



REGIONE PUGLIA
AREA POLITICHE PER LO SVILUPPO RURALE

PROGRAMMA SVILUPPO RURALE FEASR 2007-2013 Reg. (CE) 1698/2005

Asse II "Miglioramento dell'ambiente e dello Spazio Rurale"

Misura 214 "Pagamenti Agroambientali"

"Azione 4 Sub azione a): "Progetti integrati per la Biodiversità"

Re.Ger.O.P. – Re.Ger.Fru.P – Re.Ge.Vi.P



SUB ATTIVITA' 5a

INDIVIDUAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UN BADNAVIRUS IN UNA CV. AUTOCTONA DI VITE PUGLIESE

Chiumenti M., Giampetruzzi A., Morelli M., Savino V. N., Martelli G. P., La Notte P., Palmisano F., Saldarelli P.

INTRODUZIONE

Poichè prevalentemente propagata per via vegetativa, la vite è esposta ad un gran numero di agenti patogeni sistemici, in particolar modo ad agenti infettivi intracellulari: si conta che siano stati descritti più di 70 patogeni considerando solo virus, viroidi e fitoplasmi. Al fine di definire lo stato sanitario "assoluto" di alcune cultivar originarie della Puglia è stato utilizzato un approccio di sequenziamento massale di nuova generazione (NGS). La NGS è una nuova tecnica di diagnosi aspecifica, in continua evoluzione, che consente lo studio di virus e viroidi ma anche la scoperta *de novo* di patogeni su campioni di piante. In questo lavoro si descrive la prima evidenza della presenza di un virus a DNA, appartenente al genere *Badnavirus*, rinvenuto su una vite autoctona e simile al recentemente descritto virus associato alla decolorazione fogliare di Roditis in Grecia (GLRDaV).

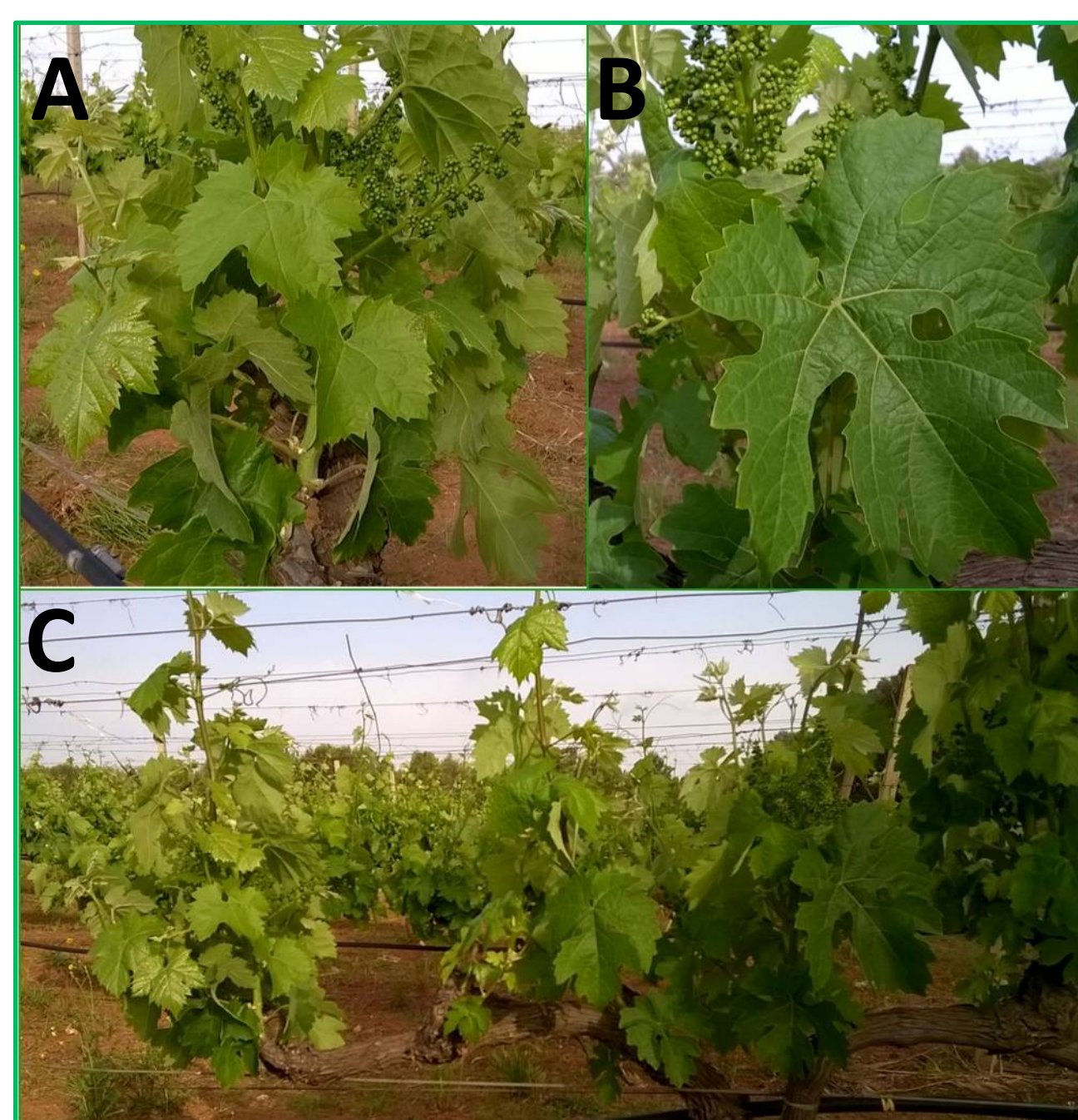


Figura 1. Bombino Nero, clone D205.
A. Gruppi di foglie;
B. Dettaglio di una foglia;
C. Aspetto generale della pianta.

MATERIALI E METODI

Nel giugno 2014, i tessuti fogliari provenienti dalla cv. autoctona di Bombino nero sono stati impiegati per la sintesi di una libreria di piccoli RNA. La vite impiegata per questo esperimento è un clone omologato (D205) mantenuto nel campo di conservazione di Otranto (LE):

Utilizzando la tecnologia Illumina, la libreria è stata sottoposta ad un sequenziamento "single read" di 50 basi.

I dati provenienti dal sequenziamento sono stati sottoposti ad analisi bioinformatiche primarie e secondarie, mediante assemblaggio *de novo* e ricerca per omologia dei contigs così ottenuti su banca dati NCBI. Le reads sono state riassemblate sulla sequenza di riferimento mediante il programma SOAPaligner. Le validazioni sono state ottenute con saggi PCR su stampi di DNA ottenuti mediante estrazione con reagente Plant DNAzol.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dall'analisi BLAST dei contigs, 21 (di dimensioni comprese tra 329 e 56 nt) sono stati identificati come derivanti da badnavirus. In particolare, tra questi ultimi, l'omologia ricorrente si è avuta con Fig Badnavirus-1 (FBV-1, Genbank accession No. NC017830). Utilizzando l'allineatore SOAP, le reads della libreria sono state mappate sul genoma di FBV-1. Sono state identificate 1857 reads non ridondanti allineate sul genoma di FBV-1, e, nelle zone in cui le reads allineate erano più conservate, sono stati disegnati degli oligonucleotidi, mantenendo anche le mutazioni puntiformi delle reads rispetto alla sequenza di riferimento. Mediante saggio PCR è stato ottenuto un amplicone di 410 nt, il cui sequenziamento convenzionale ha confermato la presenza di un badnavirus. Tale sequenza ha mostrato il 93% di similarità a livello proteico con la regione della proteasi della poliproteina di FBV-1 (Figura 2). Lo stesso DNA ha mostrato il 91% di identità a livello nucleotidico con una regione omologa del genoma di GLRDaV.

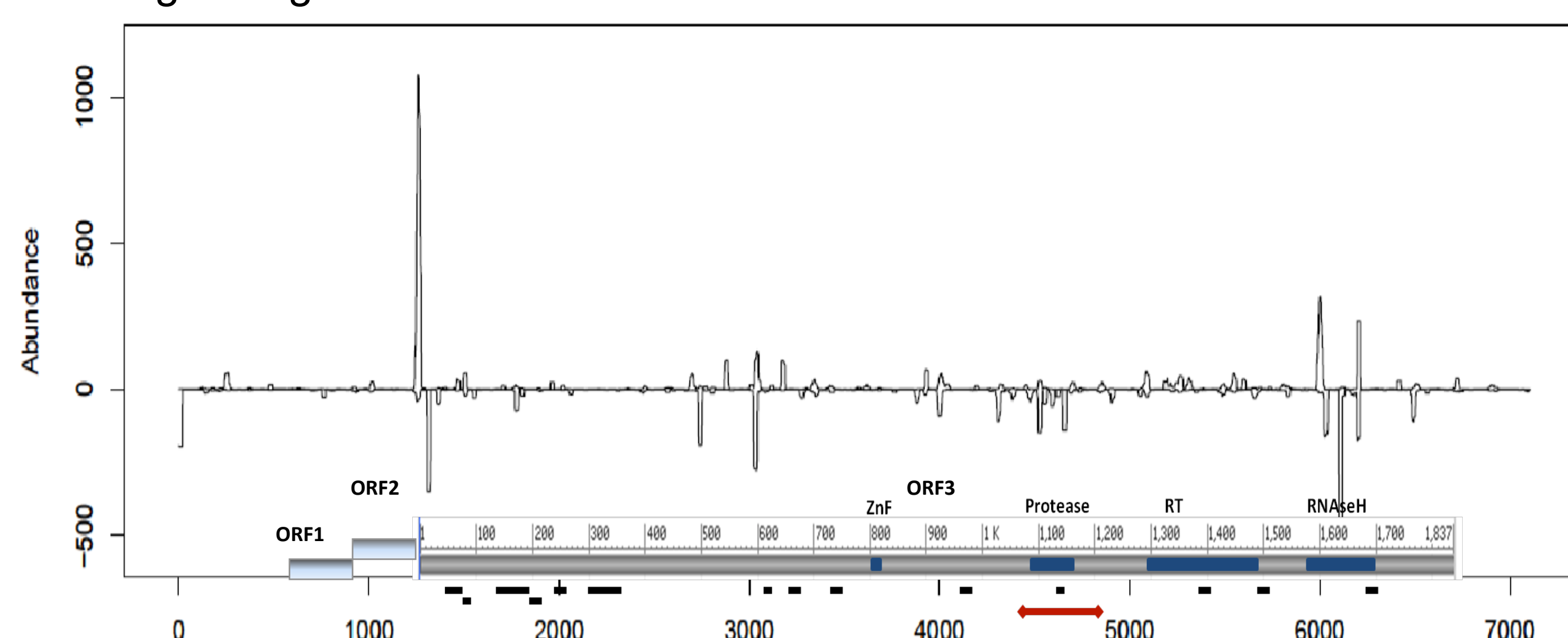


Figura 2. Rappresentazione grafica del genoma linearizzato di FBV-1. Gli hotspot rappresentano la distribuzione delle reads di VIT5 contro la sequenza di riferimento di FBV-1. In basso, le barre in grigio chiaro rappresentano l'organizzazione delle sequenze codificanti con l'organizzazione della poliproteina (ORF3) nelle sue regioni funzionali (Zinc finger, Proteasi, Retrotrascrittasi ed RNAsiH).

Le linee in nero corrispondono ai contigs che mappano sulla poliproteina. La barretta in rosso indica il frammento diagnostico amplificato con PCR, utilizzando gli oligonucleotidi disegnati sui piccoli RNA di D205 allineati sul genoma di FBV-1.

Al fine di acquisire informazioni sulla presenza del virus in altre accessioni oltre che nella fonte su cui è stato individuato, un'indagine è stata svolta sullo stesso campo di omologazione. 11 campioni provenienti da diverse cultivar autoctone sono state analizzate in PCR per la presenza del virus, ma nessuna di queste è risultata positiva.

CONCLUSIONI

L'ICTV (International Committee for Virus Taxonomy) stabilisce come soglia per l'identificazione di una nuova specie di badnavirus, un'omologia di sequenza dell'80% nella regione della retrotrascrittasi. L'omologia di sequenza osservata nel nostro frammento rispetto al genoma di GLRDaV, fa ipotizzare che il nostro virus ne sia una variante molecolare piuttosto che una nuova specie. Vale la pena sottolineare che la cv. di Bombino Nero è un clone registrato a bacca rossa, il quale è stato tenuto in osservazione per anni, senza mai mostrare sintomi di infezioni virali. Inoltre, contrariamente alla cv. Roditis su cui il GLRDaV è stato descritto risultata infetta anche da virus associati al complesso del legno riccio ed accartocciamento fogliare, il clone Bombino Nero D205 risulta esente da tutti i virus contemplati nel disciplinare di produzione di materiale di vite categoria (D.M. 07/07/2006 and D.M. 24/06/2008).