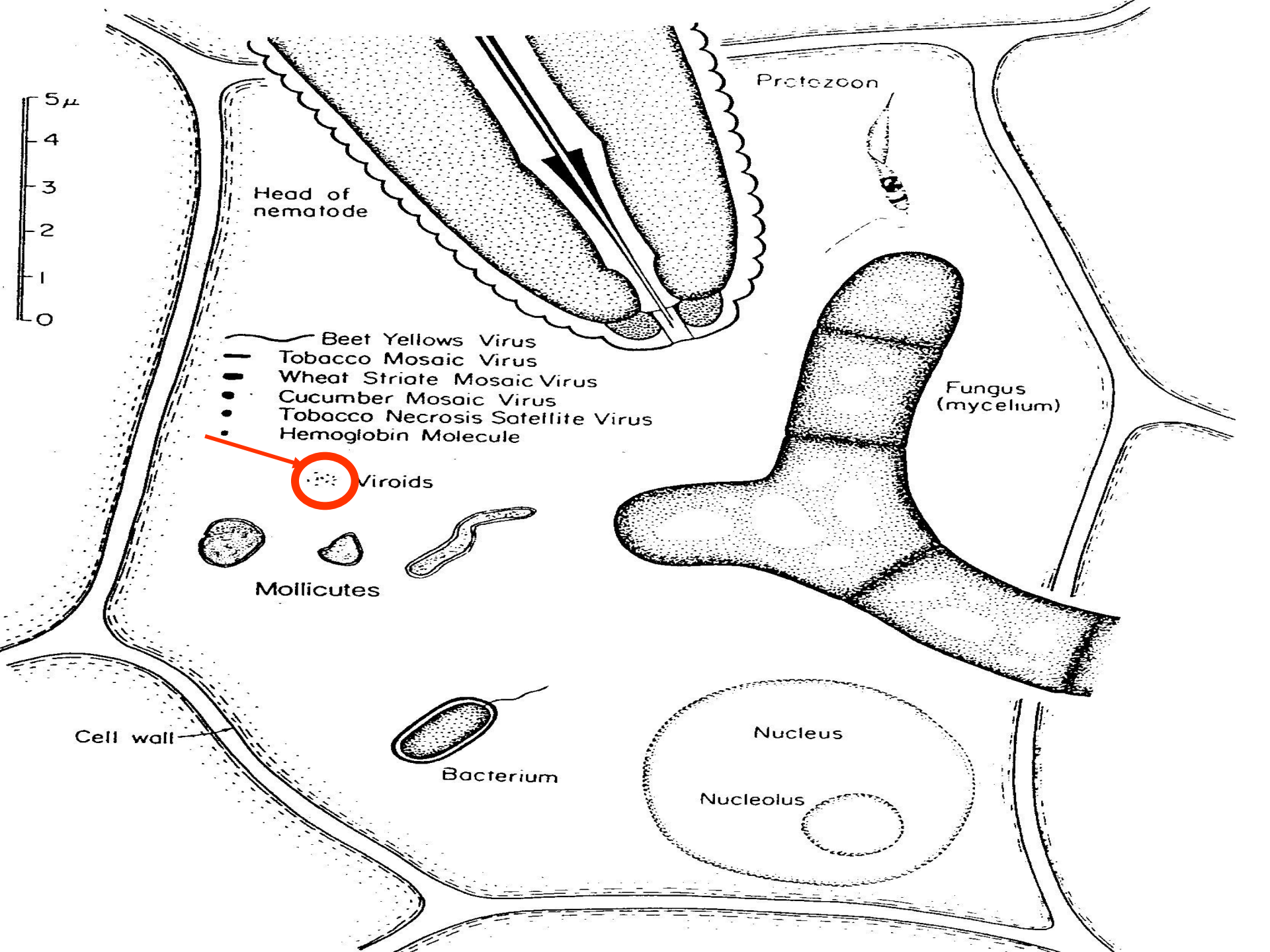
ssRNA di bassissimo peso molecolare: VIROIDE

infettività trasmissibile senza trattamenti

agente infettivo ad RNA!!

no virus con rivestimento lipidico

no virus con capsidio proteico



5 μ
4
3
2
1
0

Protozoon

Head of nematode

- Beet Yellows Virus
- Tobacco Mosaic Virus
- Wheat Stripe Mosaic Virus
- Cucumber Mosaic Virus
- Tobacco Necrosis Satellite Virus
- Hemoglobin Molecule

Viroids

Mollicutes

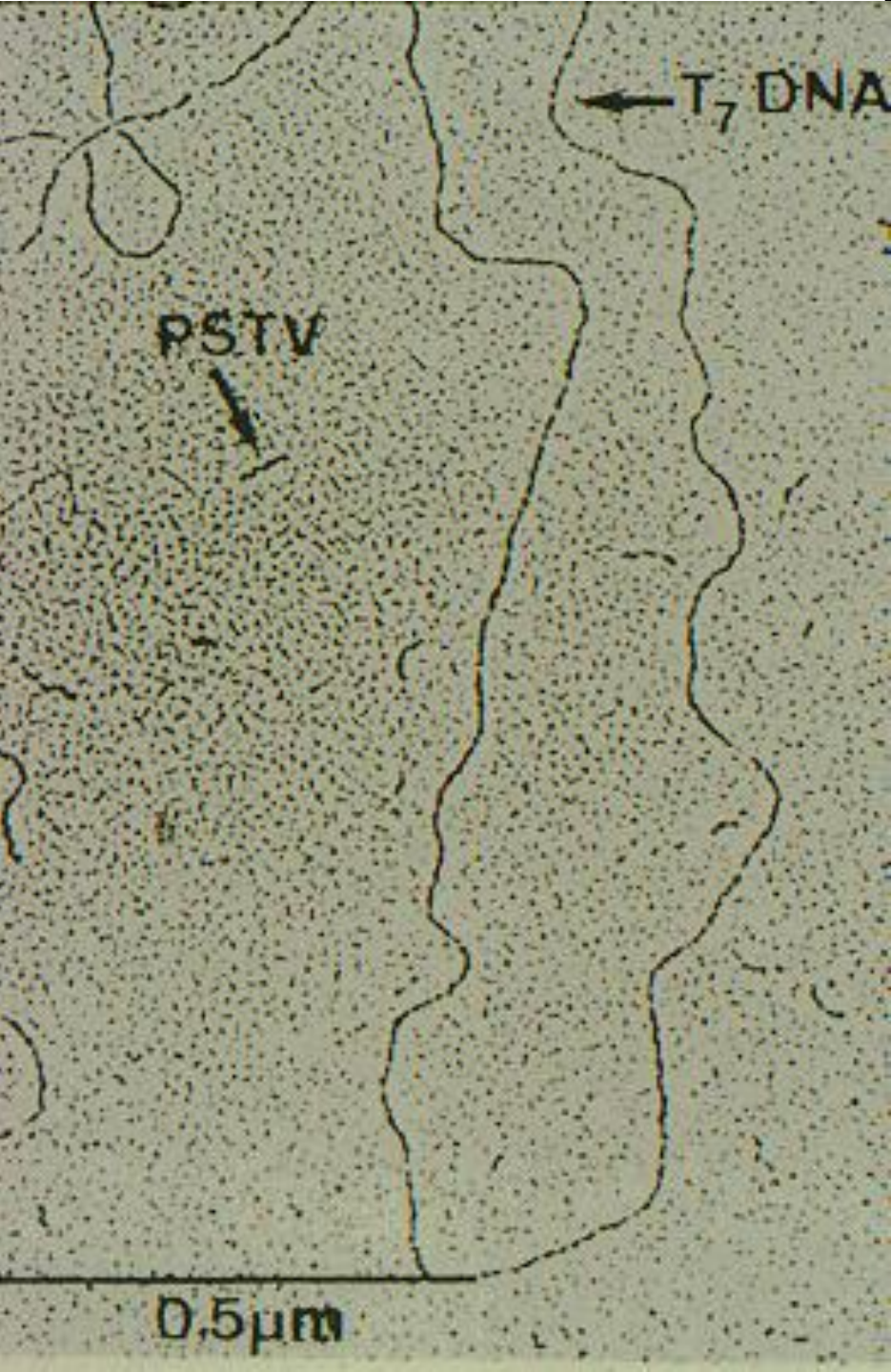
Fungus (mycelium)

Cell wall

Bacterium

Nucleus

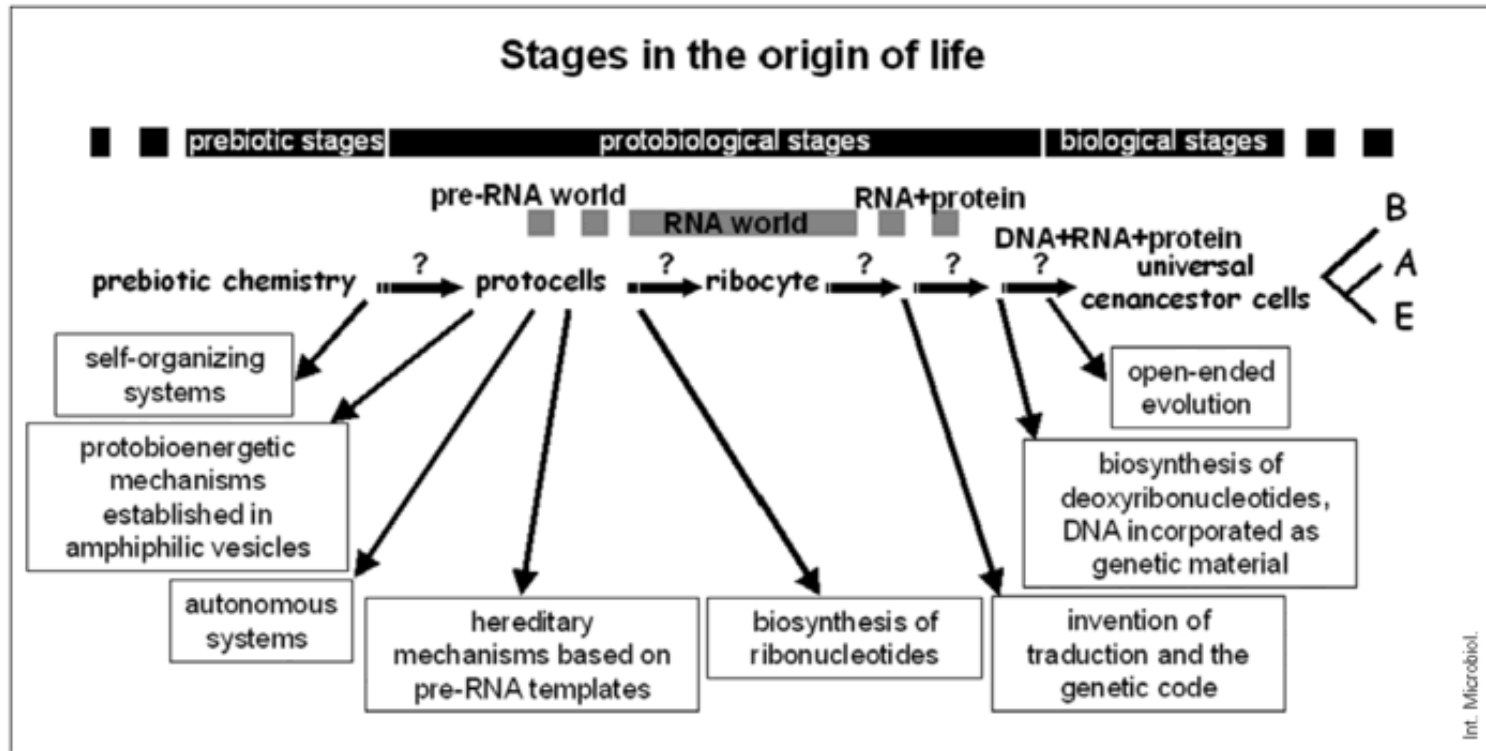
Nucleolus



**Foto al M.E. di una miscela
di RNA purificato di PSTVd
RNA e del Fago T7**

Sogo et al., *Virology* 1973

L'RNA all'origine della vita?



Viroidi = originati da introni di geni di piante durante il processo evolutivo (Diener)

Sono stati individuati nel 1967 in piante di patata con tuberi fusiformi



- **Elevata complementarietà interna tra le basi (64-73%)**
- **Struttura secondaria compatta**
- **Non codificano per nessuna proteina (sprovvisti di capsidio proteico)**
- **Totalmente dipendenti per la loro replicazione dall'ospite**
- **Incremento della replicazione e dei sintomi a intensità luminosa e temperatura e elevate**

I viroidi possono causare:

- malattie molto gravi (Coconut cadang-cadang viroid, “cadang cadang della palma da cocco”)



- malattie impercettibili (AGVd= Australian grapevine viroid, viroide australiano della vite; CLVd= *Columnea* latent viroid, viroide della *Columnea*)

I viroidi infettano anche i tessuti animali?

L'unica malattia umana conosciuta per essere causata da un "viroide" è l'**epatite D (HDV)**. Questa malattia precedentemente era stata attribuita ad un virus difettivo denominato virus delta. Ora ci sono evidenze che il virus delta è in realtà un "**agente δ** " (ssRNA 1700 nt), racchiuso nel capsido del virus dell'epatite B. Affinché si sviluppi la malattia dell'epatite D, ci deve essere la simultanea infezione sia del virus dell'epatite B che dell' **agente δ** . Inoltre l' **agente δ codifica per una proteina: antigene delta (22kd)**. Esiste una alta complementarietà tra l'RNA dell' **agente δ** ed un piccolo RNA citoplasmico delle cellule del fegato dell'uomo (7S).

Il virusoide dell'epatite D causa la morte delle cellule di fegato a causa dell'imprigionamento del RNA 7S e/o il taglio dello stesso

Trasmissione del "virusoide" dell'epatite D

Il virusoide dell'epatite delta può entrare in una cellula di fegato dell'uomo solamente incapsidato nel virus dell'epatite B. Successivamente può essere traslocato e trasmesso per mezzo di trasfusioni di sangue e/o siero.

Caratteristiche chimiche e strutturali

RNA a singola elica caratterizzato da elevata complementarietà interna tra le basi

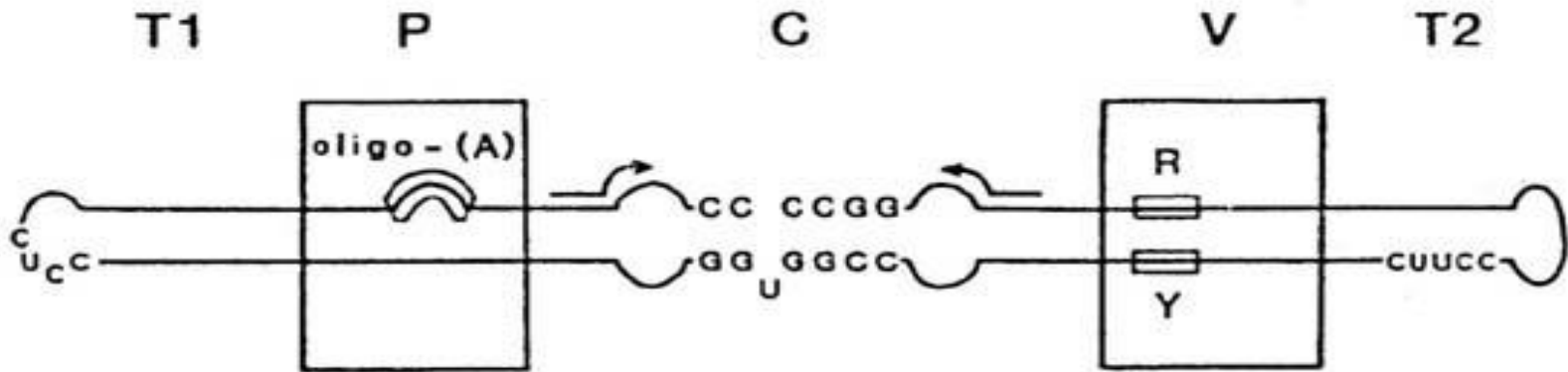


Struttura secondaria a:

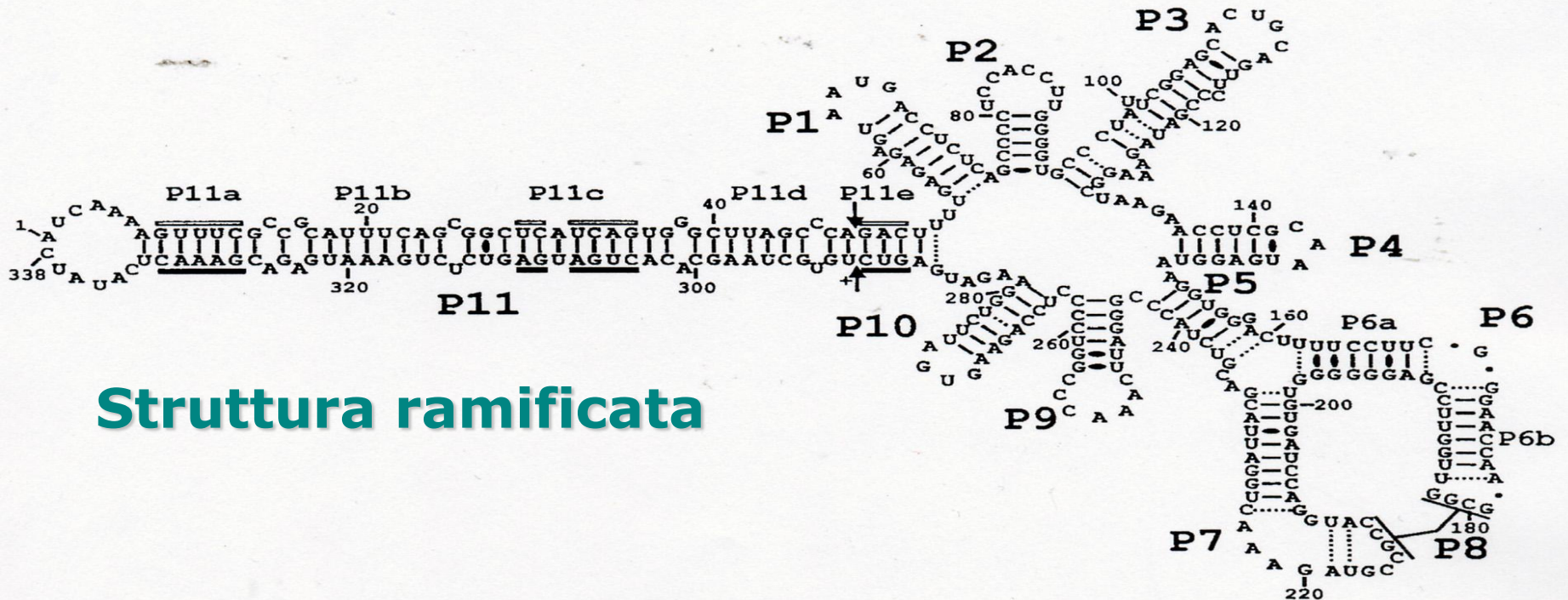
Bastoncello

Quasi bastoncello

Ramificata

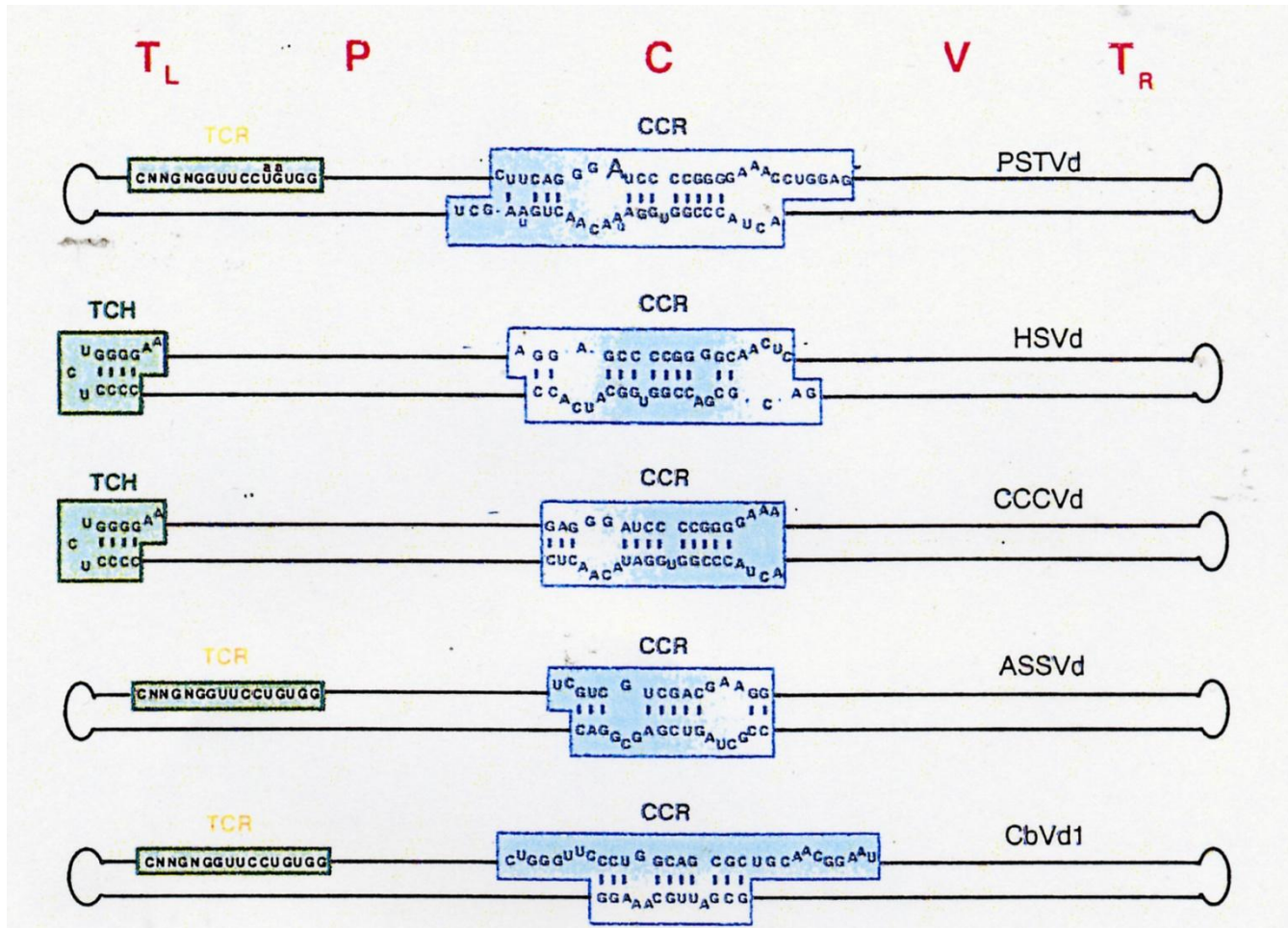


Struttura bastoncellare

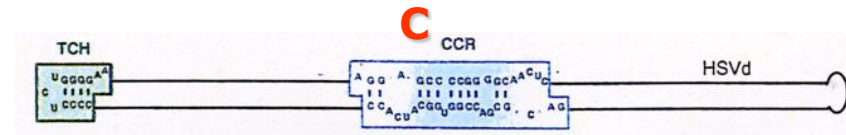


Struttura ramificata

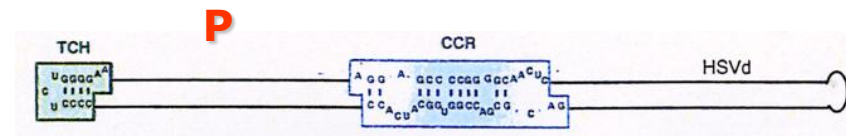
Per i viroidi con struttura secondaria a bastoncino è stato proposto un modello che prevede l'esistenza di 5 regioni o domini strutturali



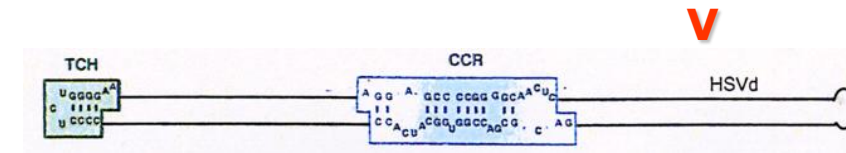
Dominio centrale (C) = contiene la regione centrale conservata (CCR=central conserved region) ha importanza nel processo **replicativo**



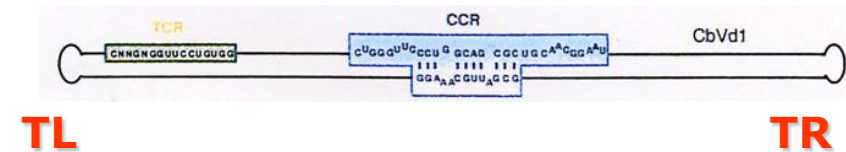
Dominio patogenico (P) = correlato con la **patogenicità** del viroide e molto probabilmente con la **scelta dell'ospite**



Dominio variabile (V) = E' in relazione con la capacità di **accumulo** di alcuni viroidi

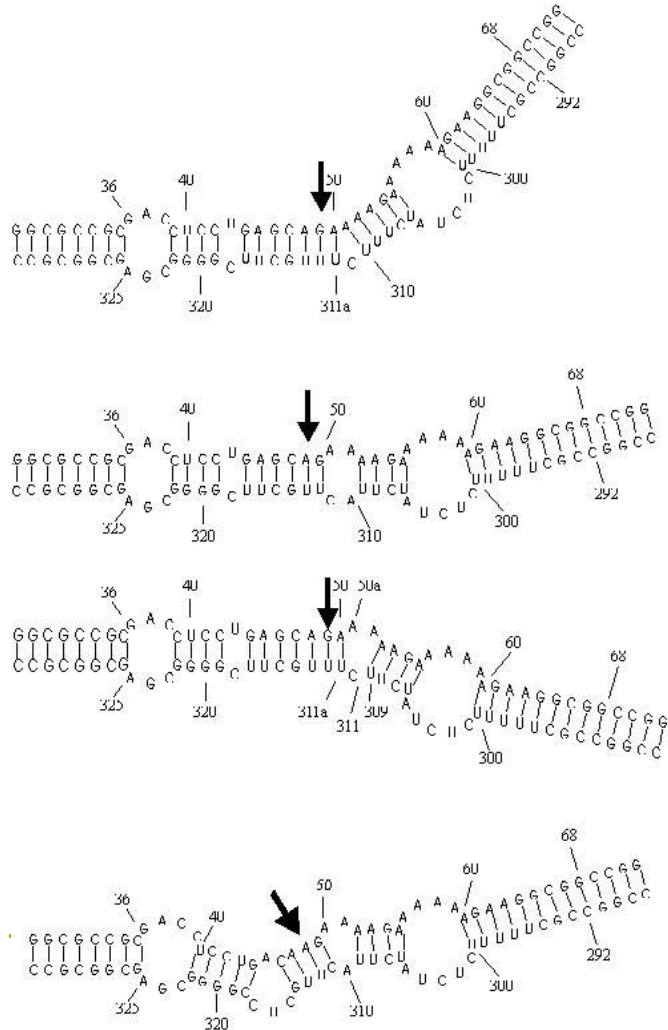


Domini terminali sinistro (TL) e destro (TR) = svolgono un ruolo nella **replicazione**, nel **movimento dei viroidi** nella pianta e nei processi di **ricombinazione** tra viroidi diversi.



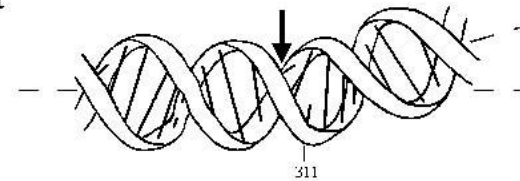
Minime sostituzioni nucleotidiche spesso provocano cambiamenti strutturali e influiscono sulla virulenza

(a)

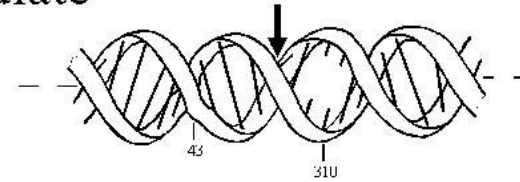


(b)

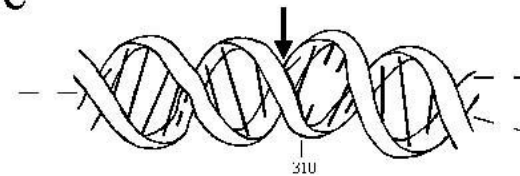
Mild



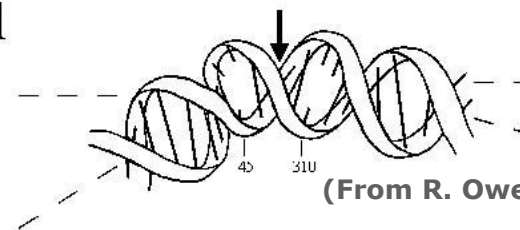
Intermediate



Severe

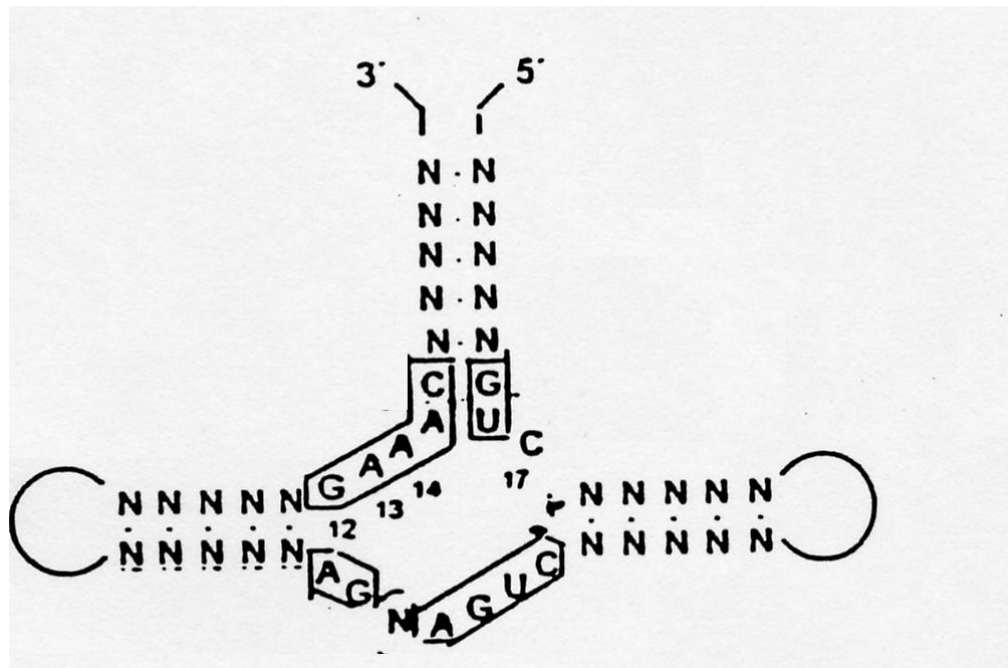


RG 1



(From R. Owens, USDA, Beltsville)

I domini strutturali e le regioni conservate non sono presenti nei tre viroidi ASBVd, PLMVd e CChMVd i quali sono accumulati dalla presenza di strutture catalitiche a testa di martello dette ribozimi, in grado di tagliare in punti ben precisi l'RNA



Classificazione dei viroidi

Suddivisi in 2 famiglie:

Pospiviroidae presenza di CCR (assenza di ribozimi), struttura secondaria a bastoncello o quasi-bastoncello, si accumulano e si replicano nel nucleo.

Avsunviroidae presenza di ribozimi a testa di martello (assenza della CCR), struttura secondaria ramificata e a bastoncello, si accumulano e replicano nei cloroplasti

The International Committee on Taxonomy of Viruses



Virology Division

International Union of Microbiological Societies

Viroids Classification

Taxonomic Structure of the Family

Family 80.001. *Pospiviroidae*

Genus 80.001.0.01. *Pospiviroid*

Genus 80.001.0.02. *Hostuviroid*

Genus 80.001.0.03. *Cocadviroid*

Genus 80.001.0.04. *Apscaviroid*

Genus 80.001.0.05. *Coleviroid*

http://www.ictvdb.iacr.ac.uk/Ictv/fs_viroi.htm

Family 80.002. *Avsunviroidae*

Genus 80.002.0.01. *Avsunviroid*

Genus 80.002.0.02. *Pelamoviroid*

30 specie

Pospiviroidae

Pospiviroidi

PSTVd (potato spindle tuber)
TPMVd (tomato planta macho)
CEVd (citrus exocortis)
MPVd (mexican papita)
CSVd (chrysanthemum stunt)
TASVd (tomato apical stunt)
TCDVd (tomato chlorotic dwarf)

Hostuviroidi

IrVd (iresine 1)
CLVd (columnnea latent)
HSVd (hop stunt viroid)

Cocadviroidi

CCCVd (coconut cadang cadang viroid)
CTiVd (coconut tinangaja)
HLVd (hop latent)
CVd-IV (citrus IV)

Apscaviroidi

ASSVd (apple scar skin)
CVd III (citrus III)
ADFVd (apple dimple fruit)
GYSVd1 (grapevine yellow speckle 1)
GYSVd2 (grapevine yellow speckle2)
CBLVd (citrus bent leaf)
PBCVd (pear blister canker)
AGVd (australian grapevine)

Coleviroidi

Cbvd 1 (coleus blumei1)
Cbvd 2 (coleus blumei2)
Cbvd 3 (coleus blumei3)

Avsunviroidae

Avsunviroid

ASBVd (avocado sunblotch)

Pelamoviroidi

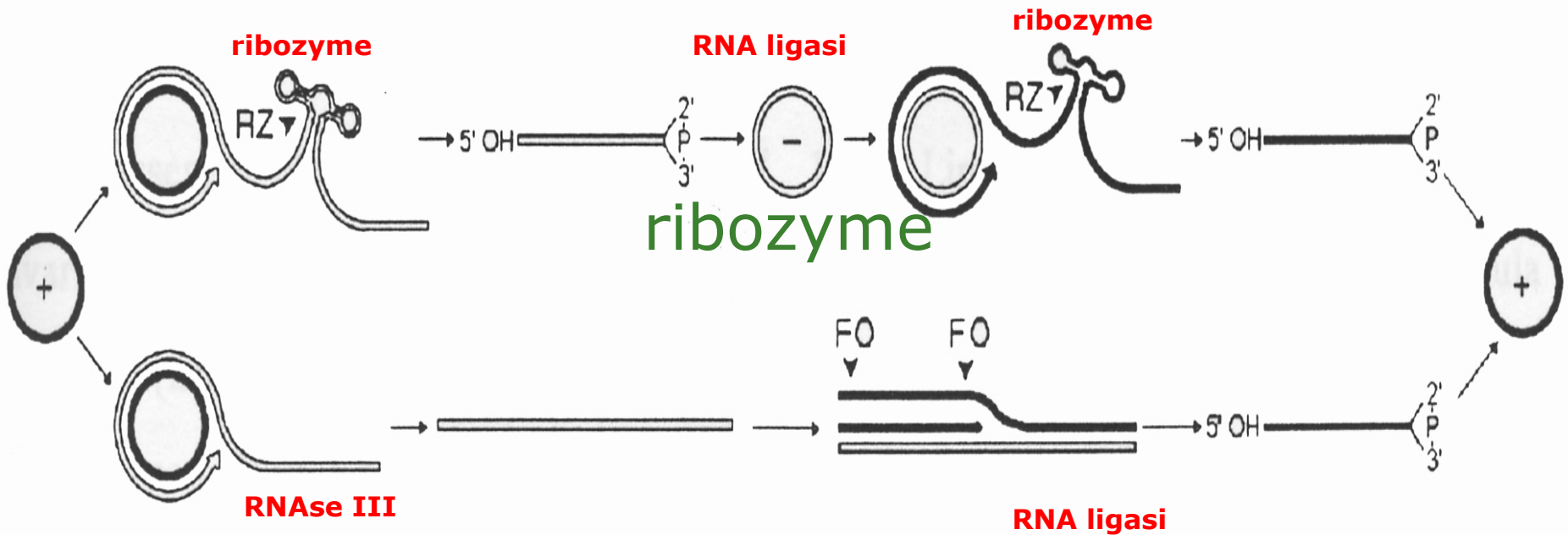
PLMVd (peach latent mosaic)
CChMVd (chrysanthemum chlorotic mottle)

Elaviroid

ELVd (eggplant latent viroid)

Modello di replicazione

DNA-dependent RNA polymerase II



DNA-dependent RNA polymerase II

Trasmissione dei viroidi:

rara per seme e polline (ASBVd, viroidi vite, PLMVd)

sperimentalmente attraverso vettori (PLMVd), solo nel caso del TPMVd sembra che gli afidi svolgano un ruolo attivo nella trasmissione di questa malattia in pieno campo. Caso del PSTVd

uso di attrezzi da potatura infetti (CEVd, HSVd, PLMVd)

meccanica: sfregamento, vestiti?, corna di capre!?
(viroidi agrumi)

uso di materiale di propagazione infetto (tutti!)

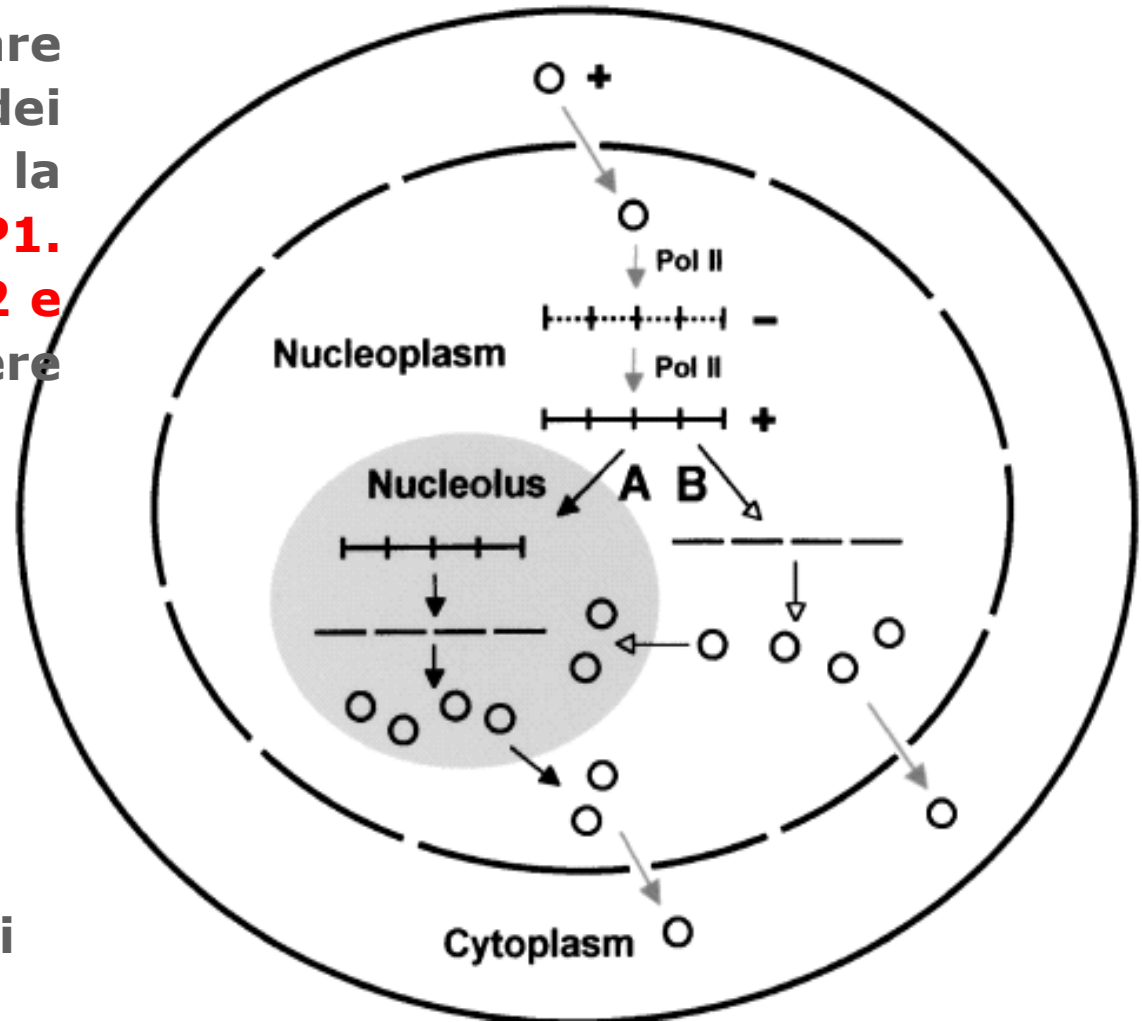
MOVIMENTO INTRA CELLULARE

passaggio intra cellulare nel nucleo per mezzo dei pori nucleari usando la proteina dell'ospite **VirP1**. Altre proteine come **PP2** e **Nt-4/1** potrebbero essere coinvolte

passaggio cell-to-cell per mezzo dei plasmodesmi

lunga distanza mediante il floema

tutti i processi di movimento sono mediati da proteine dell'ospite



Principali differenze con i virus

- 1 Dimensioni minime comprese tra i 246 e 399 nt, 10 volte meno del più piccolo RNA virale.**
- 2 Non codificano per nessuna proteina, (sprovvisti di capsidio proteico) e sono totalmente dipendenti per la loro replicazione dall'ospite.**
- 3 Incremento della replicazione e dei sintomi a intensità luminosa e temperatura (30-35°C) e elevate.**

Sintomatologia

E' simile a quella causata da infezioni virali:

1 Riduzione dello sviluppo

2 Alterazione del colore e/o della morfologia di tutti gli organi (clorosi, distorsione e/o macchie clorotiche e necrotiche dei frutti e delle foglie)

3 Diminuita produzione e nei casi più gravi morte della pianta

Patogenesi dei viroidi

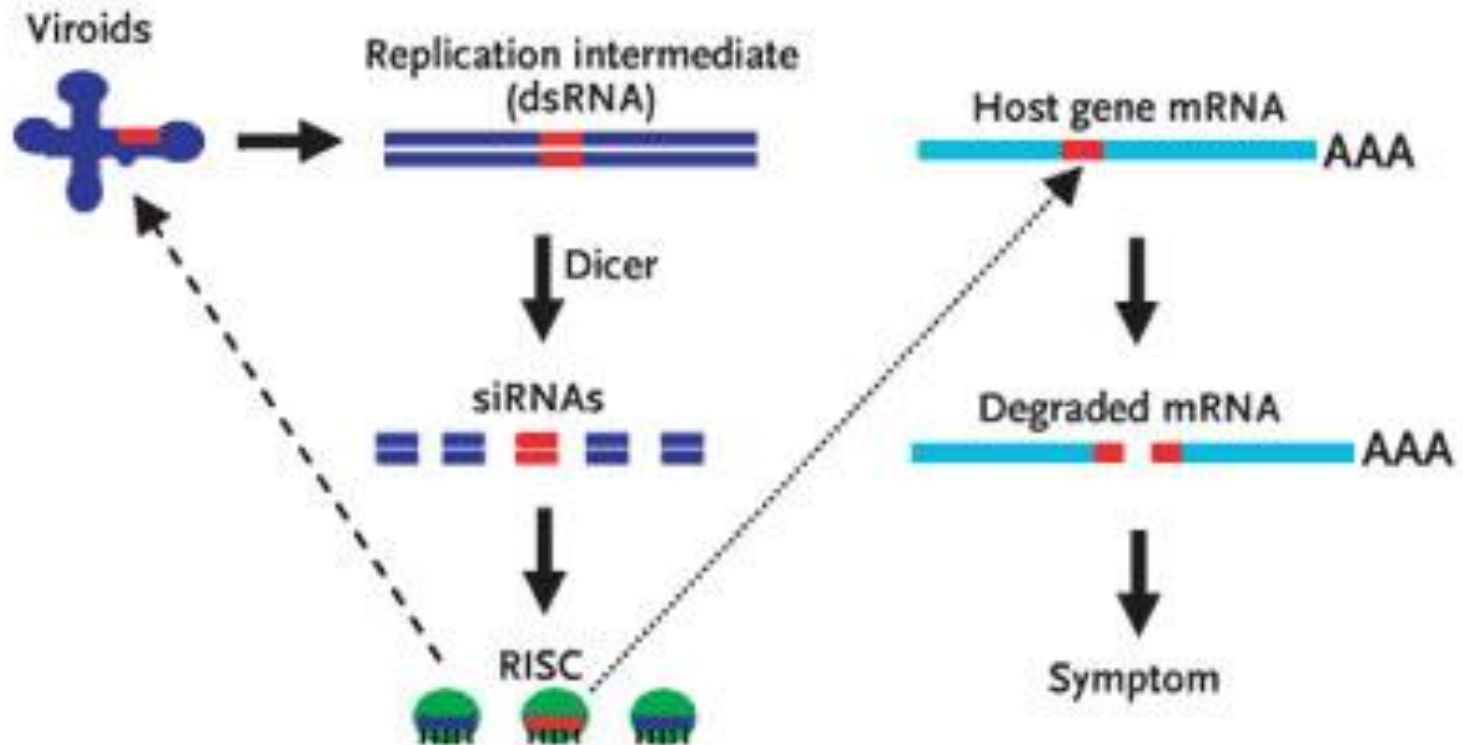
Esiste sicuramente più di un meccanismo di patogenesi

Interferenza nell'espressione genica

Studi recenti suggeriscono l'ipotesi, come avviene nelle cellule dei mammiferi, di una attivazione dell'enzima **PKR** (**P**roteina **K**inasi **R** viene attivata da un **dsRNA**), che riduce la sintesi proteica all'interno delle cellule. Dimostrato per PSTVd (abilità di attivare PKR *in vitro*)

IPOSTESI DEL SILENZIAMENTO GENICO

from M.-B. Wang et al., 2004. PNAS-USA 101: 3275-2380



RNA-interference silencing complex

Effetti di PSTVd su tuberi di patata



Effetti di PSTVd su pomodoro



TCDVd






**Effetti del CEVd su
un portainnesto di
agrumi suscettibile**



**Clorosi su foglie di
crisantemo causate
da CSVd**



**Malformazioni di fiori
di crisantemo
causate da CSVd**

A close-up photograph of a palm leaf showing symptoms of Coconut Cadang-Cadang Virus Disease (CCCVd). The leaf is oriented vertically, with the central vein and secondary veins clearly visible. The tissue between the veins is yellowed and shows signs of necrosis, particularly in the lower half of the leaf. The background is a blurred green, suggesting other palm leaves.

**Sintomi causati
dal CCCVd su
folgie di palma
da cocco**

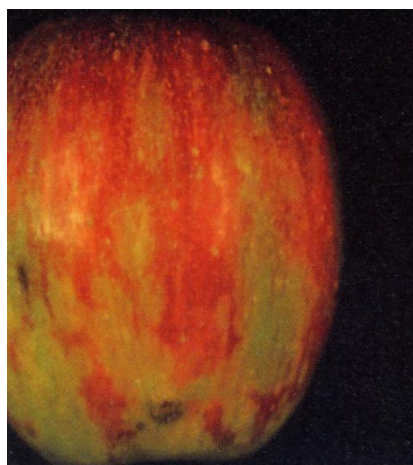
**Sintomi causati sa
ASBVd su frutti di
avocado**





**Rugginosità
dei frutti di
melo**

ASSVd

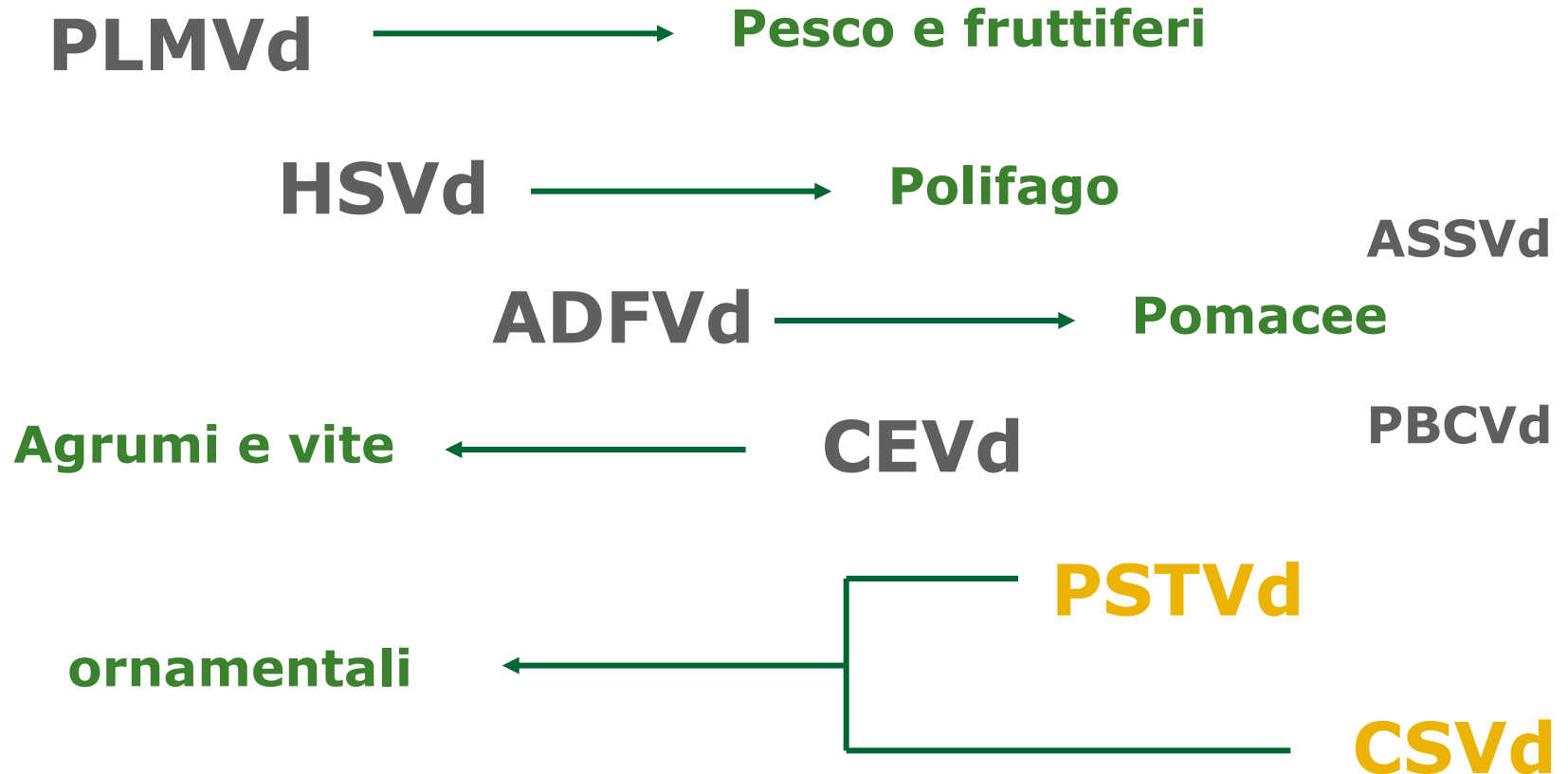


**Maculatura dei
frutti "apple
fruit dapple"**



Buccia rugginosa del pero

Viroidi agenti di importanti malattie in Italia

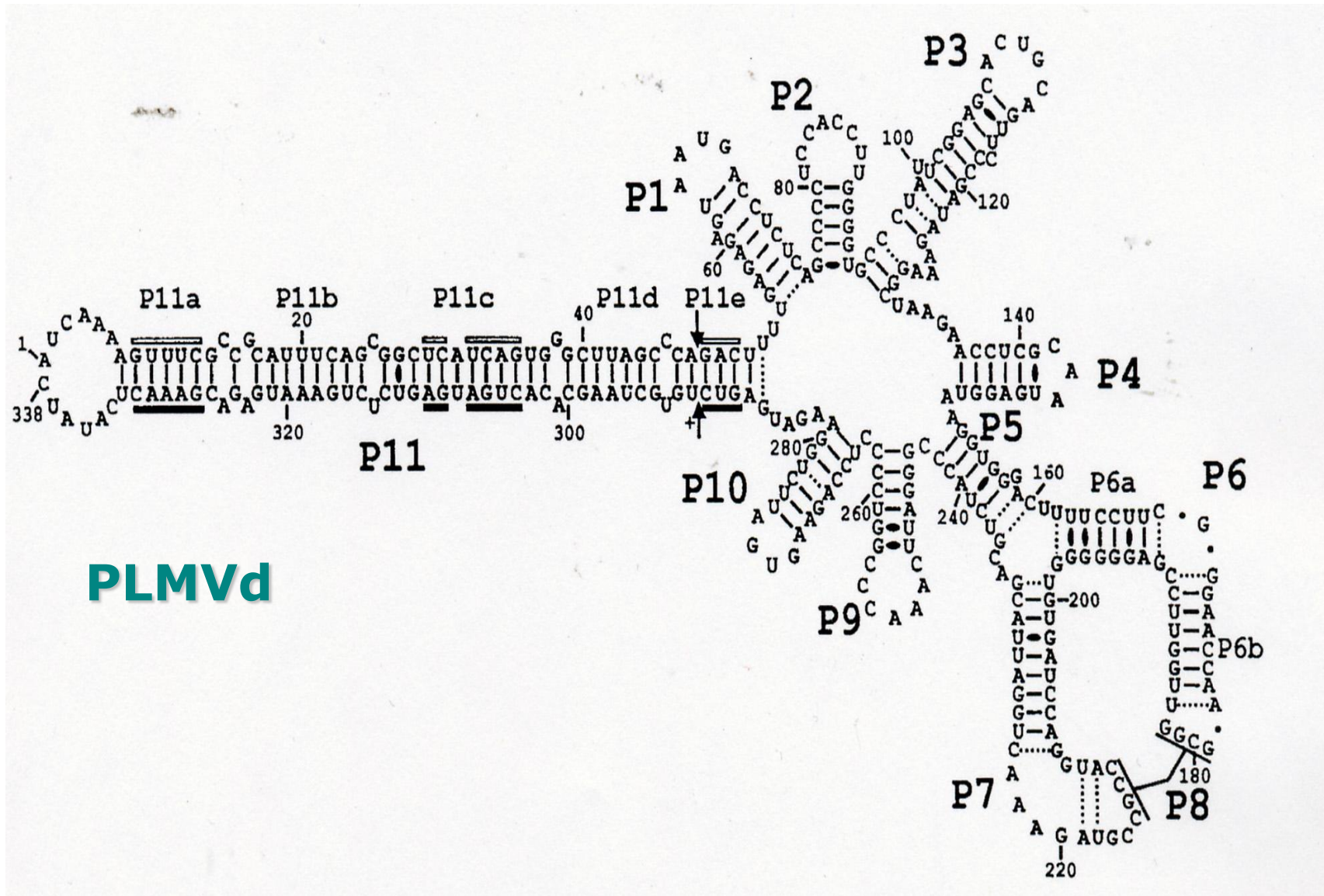


**Viroide del mosaico latente del pesco
(PLMVd= *Peach latent mosaic viroid*, 335-
337 (350) nt, famiglia *Avsunviroidae*,
genere *Pelamoviroidi*)**

**Presente in ogni paese e
Continente, in Italia segnalato per
la prima volta nel 1992**

**❖ Sintomatologie diverse ma
mai....."latente"!!!**





PLMVd

Calico

Ramo



Frutti



Foglie



U
U
U



PLMVd

CALICO STRAIN

Viroide del nanismo del luppolo (HSVd= *Hop stunt viroid*, 295-303 nt, famiglia *Pospiviroidae*, genere *Hostuviroidi*)

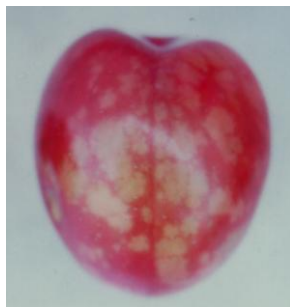
Polifago

in vite, ciliegio e pero l'infezione sempre latente, nelle drupacee e negli agrumi in funzione degli isolati

- ❖ in luppolo causa nanismo,**
- ❖ negli agrumi causa la "cachessia",**
- ❖ in susino e pesco la "pomellatura" dei frutti**
- ❖ in albicocco deformazioni e rugosità**

DAPPLE FRUIT

'Florentia'



'Angelino'



'Sorriso di primavera'



HSVd



DEFORMAZIONI
'Vitillo'



CLOROSI
'San Castrense'



RING POX

Cachessia degli agrumi

HSVd



**Produzione di gomma e
punteggiature al di sotto
della corteccia**

**specie suscettibili
mandarini e clementine**



Isolate Nt Domains and nucleotide sequences

Isolate	Nt	Domains and nucleotide sequences											
		T _L		P				C					
		TCH							Core				
X-701	1	CUGGGGAAUU	CUCGAGUUGC	CGCAUAAGGC	AAGCAAAGAA	AAAACAAGGC	AGGGAGGAGA	CUUACCUGAG	AAAGGAGCCC	CGGGGCAACU	CUUCUCAGAA		
X-704	U.....A.....		
X-707	G	CA.....-		
X-712			
X-715			
CVd-IIb			
CVd-IIc		CA.....-		
Ca-903	G-		
CVd-IIa (117)			
CVd-IIa (1)	G-		
CVd-IIa (2)	G-		

Isolate	Nt	Domains and nucleotide sequences											
		V		T _R				V					
		108	110	116					189	194			
X-701	101	UCCAGCGGG-	GGCGU-GGAG	AGAGGGCCGC	GGUGCUCUGG	AGUAGAGGCU	UCU-GCUUGG	AAACACCAUC	GAUCGUCCCU	UCUUCUUU-A	CCUCCUUCUG		
X-704			
X-707			
X-712			
X-715			
CVd-IIb			
CVd-IIc			
Ca-903			
CVd-IIa (117)	A..A..A..A..U..U..C..C..		
CVd-IIa (1)	A..A..A..A..U..U..C..C..		
CVd-IIa (2)	A..A..A..A..U..U..C..C..		

Isolate	Nt	Domains and nucleotide sequences										
		C				P		T _L		TCH		
		Core										
X-701	201	GCUCUUCGAG	UGAGACGCGA	CCGGUGGCAU	CACCUCUCGG	UUCGUCUUCC	AACCUGC-UU	UUUGUCUAUC	UGAGCCUCUG	CCGCGGAUCC	UCUCUUGAGC	CCCU
X-704	CGAG..
X-707	CGA---	G.....C..
X-712	
X-715	
CVd-IIb	CGAG..
CVd-IIc	CGA---	G.....C..
Ca-903	
CVd-IIa (117)	
CVd-IIa (1)	CGA	G.....	A.....
CVd-IIa (2)	

Viroide dell'infossatura crateriforme del melo (ADFVd= Apple dimple fruit, 306 nt, famiglia *Pospiviroidae*, genere *Apscaviroidi*)

E' stato segnalato solo in Italia e recentemente in nord Africa

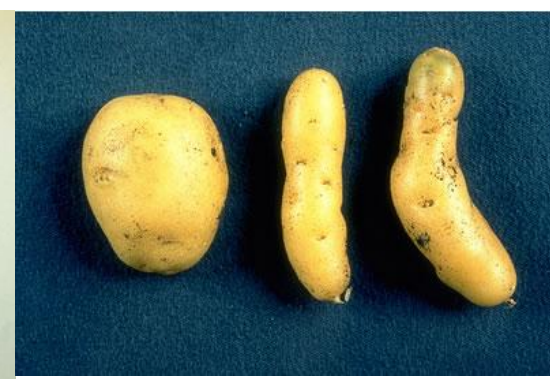


Viroide dell'exocortite degli agrumi (**CEVd= Citrus exocortis viroid**, 370-375 nt, famiglia *Pospiviroidae*, genere *Pospiviroidi*)

Presente probabilmente in tutti gli agrumeti italiani, non ha raggiunto dannosità elevata per l'uso del PIN tollerante Arancio amaro, mentre sintomi evidenti si hanno con l'uso del PIN suscettibile *Poncirus trifoliata*.



Viroide del tubero fusiforme della patata (**PSTVd**=*Potato spindle tuber viroid*, 359 nt, famiglia *Pospiviroidae*, genere *Pospiviroidi*)



**Viroide del nanismo del crisantemo (CSVd=
Chrysanthemum sunt viroid 354-356 nt,
famiglia *Pospiviroidae*, genere *Pospiviroidi*)**



**Riduzione di sviluppo,
rottura di colore**



DIAGNOSI

**diagnosi
indiretta**

**saggi biologici su piante
indicatrici erbacee e legnose**

**diagnosi
diretta**

**microscopia
sierologia
tecniche molecolari**

DIAGNOSI BIOLOGICA

Consente il rilevamento della presenza del patogeno in un campione grazie alla sua **infettività**



Il patogeno viene trasferito su piante indicatrici per inoculazione sperimentale.



**SAGGI su
INDICATORI ERBACEI**



**SAGGI su
INDICATORI ARBOREI**

Saggio biologico su piante arboree

Saggio biologico su piante erbacee





**Saggio biologico di
CEVd sull'indicatore
*Citrus medica***

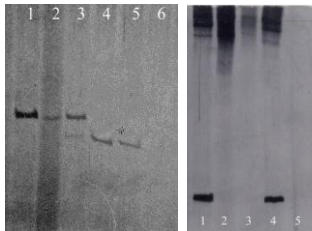
DIAGNOSI MOLECOLARE



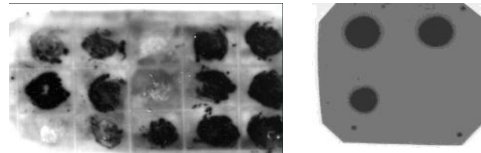
ESTRAZIONE RNA VIROIDALE



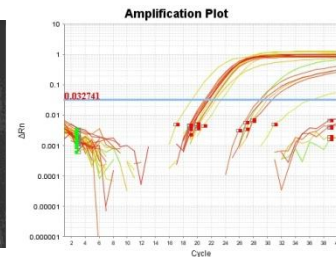
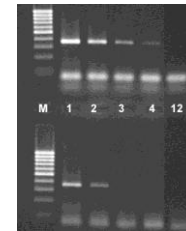
rPAGE



IBRIDAZIONE MOLECOLARE



RT-PCR
qRT-PCR



Estrazione di RNA totale

L'RNA viene estratto mediante macerazione con mortaio e pestello in azoto liquido



Le fasi dell'estrazione sono:

1 omogenizzazione dei campioni in tamponi ad elevata forza ionica e Sodio dodecil solfato (SDS) per distruggere le nucleoproteine dell'ospite;

2 estrazioni successive con fenolo, glicole etilenico e cloruro di litio per rimuovere rispettivamente proteine, polisaccaridi ed acidi nucleici ad alto peso molecolare

3 Precipitazione dei rimanenti acidi nucleici



Elettroforesi bidimensionale (rPAGE)

Gli acidi nucleici estratti e parzialmente purificati (CF11) vengono separati mediante 2 successive elettroforesi

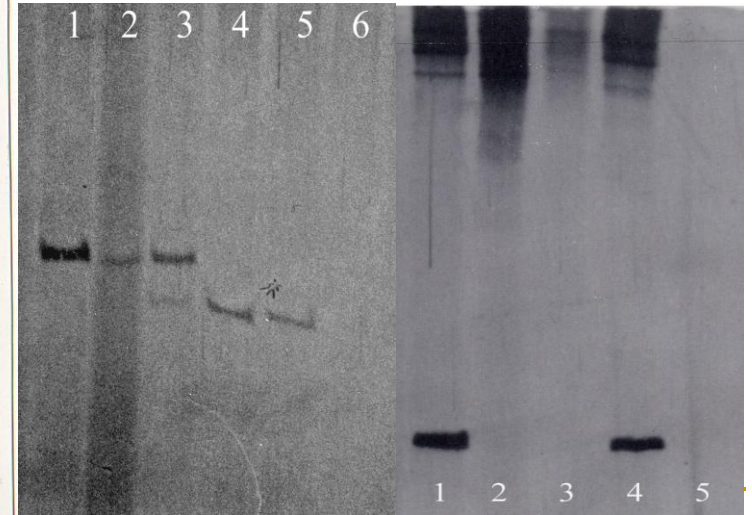
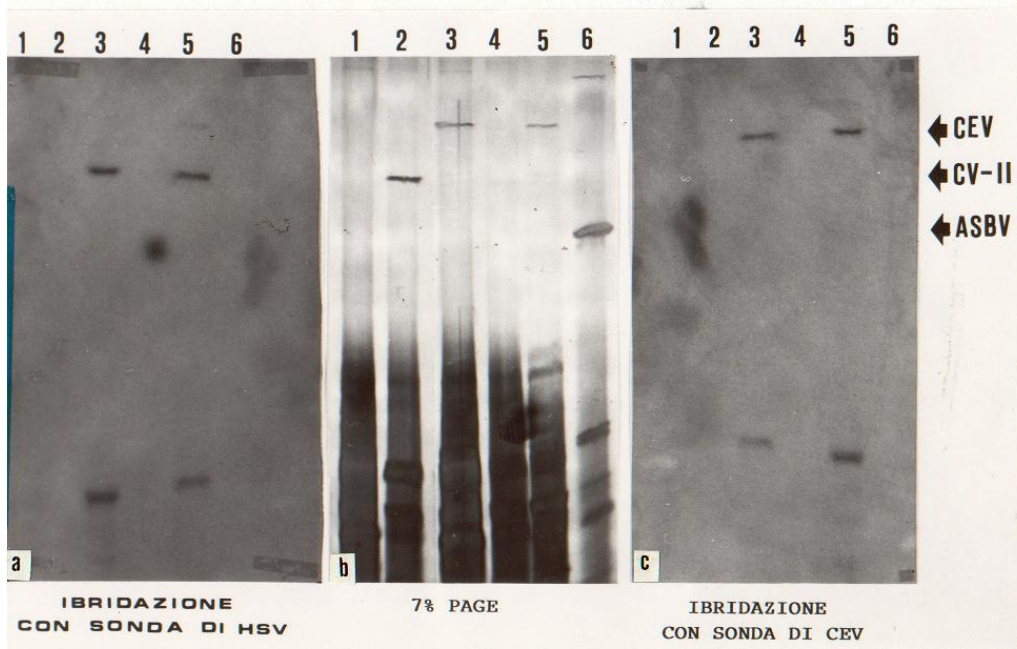
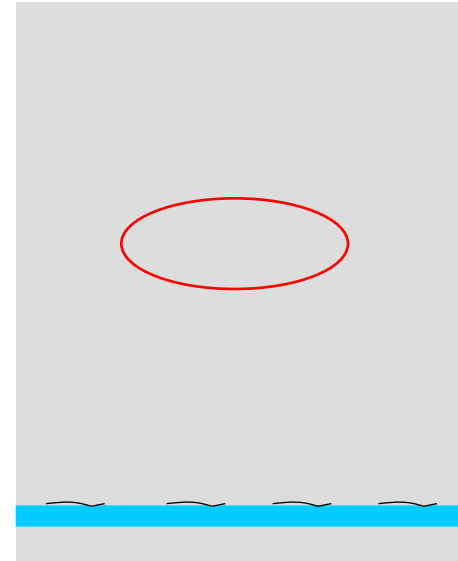
la prima in un gel standard al 5% di acrilammide, la seconda in un gel denaturante (UREA) al 7% di acrilammide per favorire la separazione degli RNA viroidali circolari da quelli lineari e da tutti gli acidi nucleici contenuti nell'estratto

Dopo colorazione è possibile evidenziare la presenza dell'RNA viroidale.

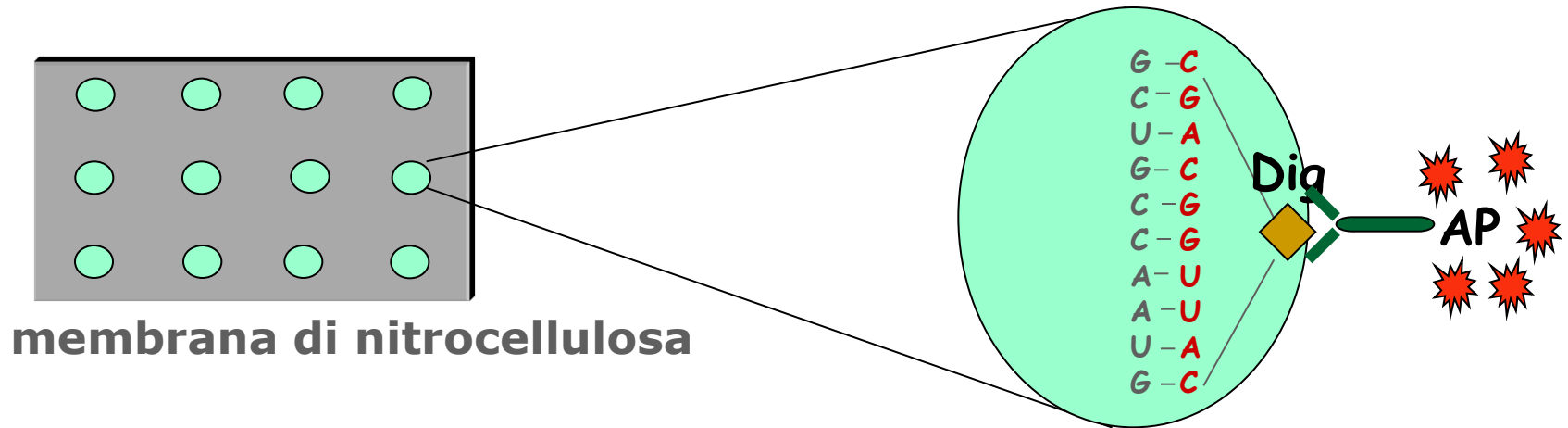
5% PAGE

7% PAGE + urea 7M

rPAGE



IBRIDAZIONE MOLECOLARE



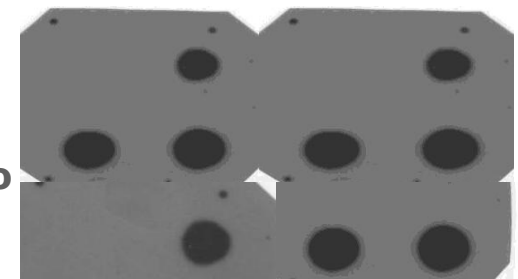
Pellicola fotografica



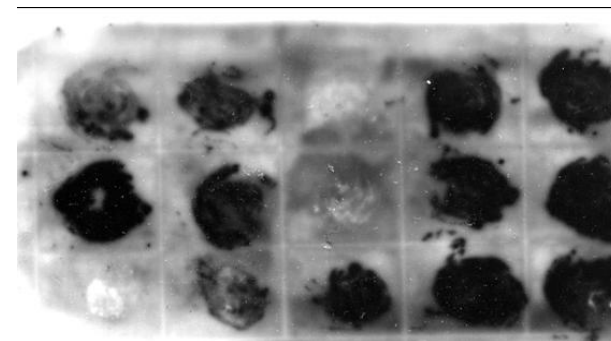
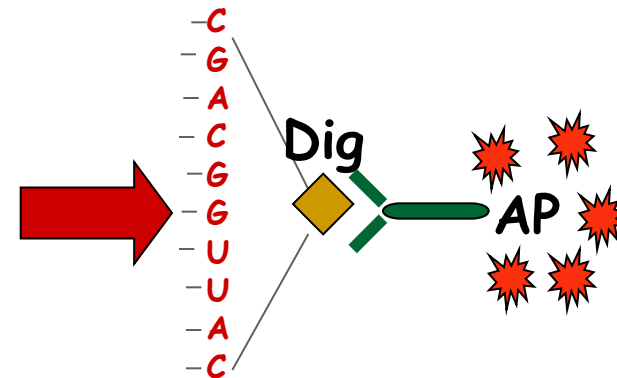
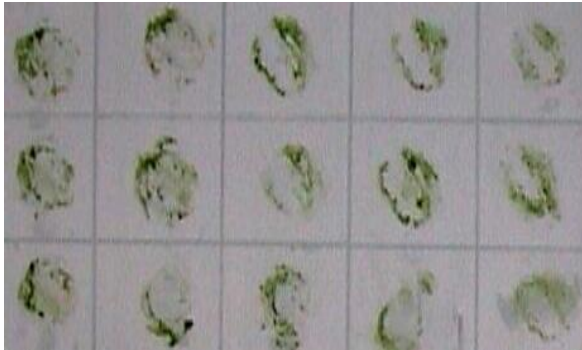
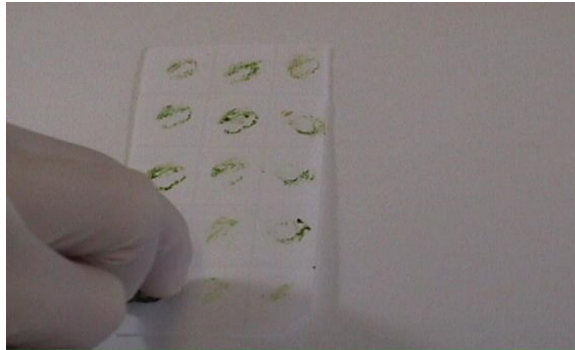
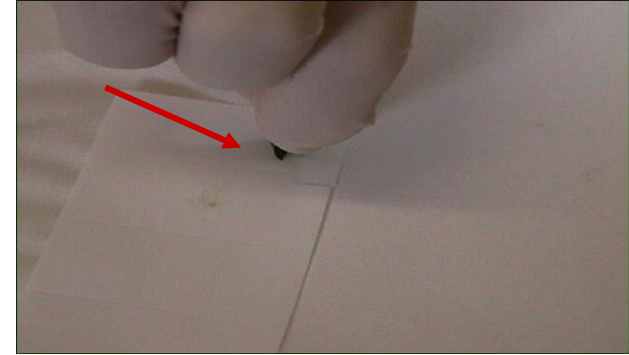
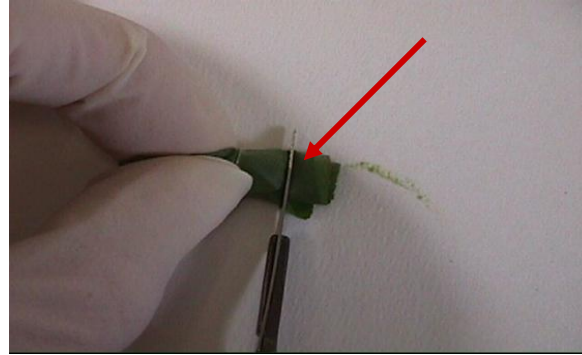
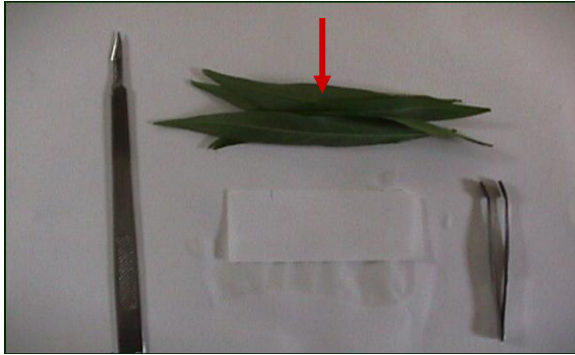
sviluppo



fissaggio



Ibridazione molecolare per impronta di tessuto



RT-PCR = Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction

Reazione di retrotrascrizione: l'RNA viroidale viene trascritto nel corrispondente cDNA per mezzo di un enzima di retro trascrittasi (AMV o M-MLV)

Reazione di amplificazione: il cDNA viene ciclicamente sintetizzata dando origine ad un frammento genico identico a quello utilizzato come stampo

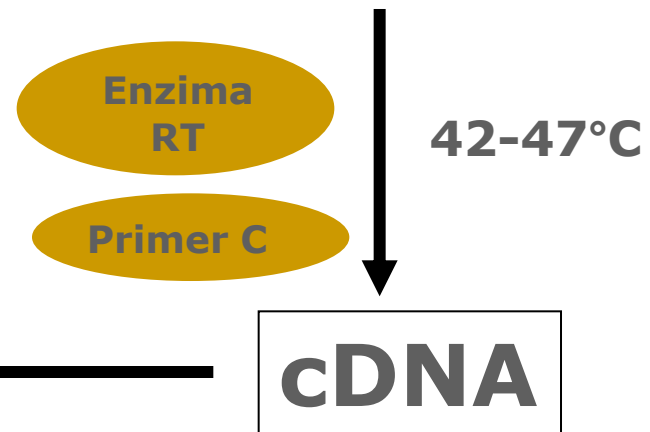
La reazione di sintesi è catalizzata da un particolare enzima, chiamato Taq DNA polimerasi (da *Termus aquaticus*)

La specificità è assicurata dalla presenza nella miscela di reazione di sequenze di innesco (primers)

Reverse Transcriptase

RNA viroide

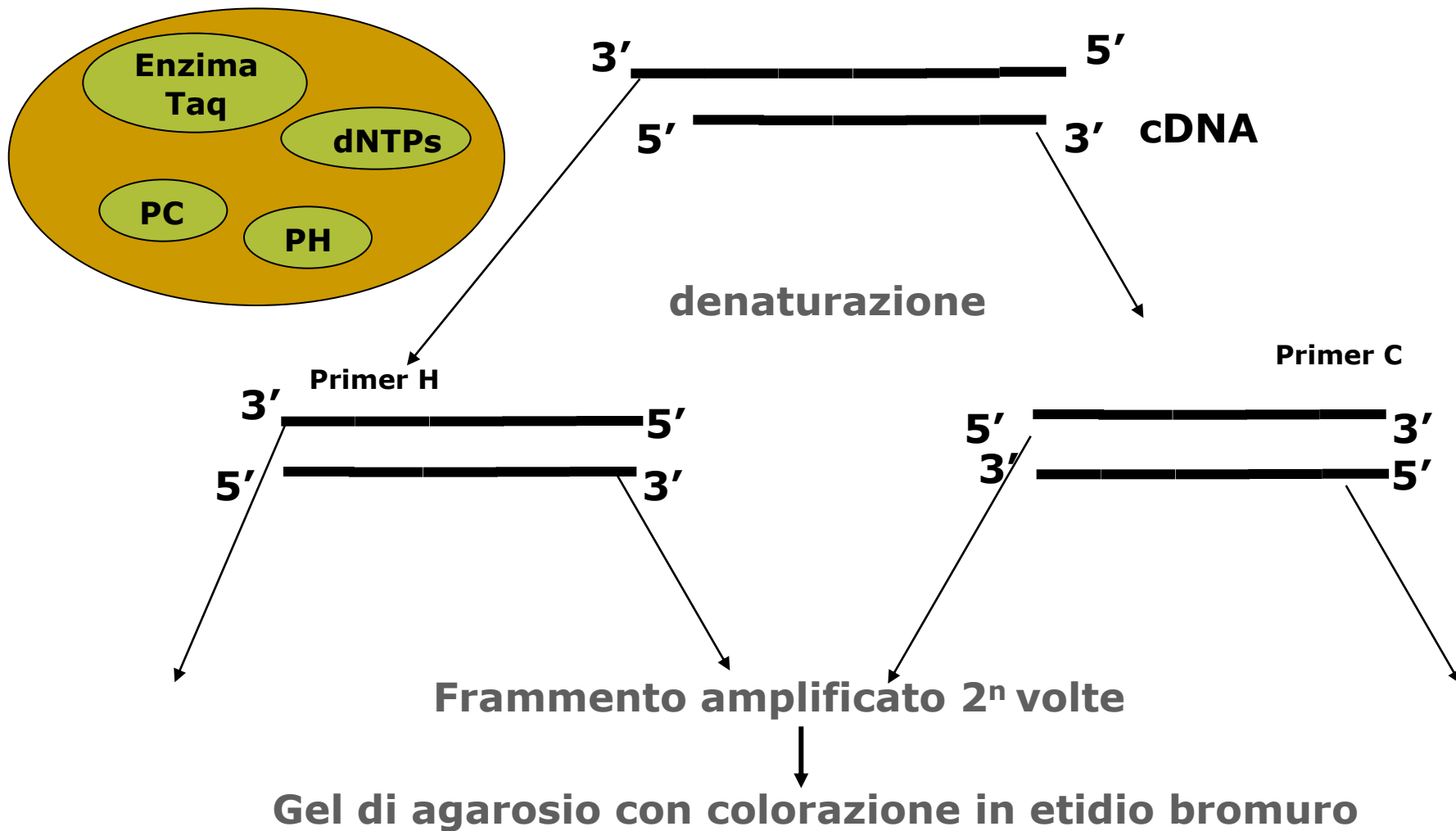
in presenza della trascrittasi
inversa (RT) e di opportune
condizioni termiche...

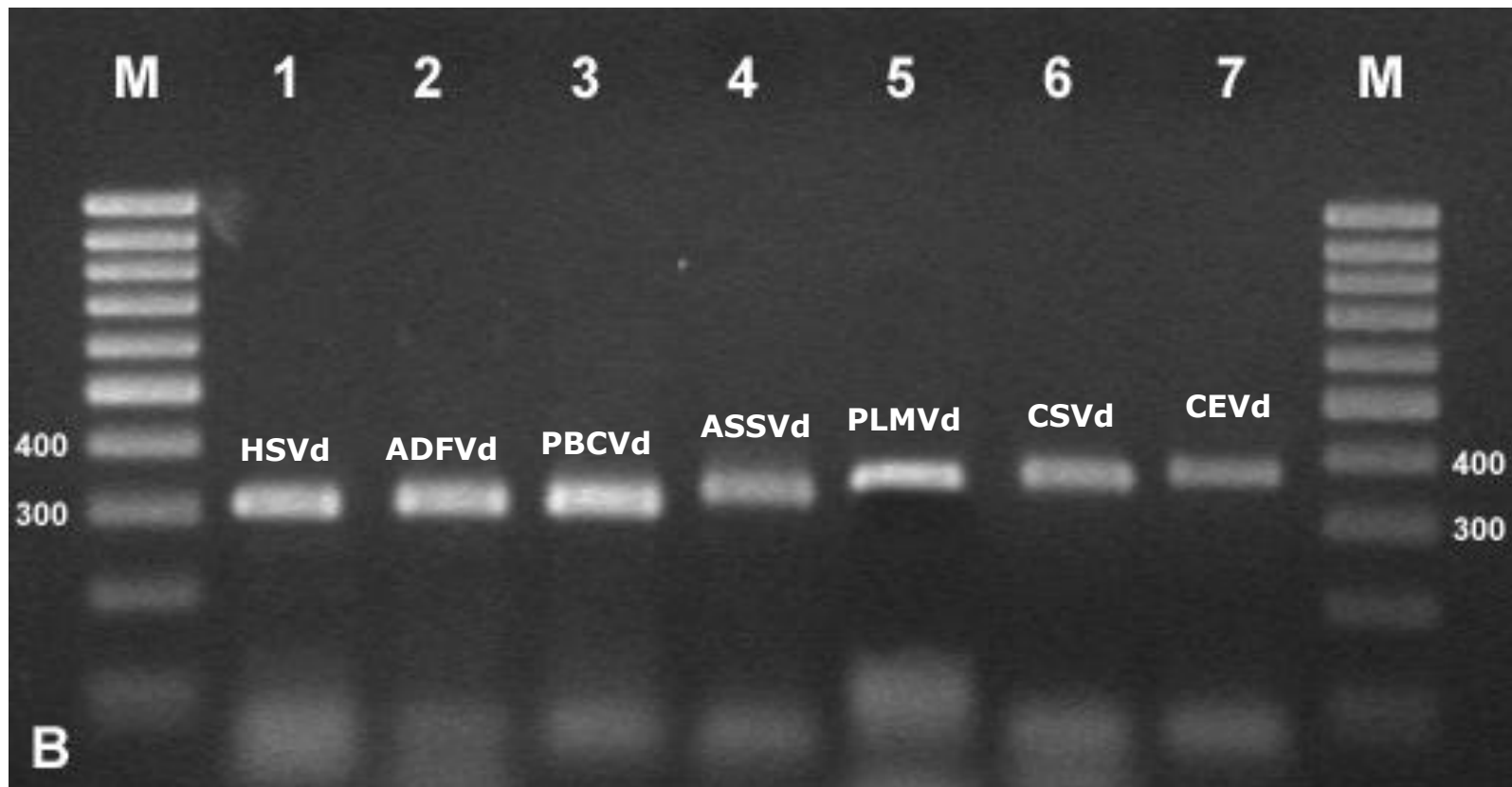


Amplificazione

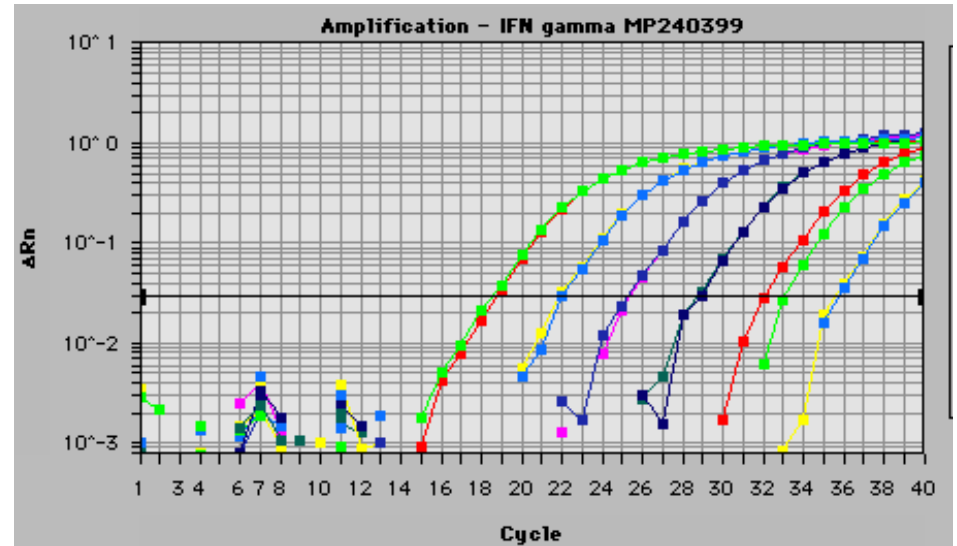


PCR





Real timePCR



Individua e
quantizza
un reporter
fluorescente

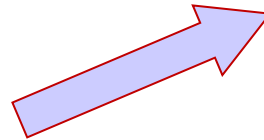
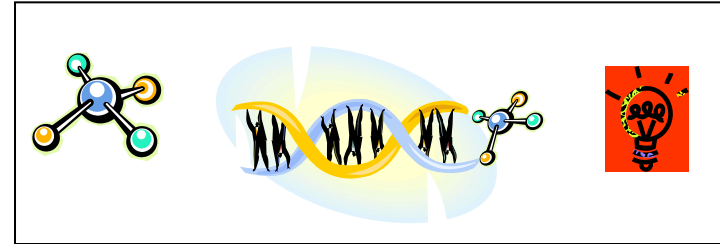
Segnale fluorescente
aumenta in modo
proporzionale con la
quantità di prodotto
PCR

SISTEMA della PCR Real Time

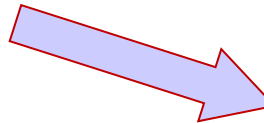
Termociclatore

**+
Sistema che
genera
fluorescenza**

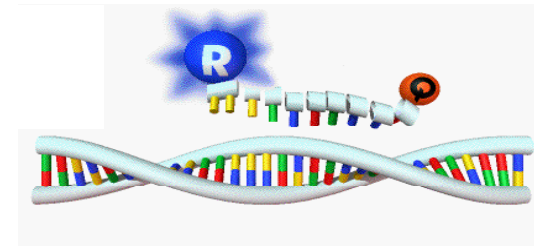
**+
sistema ottico**



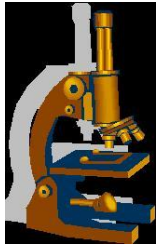
**SYBR® Green
(aspecifico)**



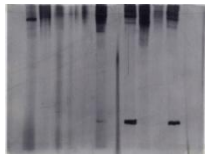
**TaqMan®
(specifico)**



METODI DI DIAGNOSI



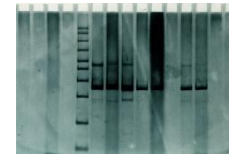
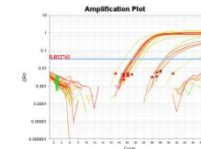
Saggio biologico: uso di piante indicatrici
vantaggi : molto affidabile,
svantaggi: la risposta richiede tempi lunghi,
ampi spazi, serre condizionate



Saggio elettroforetico: rPAGE

vantaggi: permette di valutare le dimensioni, ad ampio spettro

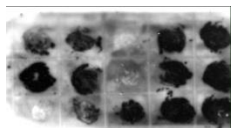
svantaggi: poco sensibile, limitazione del numero di campioni, tempi lunghi di estrazione



RT-PCR e qRT-PCR: amplificazione selettiva dell'intero genoma del viroide

vantaggi: altamente sensibile, veloce, applicabile ad un buon numero di campioni contemporaneamente

svantaggi: altamente specifico, richiede personale specializzato



Ibridazione molecolare: uso di sonde "fredde"

vantaggi: molto sensibile, permette un'analisi massale

svantaggi: disponibilità sonda, manualità non immediata

LOTTA E PREVENZIONE

Uso di materiale di propagazione sano

Rimozione e distruzione delle piante infette

Attenzione ai possibili vettori

Grazie a tutti per l'attenzione

Francesco Faggioli

e-mail: francesco.faggioli@crea.gov.it