

DIAGNOSI DEI VIROIDI DEGLI AGRUMI APPARTENENTI AL GRUPPO III (CVd-III) MEDIANTE sPAGE E PCR

G. ALBANESE, R. LA ROSA, M. TESSITORI
Istituto di Patologia vegetale, Università degli Studi
Via Valdisavoia, 5 - 95123 Catania

Riassunto

Tra i diversi viroidi naturalmente presenti negli agrumi, quelli del gruppo III (CVd-III) sono difficilmente identificabili mediante il saggio su cedro Etrog Arizona 861-S1. Nella presente nota sono stati valutati metodi alternativi al saggio biologico per la diagnosi di CVd-III in campioni prelevati dal campo. Sono state messe a confronto la sensibilità di sPAGE e PCR e due tecniche di estrazione degli acidi nucleici necessari per i saggi. L'applicazione dei suddetti metodi di diagnosi e l'analisi di ibridazione molecolare con sonde di CEVd ed HSVd hanno consentito una caratterizzazione specifica di un CVd-III.

Parole chiave: agrumi, viroidi, diagnosi, sPAGE, PCR.

Summary

DIAGNOSIS OF CITRUS VIROIDS BELONGING TO GROUP III (CVd-III) BY sPAGE AND PCR

Among different viroids naturally present in citrus, those of group III (CVd-III) are difficult to detected by the assay on Arizona 861-S1 Etrog citron. In the present paper alternative methods to biological assay for the diagnosis of CVd-III in samples from the field were evaluated. Sensitivity of sPAGE and PCR and two procedures to extract nucleic acids necessary for the assays were compared. Results of two diagnostic methods, together with molecular hybridization analysis performed by using CEVd and HSVd probes, allowed a specific characterization of a CVd-III.

Key words: citrus, viroids, diagnosis, sPAGE, PCR.

Introduzione

In base alle più recenti acquisizioni, i viroidi naturalmente presenti nelle principali specie e cultivar commerciali di agrumi (CVd, Citrus Viroids) sono più di 12 (Duran-Vila *et al.*, 1988; La Rosa *et al.*, 1988; Gillings *et al.*, 1991). Essi sono stati riuniti in gruppi diversi che concorrono alla costituzione di un unico catalogo, proposto da

Semancik e Duran-Vila (1991). Alcuni di questi viroidi, come quelli dell'exocortice (CEVd) e della cachessia (CCaVd o CVd-IIb), sono considerati agenti di malattia in quanto è ben conosciuto il ruolo patogenetico da essi svolto su alcune specie di agrumi. Altri tre (CVd-Ia, CVd-IIa, CVd-IIIb) sono stati associati ad alterazioni osservate su arancio trifogliato [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] sperimentalmente inoculato (Roistacher *et al.*, 1993), altri ancora sono allo studio per comprendere se e quale effetto essi inducano.

I viroidi del gruppo III si distinguono da quelli degli altri gruppi per la gamma di piante ospiti ristretta al genere *Citrus*, per la mancanza di correlazioni con le malattie note degli agrumi e per la capacità di determinare in alcune specie o combinazioni d'innesto una significativa riduzione di sviluppo senza deprimere tuttavia i caratteri quali-quantitativi della produzione (Gillings *et al.*, 1991; Hadas *et al.*, 1991). La loro diagnosi tramite il saggio biologico sull'indicatrice cedro Etrog Arizona 861-S1 risulta attendibile solo se questo si effettua in condizioni di allevamento perfettamente controllate. Per incrementare la sensibilità della diagnosi, Duran-Vila *et al.* (1993) hanno applicato la tecnica dell'elettroforesi (sPAGE) ad estratti di acidi nucleici ottenuti da cedro Etrog inoculato da almeno sei mesi con la pianta da saggiare.

Nella presente nota si riportano i risultati di prove effettuate per mettere a punto un metodo di diagnosi che consenta di individuare nelle nostre condizioni ambientali i viroidi del gruppo III degli agrumi direttamente dal campo evitando la loro amplificazione "in vivo" sulle piante indicatrici. Ciò non solo al fine di saggiare rapidamente un elevato numero di piante, ma anche per disporre di un sistema di monitoraggio da utilizzare di routine nel caso in cui questi viroidi vengano inoculati intenzionalmente in piante di agrumi per la realizzazione di impianti ad alta densità (Polizzi *et al.*, 1992; Catara *et al.*, 1993).

Materiali e metodi

Materiale vegetale. Due piante di clementine (*C. clementina* Hort. ex Tan) cv comune di cui una innestata su alemow (*C. macrophylla* Wester) infetta da CVd-III (CMC) ed una su arancio amaro (*C. aurantium* L.) con infezioni miste di CEVd, CVd-II e CVd-III (ARA) sono state utilizzate come donatrici per inoculare 24 piante di arancio dolce [*C. sinensis* (L.) Osb.] cv Moro e di clementine SRA-63 innestate su portinnesti citrange (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) Troyer, arancio trifogliato o arancio amaro. Dodici piante non inoculate, delle stesse combinazioni d'innesto costituivano i controlli sani.

Germogli di almeno due mesi di età sono stati raccolti dalle piante in campo in diversi periodi dell'anno (autunno, inverno, primavera ed estate) e da ogni campione sono stati prelevati 0,2 - 0,5 o 10 g di corteccia.

Estrazione degli acidi nucleici. La purificazione degli acidi nucleici totali dai tessuti vegetali è stata effettuata seguendo due diverse procedure. I campioni di 0,2 - 0,5 g sono stati pestati dentro un tubo da 1,5 ml con pestello e trattati con SDS ed acetato di potassio seguendo il protocollo descritto da Gamsey *et al.* (1994); l'estrazione degli acidi nucleici dai campioni di 10 g è stata ottenuta polverizzando la corteccia in mortaio con pestello in presenza di azoto liquido, deproteinizzando con fenolo ed eluendo gli acidi nucleici su polvere di cellulosa CF-11 come suggerito da Flores e Llacer (1988). Gli acidi nucleici totali ottenuti con le due metodiche descritte sono stati disciolti rispettivamente in 20-50 o 100 µl di acqua distillata sterile.

Analisi elettroforetica su gel di poliacrilammide (sPAGE). Aliquote di 20 µl delle soluzioni contenenti gli acidi nucleici estratti sono state analizzate mediante il sistema di elettroforesi su gel di poliacrilammide a pH discontinuo (sPAGE) (Rivera - Bustamante *et al.*, 1986) seguito da colorazione del gel con nitrato d'argento. In ogni corsa elettroforetica insieme ai campioni in saggio sono stati utilizzati, come marcatori a peso molecolare noto, un estratto del viroide del colpo di sole dell'avocado (ASBVd) (gentilmente fornito da R. Flores, IATA, Valencia, Spagna) o del viroide del cadang-cadang della noce da cocco (CCCVd-RNA 1) ed un estratto di CEVd. La dimensione dei viroidi individuati è stata calcolata in base alla velocità di migrazione in elettroforesi confrontando la distanza relativa di questi dal CEVd e dall'ASBVd o dal CCCVd. Il valore finale del numero di nucleotidi di ogni viroide è stato ottenuto dalla media dei calcoli effettuati su almeno cinque gel differenti.

Ibridazione molecolare. Gli RNA dei viroidi separati in sPAGE e contenuti in gel non colorati sono stati trasferiti elettricamente su membrane di nylon mediante la tecnica del transblot (Bio-Rad). Le membrane sono state quindi sottoposte ad ibridazione molecolare con sonde specifiche di CEVd e del viroide del nanismo del luppolo (HSVd), quest'ultimo omologo al gruppo CVd-II dei viroidi degli agrumi. La preparazione delle sonde e le condizioni di ibridazione adottate sono descritte da Albanese *et al.* (1991).

Trascrizione inversa (RT) ed amplificazione enzimatica (PCR). Oligonucleotidi denominati C-2 e H-2, progettati da Rakowski *et al.* (1994) rispettivamente come complementare e omologo della sequenza di un isolato californiano di CVd-IIIb, sono stati utilizzati per ottenere il DNA copia (cDNA) del viroide tramite la reazione di trascrizione inversa (RT) e la successiva amplificazione enzimatica (PCR). La sintesi del cDNA è stata realizzata a 42°C per 1 ora con l'oligo C-2 e l'enzima trascrittasi inversa (MMLV reverse transcriptase, Promega) utilizzando 0,02 - 0,2 µg degli acidi nucleici totali estratti da ogni campione. La reazione di PCR si è effettuata con gli oligo C-2 ed H-2 e 30 cicli di amplificazione seguendo, per ogni ciclo, i parametri descritti da Tessitori *et al.* (1995): 94°C per 1', 57°C per 2', 72 °C per 1' (con un protrarsi per 7' di tale fase durante l'ultimo ciclo). I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% o di poliacrilammide al 6% ed osservati su transilluminatore UV dopo colorazione con bromuro di etidio.

Risultati

Come si osserva nella tabella 1, l'analisi sPAGE ha consentito l'individuazione di CVd-III nelle piante saggiate solo nel periodo estivo-autunnale, allorchè la concentrazione di questi viroidi è maggiore. L'analisi ha permesso inoltre di accertare contemporaneamente la presenza di altri viroidi (Fig. 1a). Dal confronto della migrazione elettroforetica con viroidi a peso molecolare noto è stato possibile stimare il numero di nucleotidi di ogni RNA. I risultati riassunti in tabella 2 mostrano che tutte le piante (n. 12) inoculate con ARA contenevano CEVd (~371 nucleotidi), un viroide del gruppo II di ~305 nucleotidi ed un CVd-III di ~293; le diverse combinazioni d'innesto inoculate con CMC presentavano un CVd-III di ~293 nucleotidi da solo, ad eccezione di una pianta in cui è stato riscontrato anche il CEVd. Tra le 12 piante non inoculate, solo una ha mostrato una contaminazione con l'isolato ARA, tutte le altre sono risultate esenti da viroidi.

La quantità di acidi nucleici ottenuta con SDS ed acetato di potassio non è stata

sufficiente per evidenziare gli RNA dei viroidi in sPAGE, mentre risultati migliori sono stati ottenuti con l'altra estrazione anche se, come detto, limitatamente alla stagione estiva-autunnale.

Nelle prove di ibridazione molecolare CEVd ed il viroide del gruppo II hanno reagito rispettivamente con le sonde specifiche di CEVd e di HSVd, mentre il viroide di ~293 nucleotidi non ha ibridato con le due sonde, dimostrando di appartenere ad un gruppo genetico differente.

L'analisi PCR ha permesso la diagnosi del viroide del gruppo III in tutte le stagioni tranne nel periodo invernale (Tab. 1). Inoltre, dal momento che nelle reazioni di amplificazione è stata utilizzata una coppia di primer specifica per il gruppo III, è stato possibile accertare che il viroide di ~293 basi appartiene a tale gruppo (Fig. 1b).

I due metodi di estrazione degli acidi nucleici sono risultati entrambi idonei se abbinati all' analisi PCR.

Tab. 1 - Confronto della sensibilità delle analisi sPAGE e PCR per la diagnosi dei viroidi del gruppo III degli agrumi (CVd-III) in diversi periodi dell'anno.

Epoca del prelievo	Metodo di diagnosi	
	sPAGE	PCR
Inverno	-	-
Primavera	-	++
Estate	++	++
Autunno	+	++

Tab. 2 - Viroidi individuati mediante sPAGE nel periodo estivo-autunnale in piante di agrumi sperimentalmente inoculate.

Piante donatrici	N. piante saggiate	N. piante contenenti viroidi		
		CEVd	CVd-II	CVd-III
Inoculate con ARA	12	12	12	12
Inoculate con CMC	12	1	0	12
Non inoculate	12	1	1	1

Conclusioni

I viroidi degli agrumi appartenenti al gruppo III inducono sull'indicatrice cedro Etrog Arizona 861-S1 una risposta sintomatica lieve, consistente in un leggero nanismo ed una blanda epinastia generalizzata o distribuita irregolarmente in alcune foglie dovuta alla necrosi del peduncolo e della nervatura principale (Duran-Vila *et al.*, 1993).

Il saggio biologico per i viroidi del gruppo III non sempre consente una facile interpretazione in quanto la manifestazione dei sintomi è legata a condizioni di serra perfettamente controllate. Per queste caratteristiche la presenza dei CVd-III nei paesi agrumicoli risulta ancora non sufficientemente documentata. Tali presupposti hanno stimo-

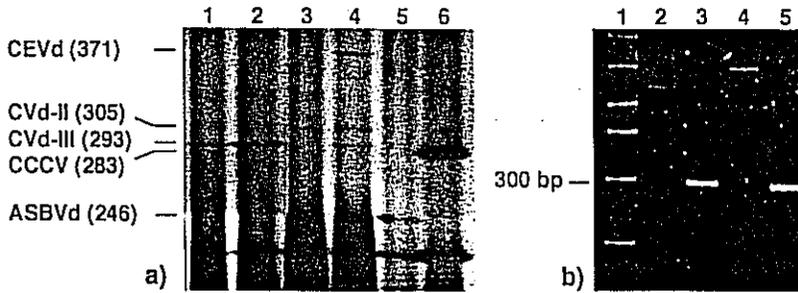


Fig. 1. a) Elettroforesi su gel di poliacrilammide a pH discontinuo (sPAGE) di acidi nucleici estratti da corteccia di agrumi prelevata da campo. I campioni sono: 1), 2) piante inoculate con l'isolato CMC; 3) pianta non inocolata; 4) pianta inocolata con l'isolato ARA; 5) marker di ASBVd; 6) marker di CCCVd - RNA I.
b) Gel di poliacrilammide al 6% contenente i prodotti di PCR ottenuti da campioni di agrumi prelevati da campo. I "primers" specifici per i CVd-III sono stati C-2 / H-2 e le bande di DNA ottenute sono di ~ 293 nucleotidi. 1) marker di DNA (Biomarker low, Bioventures); 2), 4) piante sane; 3) pianta inocolata con ARA; 5) pianta inocolata con CMC.

lato la presente ricerca che ha consentito di mettere a punto metodi alternativi di diagnosi sensibili e riproducibili.

La possibilità di individuare mediante PAGE un viroide degli agrumi (CEVd) in condizioni naturali di allevamento, senza il passaggio su piante indicatrici ed il mantenimento di queste in serra calda (28-32°C), è stata segnalata per la prima volta da Boccardo *et al.* (1984). La Rosa *et al.* (1988) avevano osservato, e solo recentemente altri autori (Duran-Vila *et al.*, 1995) hanno confermato che, per le piante in campo, utilizzando corteccia giovane in alternativa alle foglie sia CEVd che altri viroidi sono più facilmente evidenziabili in elettroforesi. Altre tecniche di caratterizzazione e diagnosi sono state messe a punto per i diversi viroidi degli agrumi (Albanese *et al.*, 1991; Davino *et al.*, 1991; Duran-Vila *et al.*, 1991, 1993; Flores, 1988; Gillings *et al.*, 1988; Levy *et al.*, 1992; Tessitori *et al.*, 1995).

L'obiettivo del lavoro qui esposto era valutare la possibilità di applicare alcune metodologie alla diagnosi dei viroidi del gruppo III in piante tenute in condizioni di campo. I risultati ottenuti mostrano che la loro individuazione diretta dal campo è possibile seppure con le limitazioni legate alle temperature da cui dipende la concentrazione.

L'analisi sPAGE, pur risultando valida soltanto nel periodo estivo-autunnale, consente l'individuazione contemporanea di tutti i viroidi eventualmente presenti e la determinazione del loro peso molecolare. L'ibridazione molecolare ha fornito ulteriori informazioni specifiche sull'identità del CVd-III analizzato. La tecnica tuttavia rimane di difficile applicazione in quanto richiede laboratori attrezzati e personale autorizzato per l'impiego di radioattivo. I risultati ottenuti con la PCR non solo mostrano l'elevata sensibilità del metodo e quindi la sua validità in diverse stagioni dell'anno, ma inoltre evidenziano la possibilità di definire nella stessa analisi il gruppo genetico di appartenenza.

Riguardo i due metodi di estrazione degli acidi nucleici è importante rilevare che gli estratti ottenuti con SDS ed acetato di potassio ed analizzati in sPAGE non consentono

la diagnosi dei viroidi, mentre utilizzati in PCR forniscono risultati analoghi agli estratti ottenuti con CF-11. Tuttavia il metodo di estrazione proposto da Garnsey *et al.* (1994) risulta più vantaggioso per la celerità di esecuzione in quanto richiede soltanto 3 ore rispetto ai 3 giorni necessari per l'estrazione con polvere di cellulosa.

I dati riportati in questa nota dimostrano quindi che la diagnosi dal campo dei viroidi degli agrumi del gruppo III può essere realizzata sia con sPAGE sia con PCR. La scelta del metodo dipende dall'epoca di prelievo, dal numero di campioni da analizzare e dalle attrezzature di laboratorio disponibili.

L'associazione di CVd-III alla ridotta dimensione delle piante di agrumi innestate su citrange Troyer e su arancio trifogliato è stata ipotizzata e successivamente dimostrata da diversi autori (Albanese *et al.*, 1990, 1995; Gillings *et al.*, 1991; Nauer *et al.*, 1991; Polizzi *et al.*, 1991; Roistacher *et al.*, 1993). L'impiego di questi viroidi come fattori nanizzanti per l'allestimento di impianti ad alta densità su larga scala sembra quindi una possibilità molto vicina. In tale evenienza i metodi di estrazione e di diagnosi sopra esposti si dimostrano utili per il monitoraggio dei viroidi intenzionalmente inoculati e per la verifica di accidentali contaminazioni con altri viroidi.

Lavori citati

- ALBANESE G., RENIS M., GRIMALDI V., LA ROSA R., POLIZZI G., DIENER T.O. (1991). Hybridization analysis of citrus exocortis viroid- and hop stunt viroid-specific probes. In: *Proc. 11th Conf. IOCV*, IOCV, Riverside, 202-205.
- BOCCARDO G., LA ROSA R., CATARA A. (1984). Detection of citrus exocortis viroid by polyacrylamide gel electrophoresis of nucleic acid extracts from glasshouse citrus. In *Proc 9th Conf. IOCV*, IOCV, Riverside, 357-361.
- CATARA A., POLIZZI G., AZZARO A. (1993). Il contenimento dello sviluppo di piante di agrumi con particolare riferimento all'uso di RNA nanizzanti. *Tecn. Agric.*, 4, 221-223.
- DAVINO M., PELICANI L., RENIS M., ALBANESE G. (1991). Homology of hop stunt viroid with citrus cachexia viroid. In: *Proc. 11th Conf. IOCV*, IOCV, Riverside, 196-201.
- DURAN-VILA N., ANA P., PINA J.A., NAVARRO L. (1995). Indexing of citrus viroids. In: *Symposium Mediterranean sur Mandarines*, 5-11 Marzo 1995, San Giuliano, Corsica, Francia (Riassunto).
- DURAN VILA N., PINA J.A., BALLESTER J.F., JUAREZ J., ROISTACHER C.N., RIVERA-BUSTAMANTE R., SEMANCIK J.S. (1988). The citrus exocortis disease: a complex of viroid RNAs. In: *Proc. 10th Conf. IOCV*, IOCV, Riverside, 152-164.
- DURAN-VILA N., PINA J.A., MOLINS M.I., NAVARRO L. (1991). A new indexing method for cachexia. In: *Proc. 11th Conf. IOCV*, IOCV, Riverside, 224-229.
- DURAN-VILA N., PINA J.A., NAVARRO L. (1993). Improved indexing of citrus viroids. In *Proc. 12th Conf. IOCV*, IOCV, Riverside, 202-211.
- FLORES R. (1988). Detection of citrus exocortis viroid in natural and experimental citrus hosts by biochemical methods. In: *Proc 10th Conf. IOCV*, IOCV, Riverside, 192-196.
- FLORES R., LLACER G. (1988). Isolation of a viroid-like RNA associated with peach latent mosaic disease. *Acta Hort.*, 235, 325-332.
- GARNSEY S.M., ZIES D.L., IREY M., LEVY L., HILF M.E. (1994). PCR-based detection of citrus exocortis and group II citrus viroids directly from field-grown sweet orange trees.

Phytopathology, 84(10), (Riassunto).

GILLINGS M.R., BROADBENT P., GOLLNOW B.I. (1988). Biochemical indexing for citrus exocortis viroid. In: *Proc. 10th Conf. IOCV*, IOCV, Riverside, 178-187.

GILLINGS M.R., BROADBENT P., GOLLNOW B.I. (1991). Viroid in Australian citrus: relationship to exocortis, cachexia and citrus dwarfing. *Austr. J. Plant Physiol.* 18, 559-570.

HADAS R., BAR-JOSEPH M. (1991). Variation in tree size and rootstock scaling of grapefruit trees inoculated with a complex of citrus viroids. In: *Proc. 11th Conf. IOCV*, IOCV, Riverside, 240-243.

LA ROSA R., ALBANESE G., AZZARO A., SESTO F., DOMINA F. (1988). Suitability of nucleic acid analysis to diagnose viroid infection in citrus. In: *Proc. 10th Conf. IOCV*, IOCV, Riverside, 188-191.

LA ROSA R., ALBANESE G., RENIS M., CATARA A. (1988). Viroids and viroid-like RNAs in citrus plants. In *Proc. 6th Int. Soc. Citric.*, 903-907.

POLIZZI G., AZZARO A., CATARA A. (1992). Effects of citrus viroids on different rootstock. In *Proc. 7th Int. Soc. Citric.*, 797-799.

LEVY L., HADIDI A., GARNSEY S.M. (1992). Reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the rapid detection of citrus viroids using multiplex primer sets. In: *Proc. 7th Int. Soc. Citric.*, 2, 800-803

RAKOWSKI A.G., SZYCHOWSKI J.A., AVENA Z.S., SEMANCIK J.S. (1994). Nucleotide sequence and structural features of the group III citrus viroids. *J. Gen. Virol.* 75, 3581-3584.

RIVERA-BUSTAMANTE R., GIN R., SEMANCIK J.S. (1986). Enhanced resolution of circular and linear molecular forms of viroid- and viroid-like RNA by electrophoresis in a discontinuous - pH system. *Anal. Biochem.*, 156, 91-95.

ROISTACHER C.N., BASH J.A., SEMANCIK J.S. (1993). Distinct disease symptoms in *Poncirus trifoliata* induced by three citrus viroids from three specific group. In *Proc. 12th Conf. IOCV*, IOCV, Riverside, 173-179.

SEMANCIK J.S., DURAN-VILA N. (1991). The grouping of citrus viroids: additional physical and biological determinants and relationships with diseases of citrus. In *Proc. 11th Conf. IOCV*, IOCV, Riverside, 178-188.

TESSITORI M., LA ROSA R., ALBANESE G., CATARA A. (1995). PCR-diagnosis of citrus viroids in field samples. In: *Proc. 13th Conf. IOCV*, Riverside, (in stampa).