

ROSA LA ROSA, GUIDO BOCCARDO* e MARIO DAVINO

Istituto di Patologia vegetale, Università Catania

*Laboratorio di Fitovirologia applicata, CNR, Torino

L'ANALISI ELETTROFORETICA APPLICATA ALLA DIAGNOSI DEL VIROIDE
DEL NANISMO DEL CRISANTEMO¹⁾

Tra le numerose fitopatie del crisantemo (Chrysanthemum morifolium Ram.) particolarmente grave è quella nota come nanismo del crisantemo, causata da un viroide ("Chrysanthemum stunt viroid"; CSV), la cui presenza è stata accertata in Sicilia e in Calabria (LA ROSA et al., 1983).

La frequenza con cui la malattia si riscontra nelle serre specializzate per produzione del fiore, valutata su base sintomatica fino al 30%, e i problemi che crea agli agricoltori per la sua diffusione su diverse cultivar (LA ROSA et al., l.c.), rende necessaria l'applicazione di tecniche di saggio rapido, sensibili e riproducibili. A tal fine particolarmente idonea potrebbe risultare l'analisi elettroforetica: sono state pertanto effettuate delle ricerche per mettere a punto un metodo di routine da applicare su larga scala.

Materiali e metodi

Le prove hanno riguardato diverse fasi del processo di analisi al fine di individuare le condizioni ottimali di

1) Lavoro eseguito con un contributo CNR per ricerche sui "Virus e virosi delle piante".

impiego, relativamente a:

- a) le tecniche d'estrazione;
- b) la distribuzione del viroide in organi diversi delle piante, con e senza sintomi;
- c) le modalità di conservazione del campione;
- d) l'elettroforesi.

a) Tecniche d'estrazione. La preparazione dell'estratto è stata effettuata con tre modalità differenti:

- 1) triturazione dei tessuti in mortai in presenza (3:1; v:p) di tampone TNE (tris 0,2 M, cloruro di sodio 0,1 M, acido etilendiaminotetracetico 10 mM, polivinilpirrolidone 2%, pH 8,5-9,5), estrazione degli acidi nucleici con un volume di fenolo saturo d'acqua ed un volume di una miscela di cloroformio: alcole isoamilico e precipitazione con 2,5 volumi di etanolo;
- 2) triturazione del campione in presenza (1:1; p:v) di una soluzione contenente glicina 0,2 M, fosfato disodico monobasico 0,1 M, cloruro di sodio 0,6 M e 1% di sodio dodecil solfato (SDS) pH 9,5 (MORRIS e SMITH, 1977), come descritto in precedenza (LA ROSA et al., l.c.), estrazione degli acidi nucleici con quattro volumi della miscela di fenolo e di cloroformio: alcole isoamilico e precipitazione con 2,5 volumi di etanolo;
- 3) triturazione di un grammo di tessuto con 1,75 ml di una soluzione contenente cloruro di sodio 1 M, SDS 1% (p:v), tris-HCl 0,2 M, pH 8,5 (soluzione A) ed 1,75 ml di una soluzione fresca di acetato magnesio 1 M (5 ml), polivinilpirrolidone 10% + sodio azide 4% (100 ml), sodio dietilditiocarbammato (2 g) e 2-mercaptoetanol (4 ml), il tutto portato a 200 ml con H₂O distillata (PALUKAITIS e SYMONS, 1980). La miscela viene agitata in becker x 20'.

aggiungendo 0,4 g NaCl. Dopo centrifugazione x 20' a 20.000 g, 2-3 volumi di etanolo freddo si addizionano al supernatante, incubando a -15°C x 2 h circa. Dopo centrifugazione x 10' a 10.000 g il pellet si essicca sotto vuoto per circa 1 h e si risospende in 2 ml della soluzione A + 1% di 2-mercaptoetanolio; quindi si addizionano 0,5 ml di fenolo saturo d'acqua e 0,5 di miscela cloroformio-alcole isoamilico (25:1, v:v), si agita x 10' circa e si centrifuga x 20' a 10.000 g. Il supernatante ottenuto si dializza per 1 notte, a 4°C, in tampone NaCl, EDTA (acido etilendiaminotetracetico) 0,1 mM pH 7, rinnovato almeno 1 volta. Al dializzato si addizionano 2 volumi di etanolo freddo e acetato di sodio (5 M, pH 6), fino a portarlo a 0,2 M; si incuba per 1 h a -15°C e gli acidi nucleici precipitati vengono raccolti centrifugando x 10' a 10.000 g.

Le preparazioni di acidi nucleici ottenute con le diverse tecniche di estrazione descritte vengono poi risospese in Na acetato 0,1 M ed acido etilendiaminotetracetico (sale sodico) 1 mM cui viene aggiunto LiCl 10 M fino ad ottenere la concentrazione finale 2 M. Dopo incubazione a 0°C per una notte (od alternativamente a -20°C per 4 ore) i preparati vengono centrifugati per 10' a 10.000 g ed il precipitato, contenente gli acidi nucleici monocatenari insolubili in LiCl, si scarta mentre il supernatante si incuba nuovamente con 2 volumi di etanolo freddo per 1 ora a -15°C. Il prodotto finale delle estrazioni, recuperato mediante centrifugazione a 10.000 g x 10' - consistente in DNA, eventuale dsRNA, RNA di CSV e tRNA - viene risospeso in un conveniente volume minimo di tampone di elettroforesi contenente 15% di saccarosio e 0,02% di blu di bromofenolo.

b) Distribuzione di CSV in crisantemo. La distribuzione del viroide nelle piante naturalmente infette è stata evidenziata in prove di estrazione e successiva elettroforesi di tessuti di organi differenti di piantine di crisantemo cv Yellow Marble e Dark Pink Marble. Da ogni pianta si è prelevata la parte più giovane dell'apparato radicale, le foglie giovani completamente espanse e i capolini. Poichè nelle nostre prove elettroforetiche si era constatato che l'estrazione con la metodica di PALUKAITIS e SYMONS (l.c.) offriva risultati migliori, la macerazione dei tessuti ed il procedimento di estrazione sono stati eseguiti con questo metodo.

c) Persistenza di CSV in tessuti recisi. La capacità massima di persistenza del viroide nei tessuti staccati dalla pianta è stata accertata in materiale infetto conservato con diverse modalità. Campioni di foglie sono stati mantenuti per 13 giorni a temperatura ambiente ed altri in frigorifero a 4°C, effettuando le estrazioni ogni 3 giorni. Un'altra aliquota del campione è stata congelata subito dopo il prelievo e conservata in freezer a -25°C per alcuni mesi.

d) Elettroforesi. L'elettroforesi degli acidi nucleici è stata effettuata su lastra (18 x 18 x 0,2 cm) di gel di poliacrilammide al 5% in una vasca (Bio-Rad, Protean Double Slab Cell) contenente tris 90 mM, acido borico 90 mM, EDTA 3 mM, pH 8,3 (tampone TBE), come descritto da BOCCARDO et al. (1981). Dopo una pre-elettroforesi per 30' a 10 mA x lastra, aliquote dei prodotti finali di estrazione sono state stratificate sui pozzetti. Sono stati quindi applicati 10 mA per lastra x 20'-30' circa e 35 mA x 2,5 h circa. A fine migrazione la lastra veniva colorata con O-toluidina blu (0,1% in acido acetico 2%) oppure con nitrato d'argento

(SCHUMACHER et al., 1983) e successivamente era esaminata contro un pannello luminoso.

Un'ulteriore elettroforesi dell'estratto è stata effettuata in condizioni denaturanti su gel di poliacrilammide al 5% contenente urea 8 M (PALUKAITIS e SYMONS, l.c.), e sottoponendo la lastra ad una corrente di 10 mA X 20' e successivamente di 25-30 mA (225-250 V) x 2,5 h circa. A fine migrazione la lastra è stata quindi colorata con O-toluidina blu.

Risultati

L'analisi elettroforetica ha permesso di diagnosticare, in laboratorio, la presenza di CSV nelle piante con tutte le tecniche d'estrazione descritte, anche impiegando quantità minime di tessuti. L'estrazione in tampone TNE e quella con il metodo di MORRIS e SMITH (l.c.) hanno permesso di portare a termine l'analisi in 2 gg; i risultati ottenuti sono stati tuttavia non sempre chiari a causa dei numerosi contaminanti presenti negli estratti. Il metodo d'estrazione di PALUKAITIS e SYMONS (l.c.) ha richiesto 3 gg per l'esecuzione dell'analisi, ma ha consentito di ottenere lastre molto chiare con bande ben nette e individuabili. Per tale motivo nelle prove successive è stato preferito agli altri metodi.

L'elettroforesi di estratti stratificati a diluizioni scalari hanno evidenziato, dopo colorazione con O-toluidina blu, bande di CSV sino ad una diluizione del campione corrispondente ad un peso iniziale di tessuto di 22,5 mg (Fig. 1A). La colorazione con sali d'argento si è dimostrata notevolmente più sensibile, consentendo di evidenziare bande di CSV sino a diluizioni del campione corrispondenti ad un peso iniziale di tessuto di 2,25 mg (Fig. 1B).

L'elettroforesi in condizioni denaturanti ha dimostrato

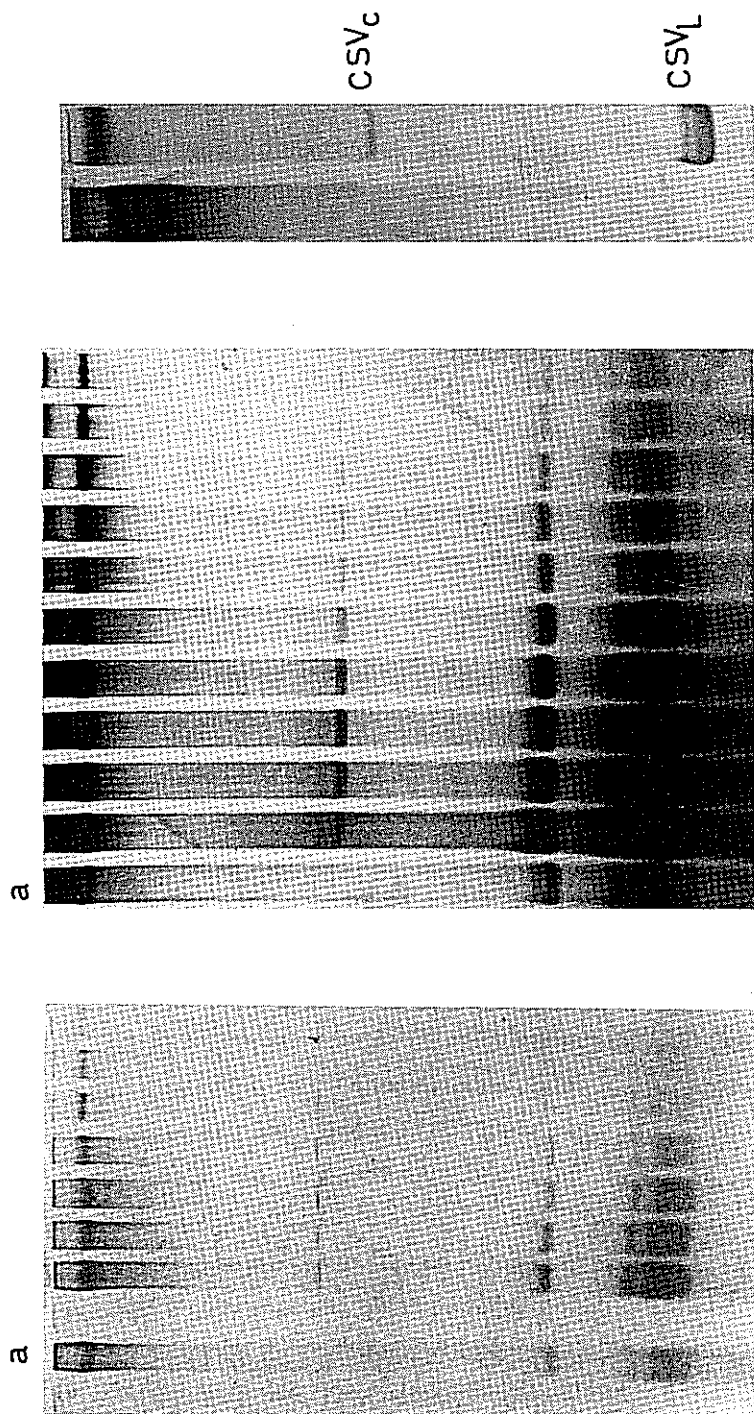


Fig. 1 - Elettroforesi su lastra di gel di poliaccrilammide al 5% di un estratto di acidi nucleici di crisantemo infetto da CSV (a, controllo).

- A) Colorazione in blu di toluidina di diluizioni seriali in cui CSV è visibile sino ad una diluizione del campione corrispondente a 22,5 mg di foglia.
B) Colorazione con nitrato d'argento di diluizioni seriali in cui CSV è visibile sino ad una diluizione del campione corrispondente a 2,25 mg di foglia.

Fig. 2 - Elettroforesi, in condizioni denaturanti, di CSV: CSV_c forma circolare; CSV_L forma lineare (a sinistra, controllo).

che, in presenza di urea, la banda di RNA ascrivibile a CSV si sdoppia in due, la più veloce rappresentando la forma lineare del viroide, la più lenta la circolare (Fig. 2).

Nelle prove d'estrazione e d'elettroforesi da organi diversi di piante infette, mediante diluizioni scalari, il viroide è stato rilevato in tutti gli organi e tessuti esaminati. La sua concentrazione nei diversi organi è risultata tuttavia differente, raggiungendo nei tessuti giovani (apici vegetativi, capolini, radichette) valori pari a circa il doppio di quelli dei tessuti vecchi.

Infine, le prove effettuate sulla capacità di persistenza del viroide nei tessuti hanno dimostrato che, nei campioni conservati a temperatura ambiente o in frigorifero esso è rilevabile fino a 13 gg, mentre in quelli congelati è rilevabile per diversi mesi.

Discussione

L'estrazione con il metodo di PALUKAITIS e SYMONS (l.c.), l'esecuzione dell'elettroforesi su lastra e la rilevazione degli RNA con nitrato d'argento hanno fornito risultati di gran lunga migliori di quelli ottenuti nelle prove precedenti (LA ROSA et al., 1983). Il metodo d'estrazione, senza dubbio più laborioso e lungo degli altri presi in considerazione, offre l'opportunità di conseguire risultati migliori e più facilmente interpretabili, essendo le preparazioni di acidi nucleici così ottenute in migliore stato di conservazione e con minori contaminanti che quelle ottenibili con le altre due metodiche descritte. Anche la tecnica di colorazione delle lastre di gel con sali d'argento si è mostrata particolarmente idonea rispetto alle usuali tecniche di colorazione per la sua elevata sensibilità. Alla luce dei risultati ottenuti si può affermare che il metodo

adottato consente la diagnosi del viroide del nanismo del crisantemo in modo rapido e preciso. Disponendo di una normale attrezzatura da laboratorio e di un apparecchio per elettroforesi due operatori possono infatti condurre l'analisi su 8-10 campioni al giorno.

Sebbene nei nostri saggi di routine si sia sempre operato con un peso iniziale di 4-5 g di tessuto, dalle prove di diluizioni seriali è emerso che sono sufficienti circa 2 mg di tessuto per eseguire l'analisi con una ragionevole affidabilità e pertanto questa potrebbe essere effettuata direttamente da ogni singola talea. A tal fine sarebbe infatti sufficiente prelevare la talea con una foglia in più su cui effettuare l'analisi. L'elevata sensibilità del metodo consente di effettuare il saggio su campioni medi di 10 foglie prelevate da altrettante talee, moltiplicando così il numero di campioni in analisi. Inoltre, la persistenza del viroide nei tessuti, anche a temperatura ambiente, rende agevoli le operazioni di prelievo e le manipolazioni prima dell'analisi elettroforetica per cui sarebbe addirittura possibile spedire per posta i campioni da saggiare in laboratorio.

Riassunto

Il viroide del nanismo del crisantemo, presente nell'Italia meridionale su varie cultivar di crisantemo (Chrysanthemum morifolium), è stato estratto da piante infette con diverse tecniche ed analizzato su lastre di gel di poliacrilammide al 5%, colorate con O-toluidina blu o nitrato d'argento. Le prove effettuate hanno dimostrato che sono sufficienti circa 2 mg di tessuto per ottenere risultati attendibili.

Sono state indagate altre fasi del processo di analisi, riguardanti la distribuzione del viroide in organi diversi delle piante e le modalità di conservazione del campione.

Summary

An electrophoretic technique for the diagnosis of chrysanthemum stunt viroid.

Chrysanthemum stunt viroid, present in Southern Italy in many cultivars of chrysanthemum (Chrysanthemum morifolium) was extracted from plants by various procedures and analyzed in 5% polyacrylamide gel slabs, stained in toluidine blue O or silver. Conditions are given by which about 2 mg tissue are sufficient to obtain a reliable result.

Letteratura citata

- 1) BOCCARDO G., BEAVER R.G., RANGLES J.W., IMPERIAL J.S. (1981). Tinangaja and bristle top, coconut diseases of uncertain etiology in Guam, and their relationship to cadang-cadang disease of coconut in the Philippines. *Phytopathology*, 71, 1104-1107.
- 2) LA ROSA ROSA, CATARA A., GRASSO S., TORRISI A. (1983). Il nanismo del crisantemo in Italia. *Riv. Pat. Veg.*, S. IV (in corso di stampa).
- 3) MORRIS T.J., SMITH E.M. (1977). Potato spindle tuber disease: procedures for the detection of viroid RNA and certification of disease-free potato tubers. *Phytopathology*, 67, 145-150.
- 4) PALUKAITIS P., SYMONS H.R. (1980). Purification and characterization of the circular and linear forms of chrysanthemum stunt viroid. *J. Gen. Virol.*, 46, 477-489.
- 5) SCHUMACHER J., RANGLES J.W., RIESNER D. (1983). Viroid and virusoid detection: an electrophoretic techniques with the sensitivity of molecular hybridization (in corso di stampa).