

# BIOTECNOLOGIE

Sono tecniche che manipolano il genoma dei viventi per ottenere dei metaboliti (qualcosa che serve all'uomo)

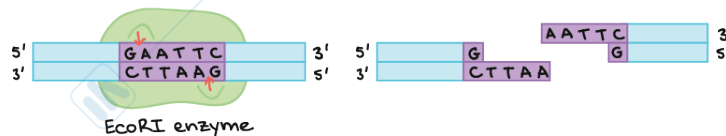
Strumenti utilizzati:

1. **Enzimi di restrizione:** tagliano il DNA
2. **Ligasi:** riformano i legami fosfodiesterici
3. **Vettori plasmidici:** trasportano pezzi di DNA da una cellula ad un'altra

## ENZIMI DI RESTRIZIONE

- Difese biologiche naturali che hanno i batteri per difendersi dall'attacco dei fagi o di virus
- Tagliano lungo sequenze prestabilite (sequenze bersaglio) il DNA dell'invasore, disattivandoli
- I batteri hanno il DNA circolare, unico filamento
- Fanno parte della classe delle idrolasi, aggiungendo  $H_2O$  al legame fosfo-diesterico, rompono il legame, tagliando in due il filamento di DNA

- Esempio di un nome di un enzima di restrizione: **EcoRI**  
(**E**= genere batterico escherichia; **co**= specie coli; **R**= ceppo RY13; **1**=indica quale numero progressivo enzima è estratto dal batterio)



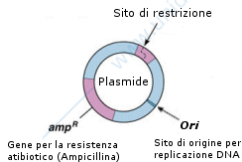
- Il taglio della doppia elica produce due frammenti di DNA con basi azotate complementari, quindi → frammenti appiccicosi
- Alcuni enzimi di restrizione tagliano in verticale il DNA dando origine ad estremità piatte, più difficili da saldare

## DNA LIGASI

- Enzima presente nelle cellule che ha la funzione di riassemblare il DNA quando viene corretto dopo la duplicazione
- Ha due funzioni:
  - ✓ Forma legami fosfodiesterici tra i nucleotidi utilizzando come cofattore l'ATP (lega le basi azotate dove c'è stato un errore di duplicazione)
  - ✓ Ricuce i frammenti di Okazaki
- Idrolizza legami a idrogeno, rinforzando il legame fosfodiesterico

## DNA RICOMBINANTE

- DNA in cui sono presenti geni provenienti da 2 o più organismi differenti
- Il DNA va trasferito, quindi servono molecole che siano in grado di trasferirlo
- I plasmidi, molecole circolari di DNA a doppia elica separate dal cromosoma principale veicolano informazioni da un ceppo ad un altro
- I vettori plasmidici veicolano il DNA ricombinato all'interno di un batterio → modificano il genoma batterico grazie all'inserimento di geni umani



**Plasmide:** molecola di DNA circolare a doppia elica contenente sito di restrizione, sito ori, amp<sup>R</sup> → circa ogni 12 geni circa, controlla la capacità di utilizzare certi substrati → sito per replicazione del DNA.

Il plasmide serve per trasferire porzioni (geni) batteriche da un organismo all'altro.

- Ogni plasmide ha una zona ori detta "Origine Di Replicazione", è una sequenza di basi riconosciute da alcuni enzimi (DNA polimerasi) e dà inizio alla duplicazione.
- Ogni plasmide ha una zona F dove è contenuta l'informazione per la sintesi del pilo sessuale, protuberanza per trasferire il genoma a un altro batterio → comunicazione
- Il DNA plasmidiale si trova al di fuori del batterio: è extracromosomiale.
- Tutti i plasmidi hanno un paio di geni per la resistenza antibiotica (amp<sup>R</sup>) al fine di selezionare le cellule contenenti il vettore (*gene reporter*).
- Possiedono anche un sito multiplo di clonaggio → sequenze uniche di riconoscimento per diversi enzimi di restrizione poste una vicino all'altra in una regione chiamata sito multiplo di clonaggio, dove verrà inserito il frammento di DNA esogeno. Estremità complementari al DNA cromosomiale.
- Un vettore plasmidico è un plasmide batterico naturale modificato in laboratorio

**Trasformazione batterica:** processo in cui quando un batterio muore, il DNA (sia cromosomiale che plasmidico) può essere accettato all'interno (inglobato) di altre cellule batteriche sane vicino alla cellula lisata → si creano nuove specie batteriche

**Tecnica del DNA ricombinante** → è il primo processo biotecnologico applicato ad un ceppo batterico modificandone il DNA per ottenere qualcosa di utile all'uomo

- Enzimi di restrizione tagliano il DNA da inserire con lo stesso enzima: tagliano il vettore plasmidiale.
- DNA ligasi li unisce per formare DNA ricombinato
- Le estremità appiccicose ce le hanno anche i filamenti separati di DNA tra di loro
- Tutti i batteri che hanno il plasmide modificato vivranno, gli altri saranno uccisi dall'antibiotico

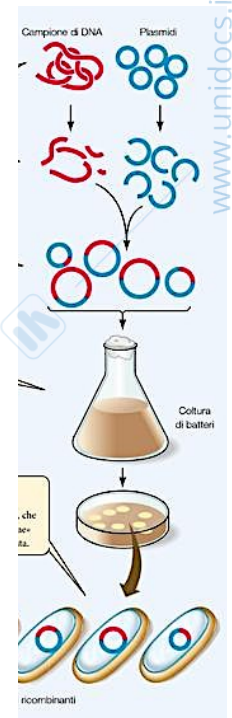


**Clonaggio genico** (≠ clonazione)

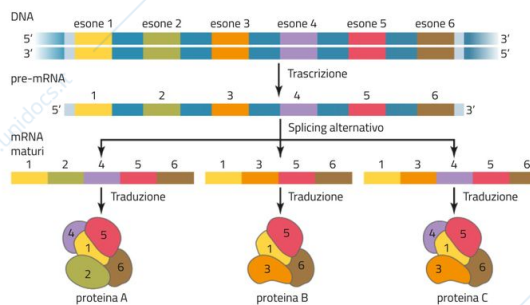
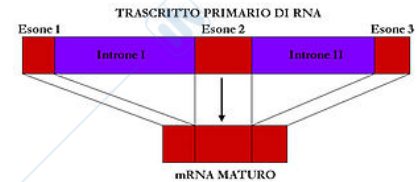
- Prima biotecnologia applicata, è un sistema utilizzato per ottenere molte copie di un tratto di DNA inserendolo in una cellula ospite mediante l'uso di vettori molecolari
- Riproduzione agamica (senza l'intervento dei sessi)

Tappe:

1. **Isolamento** della particolare sequenza di DNA utilizzando enzimi di restrizione. Il campione di DNA e i plasmidi vengono tagliati con lo stesso enzima di restrizione. I frammenti di DNA e i plasmidi aperti così ottenuti vengono mescolati e uniti fra loro con la DNA ligasi. Si ottiene così una miscela di plasmidi differenti coltivati dal medesimo vettore ma da inserti diversi
2. **Inserimento** della sequenza di DNA all'interno della cellula ospite. I batteri assumono i plasmidi.
3. **Moltiplicazione** delle cellule riceventi. I batteri vengono coltivati in un terreno che consente la selezione dei cloni ricombinanti.
4. La **selezione** delle cellule effettivamente modificate rispetto a quelle che non hanno assunto il nuovo DNA.



- È più utile utilizzare mRNA piuttosto che il DNA, poiché quest'ultimo è formato dal 95% da **introni** (sequenze non codificanti) e dal 5% da **esoni** (sequenze codificanti) → importanti perché regolano l'espressione genica, cioè quello che si manifesta del nostro genoma
- Il trascritto primario (pre mRNA) è identico al DNA di partenza
- Tramite lo splicing, si ha la maturazione del trascritto primario, vengono eliminati gli introni, e ricuciti tra loro gli esoni
- **Maturazione completa:** aggiunta all'estremità 3', 200 adenine dette *poli-A*, che dà inizio alla sintesi proteica  
Aggiunta all'estremità 5' una guanina trifosfato, cappuccio, determina la fine della sintesi proteica

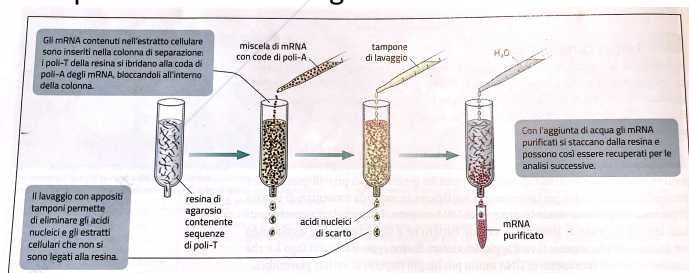


**Splicing alternativo:** permette di ottenere proteine diverse a partire dallo stesso pre-mRNA. RNA può codificare proteine diverse a seconda di come matura. È un meccanismo che permette di ottenere da uno stesso trascritto primario diversi mRNA con diverse combinazioni di esoni, amplificando le potenzialità del genoma.

Il DNA è costituito da esoni (codificanti) inframezzati da introni (non codificanti); nel mRNA invece sono presenti solo gli esoni correttamente montati grazie al meccanismo di splicing. Il DNA genomico non è quindi il materiale ideale da cui partire per isolare un gene, mentre gli mRNA risultano molto più pratici

### 1) Isolamento di mRNA delle cellule eucariotiche

- Cellule vengono lisate con enzimi che digeriscono le membrane cellulari, anche quelle interne per ottenere una miscela di acidi nucleici → le cellule vengono frammentate in modo da liberare tutti gli acidi nucleici.
- L'estratto cellulare viene poi applicato a una resina costituita da un polimero di *agarosio* (gel coloso) a cui vengono attaccati dei frammenti di DNA sintetico a singola elica (*oligonucleotide*), ottenuto in laboratorio contenente solo timine (*poli T* → polimorfismi, varianti alleliche)
- Dato che due DNA a singola elica con sequenza complementare tendono spontaneamente ad appaiarsi, questi oligonucleotidi poli-T si appaiano alla coda poli-A degli mRNA, trattenendoli sul gel (legami a idrogeno)
- Con un lavaggio di NaCl si allontanano tutti gli acidi nucleici non legati ai *poli T*, ottenendo solo RNA legato ai *poli T*.
- Con una soluzione tampone, lavo il gel estraendo solo mRNA  
In questo modo ottengo tutti gli mRNA cellulari, tra i quali è presente quello corrispondente al nostro gene di interesse



## 2) Trasformazione degli mRNA purificati in cDNA

- Si utilizza l'enzima *trascrittasi inversa*, tipico dei retrovirus (come Hiv), che inietta nella cellula ospite RNA
- Si tratta di una DNA polimerasi particolare, in grado di usare un filamento di RNA come stampo per generare una copia a DNA.
- È in grado di lisare l'involucro esterno dell'ospite in modo che il proprio capsid si fonda con la membrana plasmatica dove rilascia RNA che grazie all'enzima trascrittasi inversa produce un filamento di **cDNA**, ovvero complementare al DNA (è il suo stampo)
- Il virus utilizza le strutture della cellula ospite per trascrivere il cDNA
- Una volta sintetizzato il cDNA, l'RNA degenera
- Inoltre la trascrittasi inversa codifica per la sintesi del secondo filamento di DNA complementare al cDNA
- Il cDNA è quindi integrato nel genoma cellulare, quando il virus si attiva la cellula inizia a produrre le proteine virali che serviranno per produrre nuove molecole virali

## 3) Creazione di una libreria di cDNA

- Clonare i cDNA in modo da averne un gran numero di copie mediante la trasformazione batterica
- Si usa una miscela di vettori, ciascuno contenente un diverso cDNA, e si selezionano le cellule trasformate.
- Si ottiene così una **libreria di cellule contenenti ciascuna un diverso cDNA**: collezione di cloni corrispondenti ai geni espressi nel genoma di un organismo
- cDNA va inserito in un vettore plasmidico, il problema è che un DNA formato da solo esoni, quindi si utilizza DNA ligasi per saldare le sequenze palindromiche ad cDNA (sequenze palindromiche: regione del DNA costituita da successive basi ripetute e incrociate)
- Quindi il plasmide va a inserire il ceppo batterico che voglio clonare
- Trasformazione: inserisco il plasmide in una cellula procariote
- **Trasfezione**: inserisco il plasmide in una cellula eucariote

Varie tecniche per ottenere la transfezione:

- ✓ **SHOCK TERMICO** → prima posizione le cellule batteriche in soluzione con ioni  $\text{Ca}^{2+}$  che avendo carica + attraggono gli acidi nucleici con carica - e si legano anche alla parete batterica dove ci sono i liposaccaridi. Successivamente dopo 2/3 cicli termici dove alternano i  $3^\circ$  ai  $40^\circ$ , i pori della membrana batterica si aprono, facilitando l'entrata dei plasmidi.
- ✓ **SHOCK ELETTRICO** → dipende dalla capacità delle proteine di membrana di aprirsi a un determinato voltaggio
- ✓ **BOMBARDAMENTO BIOLISTICO** → si sparano nanoproiettili fatti da metalli (cariche +) con adesivato il plasmide, contro le cellule vegetali per introdurre il plasmide ricombinante.  
Solitamente si usano cellule vegetali perché sono più grandi
- ✓ **MICROINIEZIONE** → si fa a livello embrionale, con punture, per risolvere problemi genetici

## Clonaggio per la produzione di insulina (1978)

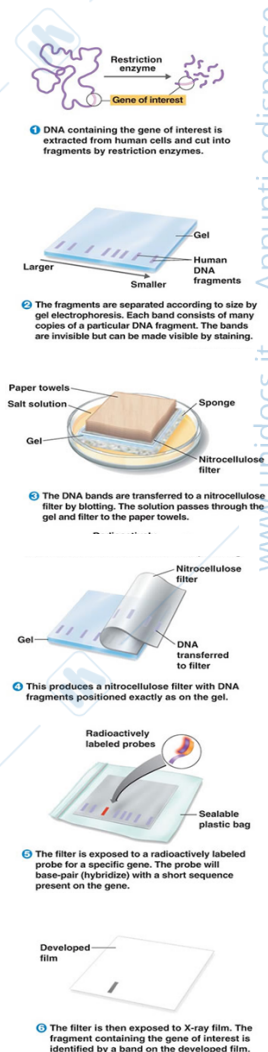
- Clonaggio per indurre in un ceppo batterico l'insulina
- L'insulina è rilasciata dal pancreas quando la glicemia è troppo alta
- La glicemia alta ingrossa i globuli rossi, rende il sangue più denso provocando un deterioramento dei vasi a causa dell'ingrandimento delle arterie, affaticamento cuore, problemi di deambulazione e vista, poiché il sangue fa fatica ad arrivare ai capillari più piccoli
- Regolazione di insulina grazie all'introduzione di un vettore genetico modificato  
Utilizzo l'antibiotico per selezionare le cellule effettivamente modificate.

## LIBRERIE GENOMICHE

- Servono per la conservazione del genoma in frammenti: con gli enzimi di restrizione si taglia tutto il genoma di un organismo, poi con vettori plasmidiali si trasferisce a un'altra cellula e si passa alla clonazione.
- Possono essere a DNA e a cDNA (che contiene solo esoni → più significativo)
- Per avere una libreria devo avere tante copie di frammenti di DNA, cioè tanti genomi di quella specie.
- Per ogni specie ci possono essere più librerie sia a seconda del momento in cui si preleva mRNA (splicing diverso) sia a seconda del tipo cellulare (diverso tessuto)
- Per identificare un gene d'interesse ci sono due tecniche:

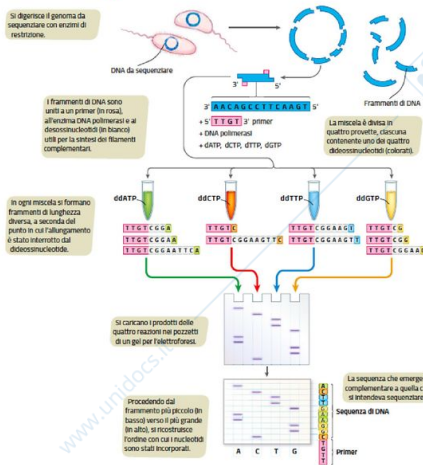
Southern blotting e sequenziamento

- **SOUTHERN BLOTTING** → Scoperta da Edwin Southern nel 1975
- Si utilizza per sapere se un gene che già conosco è presente in un certo genoma. È una tecnica che consente di separare molecole cariche grazie all'applicazione di un campo elettrico.
- Prendo il DNA del genoma che voglio indagare (gene d'interesse) e lo taglio con enzimi di restrizione
- Ottengo tanti frammenti di DNA di varia lunghezza che separo che elettroforesi su gel
- Vaschetta con gel di agarosio (spesso 1 cm), ai due estremi c'è un polo + e uno -  
Al polo negativo ci sono dei pozzetti in cui viene messo il campione-
- Viene applicata una differenza di potenziale ai poli → i frammenti di DNA dato che hanno carica negativa, vengono attratti dal polo positivo con velocità inversamente proporzionale alla loro lunghezza → in base alla debolezza della carica di posizioneranno in un determinato punto
- Riesco quindi a separare i vari frammenti → ora i frammenti devono essere fissati
- Fase blotting → migrazione macchie elettroforetiche su un filtro di nylon o nitrocellulosa, il gel non è stabile.
- Si utilizza una soluzione tampone che per capillarità fa migrare il DNA attraverso il gel, sopra si mette un filtro di nitrocellulosa (carica + che trattiene i frammenti di DNA). Infine si posiziona la carta assorbente che per capillarità richiama i frammenti di DNA. Viene poi prelevato il filtro di nitrocellulosa con il DNA.
- Si aggiunge al filtro di nitrocellulosa una sonda (frammenti) a DNA con sequenza di basi azotate complementari a quelle del gene che sto cercando.
- È una sonda radioattiva perché contiene fosforo 32.
- Se la sonda trova basi azotate complementari, si appaia a quella linea elettroforetica. Sopra la sonda c'è una lastra fotografica → se vedo un trattino vuol dire che c'è il gene d'interesse.
- Tecnica applicabile anche per trasferire RNA → northern blotting



## SEQUENZIAMENTO

- Serve per capire quale è la sequenza delle basi azotate di un determinato gene
- Sequenziare un genoma → capire quali basi azotate formano il gene
- Il metodo Sanger per il sequenziamento è stato il primo, nel 1977



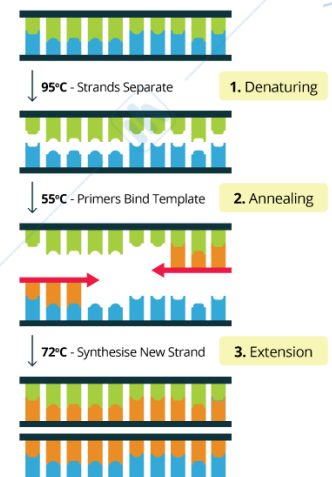
- Basato sull'utilizzo della **DNA POLIMERASI** (copia uno stampo di un filamento singolo aggiungendo basi azotate complementari partendo dal primer)
- Sanger parte da nucleotidi diossidati (ossidati 2 volte), cioè che non hanno O di OH né sul C<sub>2</sub> né sul C<sub>3</sub>.
- La mancanza di sul C<sub>3</sub> dell'OH impedisce la formazione del legame fosfodiesterico con il nucleotide accanto. La mancanza di un gruppo ossidrilico blocca la duplicazione.
- In questo modo la duplicazione di tanto in tanto si blocca, si formano così tanti frammenti.
- Con elettroforesi su gel, spalmo i frammenti capendo la sequenza di DNA.
- Oggi si usano marcatori colorati (uno per ogni base azotata).

**PCR (polymerase chain reaction)** → è un sistema automatizzato per l'amplificazione del DNA, che si estrae dal cappello un frammento di DNA e lo si riproduce in più copie

- Fine anni '70 e '80 (applicata nel 1985), scoperta da Mullis
- Utilizzo: moltiplicare milioni/miliardi di volte una piccola quantità di DNA in poco tempo. Per poter sequenziare il DNA, dato che i desossinucleotidi si attaccano a caso, dobbiamo avere molto materiale.
- Utilizzata anche per il profilo genetico di un individuo. (es: In criminologia c'è poco materiale, come un capello o una goccia di sangue → soluzione: pcr)
- Si avvale di una polimerasi (accoppia basi azotate complementari a un filamento stampo partendo da un primer)
- Si avvale di cicli termici (termociclatore: accelera la PCR, scaldando e raffreddando il DNA.) dove si raggiungono temperature elevate (95°), la normale polimerasi si denaturerebbe
- Viene quindi utilizzata **Taq polimerasi** (*Thermus aquaticus*) applicandolo al termociclatore. La taq è un procarote isolato in una sorgente termale naturale e vive ad alte temperature.
- Si parte da un doppio filamento di DNA.

FASI:

- 1 **DENATURAZIONE A 94°** → Sottompongo il DNA ad alte temperature e rompo i legami a idrogeno per ottenere 2 filamenti stampo; a queste temperature tutti gli altri enzimi si denaturano.
- 2 **ANNEALING A 50-60°** → si abbassa la temperatura e si aggiungono i primer che formano legami a idrogeno con il filamento di DNA. È una fase di appaiamento, in cui si aggiungono i primer (da noi costruiti seguendo quel filamento di DNA) per velocizzare 2 primer, uno per 3' 5', l'altro per il 5' 3'.
- 3 **ESTENSIONE A 70-72°** → temperatura ottimale di lavoro di copiatura della taq polimerasi che aggiunge nucleotidi complementari al filamento stampo e li aggancia al primer. Si producono così 2 molecole figlie.
- 4 **RIPETIZIONE DEL CICLO** → Quando il DNA polimerasi taq raggiunge il termine del filamento stampo si riparte con altri cicli termici. Ad ogni ciclo, la quantità di DNA raddoppia.



**TERMOCICLATORE** → macchina con sensori per la temperatura e resistenze. In circa 2-3 ore fa 30-40 cicli producendo  $2^{30}$ - $2^{40}$  filamenti.



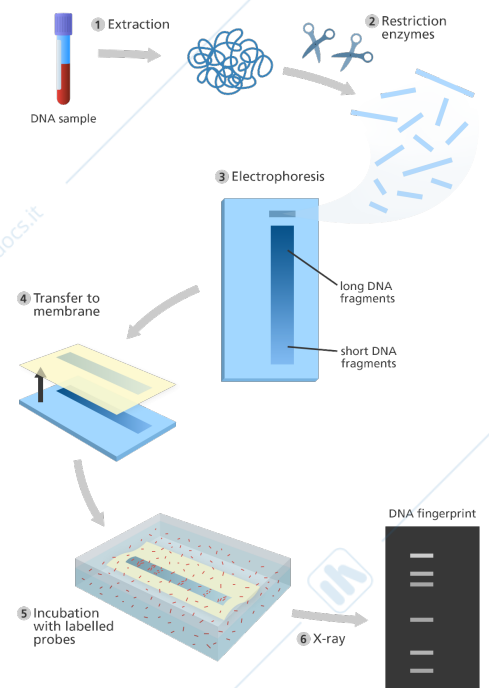
- Sono stati scoperti in alcuni loci genici tante sequenze di basi azotate non codificanti che variano da individuo a individuo. Sono le STR le più individuabili. Queste *short tandem repeats*, si trovano su 21 loci, 13 di questi cromosomi. La sequenza è uguale in tutti gli individui, ciò che varia è il numero di ripetizioni su ogni sequenza.

### DNA FINGERPRINTING O PROFILING DEL DNA

- Consente di confrontare due campioni di DNA per capire se provengono dallo stesso individuo
- Si basa su DNA mini-satellite (sequenza di basi azotate diversa da locus a locus che si ripetono in vitro variabile da individuo a individuo)
- Evita il confronto con l'intero genoma
- 1984 Jeffery ha messo a punto questa tecnica
- 1986 tecnica utilizzata come prova di colpevolezza in USA
- **STR (short tandem repeat)** si trovano in tutti gli individui negli stessi cromosomi e le sequenze sono le stesse, ciò che varia è il numero di ripetizioni
- Prova di colpevolezza: UK bisogna confrontarne 8, in USA 13

#### ANALISI STR

1. Si preleva un cromosoma su cui si estrapola un STR da un genoma (es.: indiziato)
  2. Si utilizza lo stesso cromosoma preso dal campione da analizzare (es.: goccia di sangue)
  3. Taglio entrambi i cromosomi con enzimi di restrizione.
  4. Ogni campione viene messo in una provetta con un primer (che duplica solo str), DNA polimerasi, basi azotate.
  5. Ho quindi due provette, metto il contenuto di entrambe in due distinti pozzetti vicino al polo positivo in una vasca dove si svolge elettroforesi su gel. Più volte è ripetuto e meno strada farà sul gel elettroforetico.
  6. Confronto quindi grazie all'elettroforesi STR, se le bande risultano alla stessa distanza allora STR del campione di sangue corrispondono al STR dell'indagato → colpevole
- Metodo utilizzato anche per il test di paternità
  - Ci sono kit contenenti primer per ognuno dei 13 loci delle str, che permettono di fare contemporaneamente l'analisi di tutti i 13 i loci.



# Applicazioni di tecniche su piante

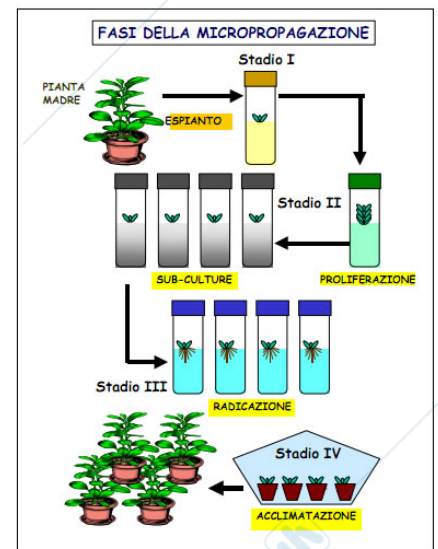
- L'uomo già dall'antichità seleziona i genomi migliori, ma tramite i genomi le leggi di Mendel: sono tecniche molto lente
- Le tecniche utilizzate dall'ingegneria genetica sono molto più veloci
- Si creano così gli OGM → organismi geneticamente modificati. Sono organismi in cui è stato inserito artificialmente almeno un gene
- Se quel gene è stato preso da una specie diversa si parla di **organismo trasgenico**.
- **Organismi knock-out** → organismi in cui il genoma è stato modificato silenziando un gene, cioè impedendogli di manifestarsi o asportarlo. È un meccanismo utilizzato per capire la funzione di quel dato gene silenziato o asportato.
- **Organismi knock-in** → organismi in cui vengono aggiunti geni per indurre una specie a fare qualcosa che prima non facevano. È la tecnica più utilizzata.

## CLONAZIONE NELLE PIANTE

- Molte piante possono riprodursi agamicamente. Si cerca di far differenziare le cellule non differenziate in radici tramite specifici ormoni (cloni pianta madre), come le cellule staminali embrionali
- Si utilizzano tecniche che rimandano alla clonazione

## MICROPROPAGAZIONE IN VITRO PER TALEA DELLA PIANTA

1. La pianta viene selezionata in piccole parti. Si prende una pianta da cui si prelevano alcuni tessuti detti **maristemi apicali**, che si trovano nelle gemme o apici vegetativi, sono composti da particolari tipi di cellule chiamate cellule meristematiche (staminali) che sono ancora indifferenziate e che si differenziano a seconda degli ormoni che le stimolano.
2. Queste cellule vengono messe in un mezzo di cultura a determinate temperature e a contatto con ormoni vegetali (famiglia delle auxine come l'acido indolacetico; citochinine) che promuovono il differenziamento.
3. Si forma un ammasso di cellule chiamato callo
4. Prendo varie cellule dal callo, le metto in vasetti e con l'aiuto di alcuni enzimi e della luce solare, si differenziano in piantine tutte uguali fra loro
5. Piantine allevate in vitro diventano adulte

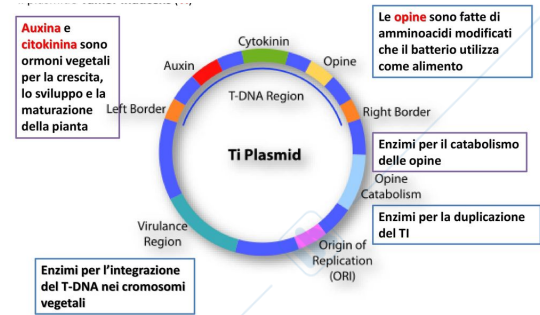


## PRODUZIONE DI PIANTE TRANGENICHE

- Utilizzo un vettore adatto che inserisce nelle piante il gene che mi interessa
- Se nella fase mitotica introduco un vettore trangenico, ottengo piante transgeniche
- Il vettore più utilizzato è il **plasmide Ti**.

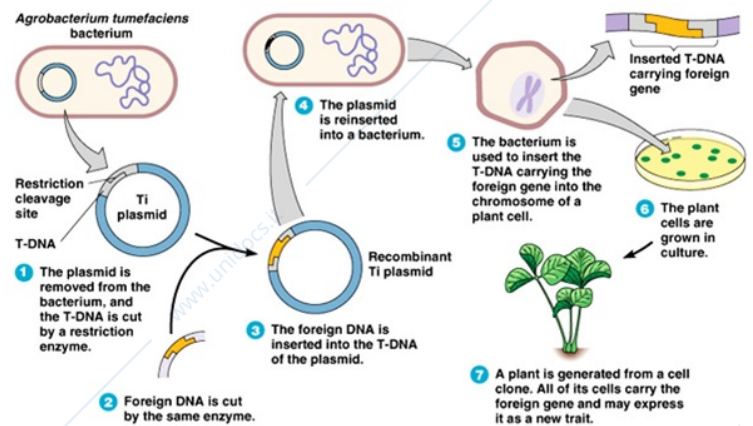
## PLASMIDE TI

- Estratto dall' *Agrobacterium tumefaciens*: è un batterio che attacca le radici delle piante provocando tumori → iperproliferazione dei tessuti infettati
- Una volta entrato nelle cellule vegetali, è in grado di inserire definitivamente il suo T-DNA nel genoma della pianta. Il T-DNA riesce a far partire la reazione
- È costituito da geni che codificano per alcuni ormoni che stimolano la cellula vegetale a duplicarsi e quindi a far duplicare anche il proprio DNA → cellule anomale
- Zona in cui si produce **auxina**
- **Regione vir** → codifica per la sintesi di proteine che aumentano la capacità di duplicazione (virulenza) del DNA del plasmide T
- **Regione sito ori** → origine di duplicazione, molto vicino alla regione vir
- Possiede geni che codificano per la sintesi di aminoacidi e proteine della famiglia delle **opine** che solo l'agrocterium è in grado di utilizzare
- In questo modo sia la sintesi che il catabolismo delle opine fanno sì che la cellula vegetale produca molecole che lei non è in grado di utilizzare → aumento virulenza.



I vettori basati sul plasmide ti, mancano di geni per la crescita tumorale, ma mantengono quelli della regione VIR

- 1) estrazione plasmide Ti
- 2) Plasmide Ti ricombinante → le cellule del callo si mettono in contatto con l'Agrocterium ricombinante → le cellule si infettano
- 3) Le cellule si dividono per mitosi. Il gene d'interesse viene integrato.
- 4) Coltivazione → coltura di cloni vegetali
- 5) Ottengo piante transgeniche (geneticamente modificate)



## ESEMPI DI COLTURE TRANSGENICHE

- **Riso golden** → prevenzione associata alla carenza della vitamina A, importante perché dà orine al retinolo → cecità. Il riso normale non contiene vitamina A. Introduzione nel riso di due geni: FIBROENE (proveniente dal narciso) e CITRONE DESATURASI BATTERICA (proveniente da un batterio; contiene  $\beta$ -carotene). Prezzo elevato → poco utilizzato Golden rice 2 → FIBRONE (del mais, non del narciso) → più  $\beta$ -carotene
- **Mais bt** → (*Bacillus thuringiensis*). Il mais richiede molti trattamenti anti-parassitari, perché è soggetta ad attacchi di larve che provocano lesioni alle piante: su queste ferite si attaccano funghi che producono tossine. Intervento delle biotecnologie → il BT codifica una sostanza tossica non per l'uomo ma per le larve: se la ingeriscono, cristallizza nello stomaco.
- **Papaya OGM delle Hawaii** → presenza di un virus che se colpiva la pianta, portava al disseccamento di essa, facendola morire. È stato codificato un gene che portava la resistenza della pianta dall'attacco di questo virus.