

Relazione scientifica sui risultati dell'attività di ricerca svolta  
nell'ambito del programma STM (Short Term Mobility) 2014  
FRANCESCO DI SERIO.

Titolo del Programma

**Involvement of RNA methylation in plant virus and viroid infections.**

ATTIVITA' SVOLTA E RISULTATI OTTENUTI

Durante la permanenza (dal 7 al 27 luglio 2014) nel laboratorio del Dott. J.A. Darós, presso l'Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Valencia, Spagna, il sottoscritto ha realizzato gli esperimenti programmati ottenendo i risultati riportati di seguito.

**a) Ruolo della metilazione dell'RNA nell'interazione pianta-viroide**

L'applicazione di un nuovo protocollo per l'identificazione dei nucleotidi C5-metilcitosina (m5C) in RNA altamente strutturati ha consentito di accertare l'assenza di metilazione nelle citosine degli RNA di entrambe le polarità del viroide del tubero fusiforme della patata (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) e del viroide del colpo di sole dell'avocado (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd). A tale scopo sono stati clonati e sequenziati complessivamente oltre 100 cloni di cDNA di RNA viroidali di entrambe le polarità previamente trattati con bisolfito. Pertanto, questo studio consente di escludere, con un certo margine di certezza, la presenza di m5C in questi RNA viroidali ed il contributo di tale modificazione dell'RNA nel conferire agli RNA viroidali la capacità di utilizzare gli enzimi cellulari per compiere il proprio ciclo infettivo. Poiché PSTVd e ASBVd sono, rispettivamente, i membri tipo dei viroidi delle famiglie *Pospiviroidae* e *Avsunviroidae*, queste conclusioni possono estendersi probabilmente a tutti i viroidi conosciuti. Gli studi condotti nell'ambito di questa ricerca hanno anche evidenziato che i protocolli attualmente pubblicati per l'identificazione di m5C negli RNA non sono adatti per lo studio di RNA altamente strutturati, come appunto sono i viroidi. In quest'ultimo caso è necessario utilizzare condizioni di denaturazione più spinte che consentono di evitare possibili artefatti. Questi risultati saranno oggetto di una specifica pubblicazione in corso di preparazione.

**b) Ruolo della metilazione dell'RNA nell'interazione pianta-viroide.**

Preparazioni di RNA di piante infette da CaMV sono state trattate con DNasi e poi utilizzate per lo studio della presenza di m5C nella regione leader dell'RNA virale, una regione di particolare importanza per la traduzione dell'RNA virale. Questa regione di RNA è altamente strutturata, pertanto è stato applicando il nuovo protocollo già utilizzato nel caso dei viroidi. Questo studio ha dimostrato l'assenza di m5C in tale regione dell'RNA virale. Al contrario, la C in posizione 38 del tRNA-Arg, utilizzato come controllo positivo, è risultata metilata quando analizzata applicando lo stesso protocollo. Questi dati dimostrano l'assenza di m5C nella regione leader dell'RNA di CaMV.

Il ruolo delle proteine coinvolte nei meccanismi di modificazione dell'RNA (MTA, che catalizza la genesi di N6-metiladenosina, e DNMT2, che catalizza la genesi di C5-metilcitosina) nell'interazione pianta virus è stato studiato utilizzando linee di *Arabidopsis* mutanti deficienti di tali enzimi. Lotti di 24 piante selvagge e di due linee mutanti (*m6A* e *dnmt2*) sono state inoculate con i virus *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, virus a DNA), *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Turnip mosaic virus* (TMV). A tre settimane dall'inoculazione tutte le piante mutanti *m6A* infette da CMV mostravano sintomi molto evidenti dell'infezione. Tutte le altre piante si mostravano asintomatiche.

Al fine di determinare il possibile coinvolgimento degli enzimi *m6A* e *dnmt2* nell'interazione pianta viroide, l'analisi dell'incidenza delle infezioni nei singoli lotti e la quantificazione della carica virale è in corso.

L'esperienza nel laboratorio del Dr. Daròs è stata particolarmente utile in quanto abbiamo adesso a disposizione un metodo validato per l'identificazione di m5C in RNA virali e viroidali di interesse. Inoltre, sono state avviate prove sperimentali congiunte che consentiranno di stringere ulteriormente i rapporti scientifici tra il gruppo italiano e quello spagnolo.

Bari 10/10/2014

In fede  
  
Francesco Di Serio