

I VIRUS

-Generalità-

I Virus sono delle **nucleoproteine** costituite quindi da:

-**Genoma virale**: RNA o DNA a singolo o doppio filamento. Circa l'80% dei virus vegetali sono a ssRNA.

-Il genoma virale racchiuso all'interno di una struttura proteina che prende il nome di **capside**

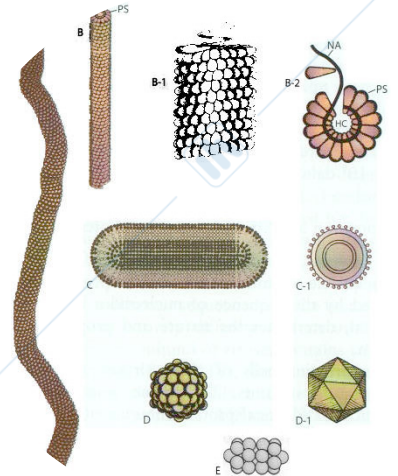
I virus possono avere morfologia diversa a seconda di come sono organizzate le proteine del capsid.

Nb. La morfologia del virus caratterizza i vari taxa virali (ovviamente anche il genoma va a caratterizzarli)

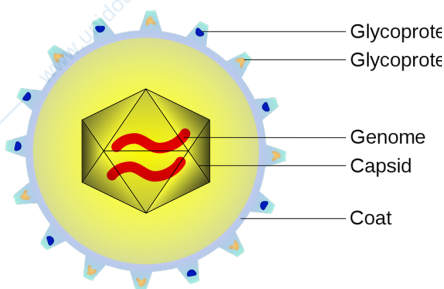
Possiamo distinguere diverse forme tra cui:

- Bastoncellare
- Sferica
- Elicoidale
- Icosaedrica

Oltre al capsid alcuni virus possono essere rivestiti da un ulteriore strato esterno definito **pericapsid** di natura lipidica. Dal pericapsid possono sporgere proteine: le **proteine spike**.



Scheme of a CMV virus



I virus li dividiamo in:

-**MONOPARTITI**: tutto il genoma virale è racchiuso all'interno di un solo capsid

-**MULTIPARTITI**: il genoma virale è ripartito in più capsidi (bipartiti, tripartiti etc..)

-**MULTICOMPONENTI**: il genoma virale è racchiuso tutto all'interno di un unico capsid ma per l'infezione hanno bisogno di componenti presenti in altri virus (virus helper)

IL GENOMA VIRALE

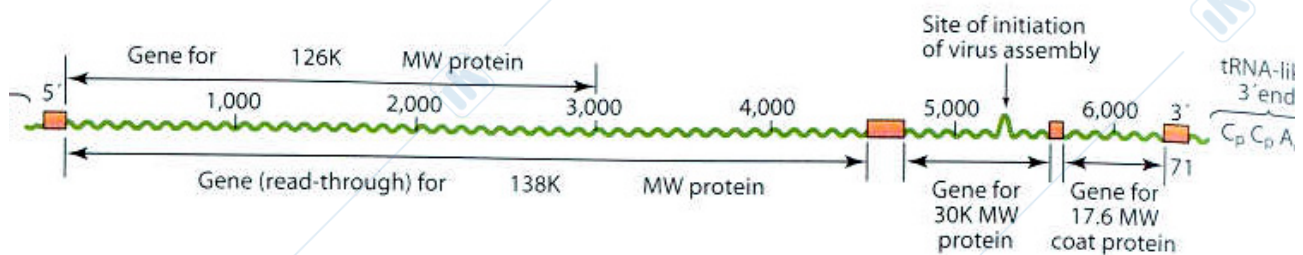
Il genoma virale, a differenza di quello dei viroidi, è **codificante**.
Contiene diversi ma (pochi geni) che codificano per:

- **Rna polimerasi**: necessaria per la replicazione (la cell vegetale non ha polimerasi che sintetizzano nuovi filamenti di RNA a partire da RNA)
- **Geni che codificano per proteine strutturali**
- **Geni che codificano per proteine di trasporto**
- **Geni che codificano per fattori virulenza**

(i fattori di virulenza sono elementi che concorrono alla virulenza del patogeno senza i quali questo non riuscirebbe ad infettare l'ospite)

E' vero che sono un numero limitato di geni ma all'interno della stessa sequenza genica troviamo più Open Reading Frame (ORF sequenze con un codone di inizio AUG e un codone di stop) consentendo di sintetizzare più proteine.

In che modo è possibile? La struttura si distorce rendendo indisponibile il 1° codone di inizio, così che la traduzione possa iniziare dal codone AUG posizionato più a valle.



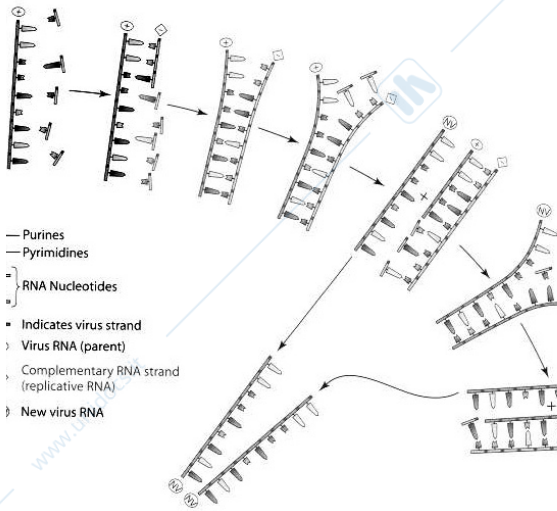
Il genoma virale viene tradotto a carico del macchinario dell'ospite.

La cellula vegetale infatti riconosce il genoma virale come fosse mRNA per via di alcune similarità (es la coda PoliA, il cap al 5')

Ma il genoma virale lo distinguiamo in:

- **RNA a singolo filamento con polarità positiva (+)** : viene riconosciuto come mRNA e può essere direttamente tradotto. Per la sua replicazione invece il virus deve sintetizzare un filamento complementare (con polarità negativa) e utilizzarlo come stampo per la sintesi di nuove copie (il genoma virale con polarità +)
- **RNA a singolo filamento con polarità negativa (-)** : non viene riconosciuto come mRNA. Quindi deve prima sintetizzare un filamento complementare (Rna a singolo filamento con polarità positiva) , il filamento + viene così utilizzato sia per la traduzione (viene riconosciuto come mRNA) che per la replicazione (fa da stampo per la sintesi di filamento con polarità negativa)

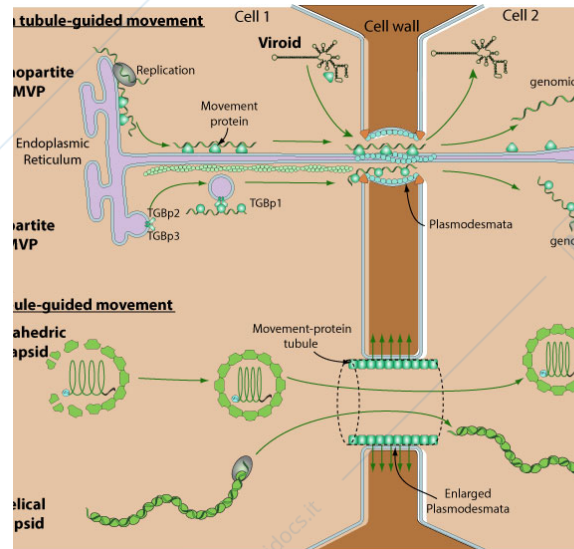
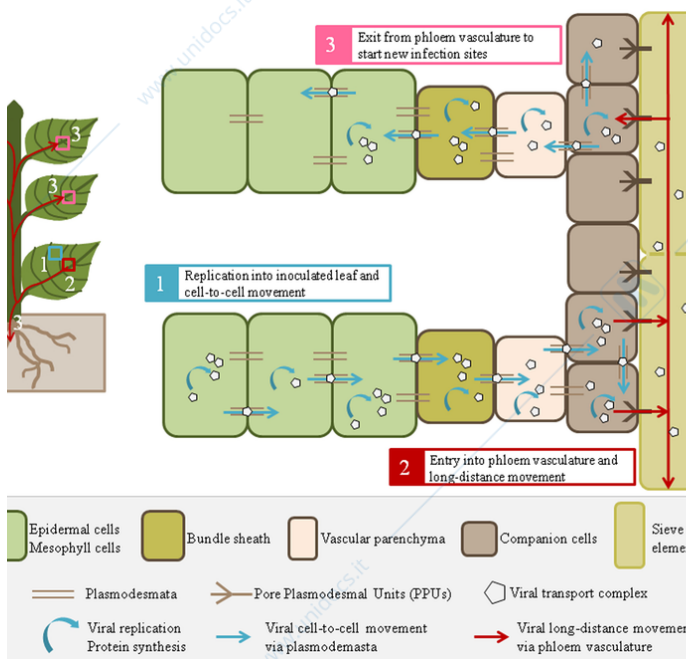
Poiché la traduzione di questo genoma - può avvenire solo dopo la replicazione del filamento stampo, questo rna porta con sé una RNA polimerasi (ancora non può essere tradotta quella codificata dal gene!!)



-come è garantita la variabilità nei virus se l'RNA viene sempre replicato tale e quale?-

- Mutazioni
- Scambi di sequenze con altri virus

COSA SUCCEDDE QUANDO IL VIRUS SI TROVA IN PROSSIMITA' DELLA CELLULA VEGETALE



1. Il virus si trova in prossimità della cellula vegetale e viene riconosciuto da recettori posti sulla superficie della cellula vegetale
2. La cellula vegetale lo riconosce come molecola da endocitare
3. Il Virus entra incapsidato
4. Successivamente viene decapsidato
5. Il genoma virale viene **replicato e tradotto**.

Non vengono però tradotti tutti i geni, ma in questa **fase precoce** vengono tradotti:

- Geni che codificano per l'RNA polimerasi
- Proteine che inibiscono il sistema di silenziamento dell'mRNA
- Proteine di trasporto (come le 30 K)

A cosa servono le proteine di trasporto?

Dobbiamo tenere conto del fatto che il virus si sposta intercellularmente (cellula-cellula) tramite i plasmodesmi. I Plasmodesmi sono dei canali citoplasmatici della grandezza di 2-3 nm.

E' vero che è il genoma virale a spostarsi di cellula in cellula, ma questo è comunque costituito da in media 6 Kb (non ci passerebbe!!)

Le proteine di trasporto quindi servono a:

- Linearizzare il genoma virale che si compatterebbe in una struttura secondaria (loop + zone a ssRNA che non riuscirebbero mai a passare)
- Proteggere il genoma dalle ribonucleasi
- cooptano le proteine di trasporto del canale citoplasmatico per farsi trasportare (l'interazione tra proteine virali e cellulari è il risultato della co-evoluzione)

6. Il virus si muove cellula-cellula fino ad arrivare al floema
7. L'infezione da locale diventa sistemica (dal floema arriva verso tutti gli organi della pianta)
8. Nel floema il virus si muove sia in modo acropeto e basipeto (il floema si muove a seconda delle necessità della pianta)

I plasmodesmi che mettono in comunicazione i vari elementi cribrosi sono molto grandi (placche cribrose) tanto che in questo tessuto possono passare sia genomi virale che virus incapsidati.

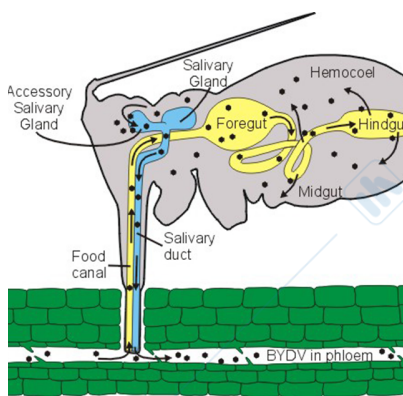
9. Solo in una seconda fase (dopo circa 10-12 h dall'infezione) avviene la traduzione delle proteine strutturali

COME CI ARRIVA IL VIRUS NELL'OSPITE?

I virus non possono penetrare nell'ospite come fanno i batteri oppure i funghi.
Deve esserci uno contatto tra fluidi , che può avvenire :

- Per sfregamento di una pianta malata con una sana
- Strumenti di lavoro che trasferiscono il fluido nella pianta sana (es durante la potatura)
- Gli innesti
- In laboratorio si fanno delle microferite sulle foglie e si mettono a contatto con il fluido infetto
- Ma i virus arrivano alla pianta soprattutto tramite **insetti** (cavallette, A'fidi, coleotteri)

In questo caso dobbiamo fare una distinzione tra i virus.



-Virus persistenti: non hanno un rapporto specifico con il vettore. Il virus si "lega" all'apparato boccale dell'insetto, rimane nello stiletto e viene iniettato quando il vettore si sposta su un'altra pianta

-Virus circolativi: entrano nell'apparato boccale, passano in tutto il sistema circolatorio per poi essere rilasciati nella pianta sana (tramite il condotto salivare che viene usato per secernere enzimi che degradano la parete cellulare)

-Virus propagativi: hanno un rapporto specifico con il vettore. Si replicano all'interno di esso (senza causare infezione) per poi essere iniettati nella pianta sana (in questo caso **nella pianta entra una certa carica virale**)

-SINTOMI-

Diversi sono i sintomi causati da un patogeno virale.

MALNUTRIZIONE (1)

Colonizzando il tessuto floematico, il virus impedisce il trasporto di nutrienti
La malnutrizione può essere anche causata da una mancanza di nutrienti nel suolo*

DECOLORAZIONE PUNTIFORME(2)

I Virus quando entrano nella cellula vegetale presentano delle sequenze segnale (come dei peptide segnale) che vengono riconosciute dall'ospite e le trasporta verso una certa destinazione (il cloroplasto).

Il virus si aggancia alla membrana del cloroplasto inducendolo a replicarsi così da poter replicare se stesso.

Questo porta ad un'alterazione del cloroplasto causando una decolorazione sulle cellule colpite da questo fenomeno (effetto **mosaico**)



SPOT NECROTICI (3)

In questo caso il virus si aggancia alla membrana di mitocondri e perossisomi.
La cellula recepisce un segnale di alterazione/danno e va in apoptosi (PCD)

SINTOMI CAUSATI DAL SISTEMA DI SILENZIAMENTO DELL'mRNA

Il sistema di silenziamento dell'mRNA è un sistema di controllo dell'espressione genica che avviene a livello post trascrizionale.

L'inibizione di questo sistema, fa sì che il genoma virale non venga degradato, ma a sua volta si ha un'alterazione del controllo dei geni dell'ospite.

I sintomi causati dall'alterazione di questo sistema possono essere: **sbiancatura fogliare, alterazione morfogenesi** (es per la morfogenesi del fiore ci sono tanti geni che controllano l'espressione dei geni che codificano per le varie parti fiorali, un'alterazione di quest'espressione porta a mutanti omeotici)

Es. sistema di silenziamento mRNA:

Durante la replicazione del genoma virale si forma dsRNA.

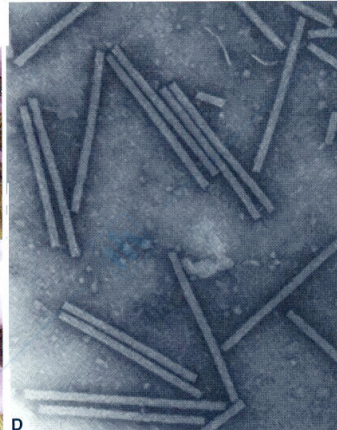
Questo viene riconosciuto da **dicer-like** che taglia il dsRNA in tanti frammenti.

I frammenti sono caricati su una proteina **AGO (Argonaute)** formando il complesso RISK. Questo complesso riconosce i filamenti complementari e li taglia.

Il virus codifica per proteine (es. p19) che evitano il caricamento sulle proteine AGO.

MALATTIE

1. Mosaico del tabacco



Agente causale: TMV (Tobacco Mosaic Virus)

Virus ad ssRNA con polarità (+) bastoncellare.

Sintomo più evidente: decolorazione puntiforme sulle foglie che danno un effetto mosaico

2. Virus della tristezza degli agrumi

Agente causale: CTV Citrus Tristeza Virus

Un virus appartenente al genere **Closterovirus**, bastoncellare ad ssRNA (+)



Il virus arriva alla pianta in modalità semi-persistente (può rimanere nel vettore fino a 1-4 giorni) da diverse Afidi: **Toxoptera Citricida** molto abbondante sugli alberi di agrumi ma limitato in America.

In Italia, Spagna Israele ce ne sono di diversi , il più noto è **Aphis gossypii**

SINTOMI

La severità dei sintomi dipendono anche dalla natura degli isolati (mild o severe) e dalla sensibilità dell'ospite.

Tra i sintomi più comuni ricordiamo:

- **Vaiolatura del fusto** (alterazione cromatica del fusto)
- **Punteggiature all'interno del fusto**
- **Tristezza** (il sintomo più grave) : consiste in un declino progressivo della pianta. Interessa tutti gli organi e consiste:

Foglie: possono ingiallire e cadere prematuramente

Rami: sottili e fragili

Perdita di turgore

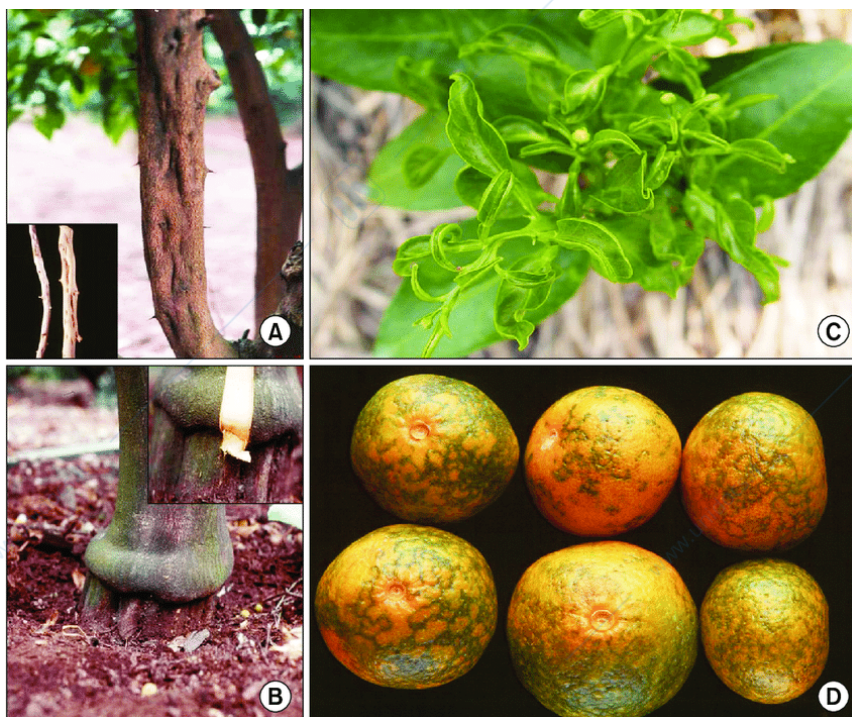
Crescita rallentata

Produzione di numero inferiore di frutti, di piccole dimensioni e pezzati (non hanno raggiunto un'omogenea maturazione)

Morte della pianta

*Bisogna fare molta attenzione ai porta innesti malati

In Spagna sono morti circa 40 milioni di alberi di agrumi per via dei portainnesti infetti.



CONTROLLO MALATTIA

Coltivare piante resistenti (1)

Controlli a campione nelle nursery tramite test ELISA(2)

Cross protection (3): consiste nell'inoculare la pianta un ceppo di virus ipovirulento stimolando una risposta di difesa della pianta.

Il ceppo ipovirulento può appartenere allo stesso taxa virale del ceppo severo (**cross protection intraspecifica**) oppure appartenere ad un taxa diverso (**cross protection interspecifica**)

IDENTIFICAZIONE

Test biologici: con piante spia

Test di microscopia: identificazione tramite microscopio elettronico

Test molecolari rapidi: test ELISA (anticorpi monoclonali) , PCR (non possiamo isolarli, ricorda)

PCR: dallo spotterato isoliamo il materiale genetico (RNA) , si retrotrascrive l'RNA a DNA

Si amplifica una certa sequenza del genoma virale utilizzando specifici primer.

Il prodotto amplificato si controlla tramite elettroforesi su gel (banda corrispondente)

Oppure tramite real time pcr (mi dice se ho amplificato e quante copie c'erano)

Sequenziamento (i ceppi possono essere molto simili quindi serve sempre)