

USO DEL WESTERN BLOT E DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI NELLA
CARATTERIZZAZIONE DEI CLOSTEROVIRUS ASSOCIATI
ALL'ACCARTOCCIAMENTO FOGLIARE DELLA VITE

D. BOSCIA

Dipartimento di Patologia Vegetale, Universita' degli
Studi e Centro di Studio del C.N.R. sui Virus e le Virosi
delle Colture Mediterranee, Bari.

J.S. HU e D. GONSALVES

Department of Plant Pathology, Cornell University, NYSAES,
Geneva, NY (USA).

RIASSUNTO

Anticorpi monoclonali ad un isolato (NY-1) di GLRaV tipo
III e un antisiero policlonale ad un isolato (CA-5) del
tipo II sono stati usati per caratterizzare i due tipi di
GLRaV. Un protocollo molto sensibile di Western blotting e'
stato usato per riconoscere le bande delle subunita'
proteiche virali e per evidenziare infezioni miste con l'uso
combinato dei due antisieri. Infezioni miste in vite sono
inoltre state evidenziate in microscopia elettronica usando
la tecnica della doppia marcatura con oro colloidale.
L'analisi elettroforetica delle bande piu' pesanti di dsRNA
ha mostrato simile peso molecolare in entrambi i tipi di
GLRaV.

SUMMARY

USE OF WESTERN BLOT AND MONOCLONAL ANTIBODIES TO
CHARACTERIZE GRAPEVINE LEAFROLL ASSOCIATED CLOSTEROVIRUSES

Monoclonal antibodies to an isolate (NY-1) of Grapevine
leafroll associated Closterovirus (GLRaV) type III and a
polyclonal antiserum to an isolate (CA-5) of GLRaV type II
were used to characterize the two types of GLRaV. A
sensitive Western blotting assay was used to detect the coat
protein bands and to show mixed infections when both the
antisera were used together. Mixed infections in grapevine
were also detected by E.M. when the double gold labelling
technique was used. Analysis of dsRNA major bands of GLRaV
type II and III showed a similar molecular weight.

INTRODUZIONE

Ad un decennio di distanza dalla prima segnalazione di
closterovirus in viti affette da accartocciamento fogliare

(Namba et al., 1979), con l'eccezione di GVA, closterovirus "corto" (800 nm) trasmissibile meccanicamente, ben poco si conosce per i quattro diversi tipi di particelle "lunghe" (1.800-2.000 nm). La causa principale del lento sviluppo di questa ricerca risiede nella mancata individuazione di ospiti erbacei, nelle rese di purificazione da vite estramente ridotte, nella impurezza dei purificati e, talora, nella ridotta disponibilita' di tessuto purificabile; tuttavia l'elevata antigenicita' degli stessi ha ugualmente consentito la produzione di antisieri con cui sono state proposte delle distinzioni sierologiche (Rosciglione e Gugerli, 1986; Hu et al., 1990a), mentre l'adozione di un efficace protocollo per il preassorbimento della reazione al sano ne ha consentito l'applicazione in test diagnostici tipo ELISA. Per il resto, le conoscenze sono limitate ad osservazioni al microscopio elettronico di estratti grezzi o di sezioni sottili di tessuti infetti. Il tradizionale uso dell'elettroforesi in gel di SDS poliacrilammide non consente l'individuazione delle bande proteiche virali che, per la bassa concentrazione dei preparati, non sono visualizzate con il blu di Coomassie, mentre l'uso del silver stain evidenzia un elevato numero di bande proteiche, in maggioranza contaminanti vegetali, dovute al ridotto grado di purezza dei preparati; in tali condizioni non e' possibile discriminare tra proteine di

origine virale e vegetale. In questo studio sono stati analizzati due isolati di GLRaV tipo II e III al fine di determinare e confrontare i pesi molecolari delle subunità proteiche e delle forme replicative dei rispettivi genomi. Sono state inoltre messe a punto delle tecniche di diagnosi di infezioni miste.

MATERIALI E METODI

Isolati. L'isolato NY-1 della varietà "Pinot noir" e' stato utilizzato come fonte di tipo III; per il tipo II e' stato invece utilizzato l'isolato CA-5 della varietà "Marsanne". Gli stessi isolati sono stati utilizzati come fonti di antigene per la produzione degli antisieri. Per il tipo II e' stato utilizzato un antisiero policlonale prodotto in coniglio seguendo le tecniche tradizionali (Boscia et al., 1989). Per il tipo III e' stato utilizzato un antisiero monoclonale secreto da una linea stabile di ibridomi ottenuta dalla fusione di cellule della milza di un topo BALB/c (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) immunizzato e di mielomi murini della linea SP2/O-AG14 (Hu et al., 1990b).

Western blot. Sono state usate preparazioni virali concentrate da 2 grammi (tipo III) o 20 grammi (tipo II) di tessuti di vite (piccioli o floema di talee legnose) tramite centrifugazioni differenziali. Elettroforesi in gel di poliacrilammide e colorazione con argento erano eseguiti

come precedentemente descritto (Hu et al., 1990a). Le proteine erano trasferite su membrana di Polyvinylidene Difluoride (IMMOBILON, Millipore) applicando 22V per 16 ore. L'incubazione con anticorpi era fatta usando una concentrazione di 3 ug/ml di immunoglobuline in PBS con 2% di latte magro liofilizzato. La reazione sierologica era visualizzata incubando la membrana in una sospensione di Proteina A coniugata con particelle d'oro (Bio Rad) e amplificata in una soluzione di acido citrico 0,2M, pH 3,7 con idrossiquinone 80 mM e lattato d'argento 5 mM (Hu et al., 1990b).

dsRNA. Estrazioni di RNA bicatenario sono state eseguite su campioni di 10 grammi di tessuto floematico applicando la procedura di estrazione e analisi descritta da Hu et al. (1990a)

Doppia marcatura con oro colloidale. Griglie (400 mesh) ricoperte con film di Formvar sono state incubate con preparazioni virali parzialmente purificate e quindi, in sequenza, con anticorpi monoclonali al tipo III, con IgG anti-topo coniugate con particelle d'oro del diametro di 10 nm, con policlonale al tipo II, con IgG anti-coniglio coniugate con particelle d'oro del diametro di 5 nm; infine, dopo lavaggio con acqua distillata, sono state colorate con acetato d'uranile all'1%.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Grazie alla specificita' degli antisieri prodotti e all'uso del Western blot e' stato possibile differenziare le bande proteiche virali dalle proteine della pianta ospite. In particolare, l'uso di anticorpi monoclonali al tipo III ha consentito il rilevamento della proteina virale in campioni concentrati da appena 2 grammi di tessuti vegetali. Dall'analisi dei risultati e' stata evidenziata una differenza nel peso molecolare delle proteine dei due isolati, il che ha reso possibile l'uso di questa tecnica nella diagnosi di infezioni miste (isolato C 222) incubando la membrana con una miscela dei due antisieri. Il peso della proteina e' stato calcolato in 37K dalton per il tipo II e 43K dalton per il tipo III, in entrambi i casi significativamente piu' pesante dei 25K dalton di altri closterovirus (Bar-Joseph et al., 1979).

L'uso della doppia marcatura con oro colloidale ha confermato la presenza di infezioni miste con la visualizzazione di particelle decorate rispettivamente con particelle d'oro di diverso diametro (5 nm per il tipo II e 10 nm per il tipo III).

Un altro progresso nella caratterizzazione e' stato ottenuto dall'analisi elettroforetica di RNA bicatenari estratti da viti infette; il peso molecolare delle forme replicative degli RNA genomici e' stato calcolato in circa 10 milioni di dalton in entrambi gli isolati di tipo II e III.

analizzati, tuttavia la consistente presenza di una serie di bande piu' leggere non e' di semplice interpretazione e necessita ulteriori approfondimenti.

In conclusione, notevoli progressi sono stati ottenuti nella caratterizzazione dei tipi II e III di GLRaV per i quali l'uso di anticorpi monoclonali e di un sensibile protocollo di western blot si sono rivelati determinanti.

BIBLIOGRAFIA

- BAR-JOSEPH M., GARNISAY S.M., GONSALVES D. (1979). The closteroviruses: a distinct group of elongated plant viruses. *Advances in Virus Research*. 25, 93-168.
- BOSCIA D., HU J.S., GONSALVES D. (1990). Characterization of grape leafroll associated closterovirus (GLRaV) serotype II and comparison with GLRaV serotype III (Abstr.) *Phytopathology* 79 (in press).
- HU J.S., BOSCIA D., GONSALVES D. (1990a). Use of monoclonal antibodies in the study of closteroviruses associated with grape leafroll disease. (Abstr.) *Phytopathology* 79, (in press).
- HU J.S., GONSALVES D., TELIZ D. (1990b). Characterization of closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease. *Journal of Phytopathology* (in press).
- NAMBA S., YAMASHITA S., DOI Y., YANO R. (1979). Grapevine leafroll virus, a possible member of closteroviruses. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 45, 497-502.
- ROSCIGLIONE B., GUGERLI P. (1986). Maladies de l'enroulement et du bois strie de la vigne: analyse microscopique et serologique. *Vitic. Arboric. Hortic.* 18(4), 207-211.