

A. BERTACCINI, F. MARANI, V. PASSARELLI

Istituto di Patologia vegetale, Università di Bologna

## RISANAMENTO DELL'ASPARAGO DALL'INFEZIONE DA VIRUS 2.

### INTRODUZIONE

Il virus 2 dell'asparago (AV2) é molto diffuso nelle colture di asparago sia in Europa che negli Stati Uniti. In Italia é stato isolato sovente in coltivazioni in cui erano apprezzabili sintomi piú o meno gravi di deperimento (Bertaccini e Marani, 1983). La profilassi della infezione di AV2 risulta piuttosto problematica in quanto la pianta é dioica ed il virus si trasmette per seme e per polline (Weissenfels e Schmelzer, 1978; Bertaccini et al., 1982). Per quanto riguarda l'ottenimento di seme ad uso propagativo si potrebbero al-  
lestire vivai utilizzando piantine riconosciute esenti dal virus 2. Tali vivai devono essere realizzati in opportune condizioni igienico-agronomiche che assicurino da una parte la non reinfezione delle piante porta-seme, e dalla altra la fecondazione delle medesime con polline non infetto. Questa strada é di non facile attuazione e soprattutto non risolve il problema del risanamento dei nuovi ibridi, che in futuro si affiancheranno alle cultivar attualmente utilizzate (Falavigna et al., 1983). In questi casi, qualora i parentali risultino infetti, é necessario ricorrere alla coltura in vitro degli apici meristematici per ottenere materiale virus-esente. Questa tecnica é risultata molto efficace per risanare l'asparago da altri virus (Yang e Clore, 1976; Yang, 1979b ) ed ha dato buoni risultati anche nel caso specifico del virus 2.

In riferimento a ciò abbiamo cercato di operare per ottenere il risanamento dall' AV2 mediante la coltura in vitro di apici meristematici di asparago, prelevati da materiale infetto. I risultati di tale attività vengono

---

Lavoro svolto nell'ambito del Programma di ricerca: "Miglioramento genetico-sanitario dell'Asparago" finanziato dalla Regione Emilia-Romagna.

brevemente esposti qui di seguito.

#### MATERIALI E METODI

Sono state utilizzate piantine di Asparagus officinalis L. cv Precoce di Argenteuil di circa 1 anno e parentali eterozigati ("26-C" e "54-C") di un ibrido recentemente costituito all'Istituto Sperimentale di Orticoltura sezione di Montanaso Lombardo. Il prelievo degli apici meristemati è stato eseguito al microscopio stereoscopico a 65x con pinze e bisturi sterilizzati al la fiamma: tutte le operazioni di prelievo e quelle successive di trapianto in substrati di moltiplicazione e radicazione sono state eseguite sotto cappa sterile a flusso verticale. I germogli, quando ritenuto necessario, sono stati sterilizzati con ipoclorito di sodio al 2% per 5-6 minuti e poi lavati ripetutamente con acqua sterile. Gli apici meristemati di 0,1 mm, col primo abbozzo fogliare (Fig. 1) sono stati posti in provette contenenti 5 ml di substrato di coltura agarizzato (7 g/l di agar), portato a pH 5,7 e sterilizzato in autoclave.

I substrati sperimentati per la crescita degli espianti meristemati e la radicazione dei germogli si compongono dei macroelementi, microelementi, sostanze organiche e vitamine indicate da Murashige e Skoog (1962), cui sono state aggiunte diverse concentrazioni di Kinetina ed acido  $\alpha$ -naftalenacetico (NAA) (Tabella I). Il trasferimento dei germogli in substrato fresco è stato eseguito dopo 30-40 giorni dal prelievo degli apici meristemati. Successivamente si è mantenuta una periodicità di circa 60 giorni nei trasferimenti nei substrati di moltiplicazione. Per la radicazione gli ormoni utilizzati sono stati l'acido indolbutirrico (IBA) alla concentrazione di 1 mg/l e la Kinetina 1 mg/l: questo substrato è stato utilizzato sia senza carbone attivo sia con aggiunta di 5 g/l di tale sostanza. In questa fase le piantine sono state trasferite in provettoni contenenti 20 ml di substrato di coltura.

Parallelamente ai substrati di crescita e radicazione descritti ne sono stati sperimentati altri aventi la stessa composizione ormonale ma addizio nati con differenti concentrazioni di amantadina: 50 mg/l; 100 mg/l; 150 mg/l.

Tutte le colture sono state mantenute in ambiente termocondizionato: 25 <sup>+</sup> 1°C, illuminazione artificiale (4000 lux), fotoperiodo di 16h.

Quando le piantine presentavano un apparato radicale secondario sufficiente-

mente sviluppato (Fig. 4) venivano trasferite in vasi contenenti terreno sterilizzato composto da terriccio e sabbia in parti uguali e mantenute poi in serra a 22-24°C, umidità 80% ed illuminazione artificiale per 16h.

I saggi per accertare l'avvenuto risanamento da AV2 sono stati eseguiti inoculando parte della vegetazione delle piantine provenienti da meristema, previo schiacciamento in mortaio sterile in presenza di tampone fosfato 0,1M pH 7, su Nicotiana tabacum cv White Burley e su Chenopodium amaranticolor. Sono stati effettuati tre saggi successivi a vari stadi di sviluppo e cioè a questi intervalli di tempo:

- piantine, radicate o meno, in provettoni con numerosi germogli ben sviluppati cioè dopo un mese dal trapianto in substrato di radicazione;
- piantine radicate in terra da 3 mesi;
- piantine radicate in terra da 6-8 mesi.

#### RISULTATI

La sopravvivenza dell'espianto del meristema apicale di asparago è avvenuta in molti dei substrati sperimentati (Tabella I). In alcuni casi quali, ad esempio quelli contenenti alte concentrazioni di NAA (0,50 mg/l), si è avuta scarsa crescita della vegetazione e produzione di abbondante callo e di germogli malformati. Nei substrati contenenti invece basse concentrazioni di NAA e Kinetina (0,00-0,01 mg/l) la crescita degli espianti è risultata ridotta e si sono riscontrate clorosi e necrosi nel giro di breve tempo. Alle concentrazioni di 0,01 mg/l di NAA e 0,05-0,10 mg/l di Kinetina la crescita è risultata notevole ma solamente a livello di vegetazione, scarsa era invece in un secondo tempo l'emissione di radici. Il substrato che è risultato più adatto alla crescita dell'apice meristemato e che ha permesso anche una buona moltiplicazione (Figg. 2-3) del germoglio è risultato quello contenente 0,10 mg/l di NAA e 0,10 mg/l di Kinetina.

La presenza dell'amantadina non ha fatto riscontrare differenze od anomalie di sviluppo maggiori di quanto si sia osservato negli espianti cresciuti nei substrati nei quali essa non era presente.

Per quanto concerne la radicazione occorre distinguere fra la cv Precoce d'Argenteuil ed i parentali "54-C" e "26-C". Nel "Precoce d'Argenteuil" se la piantina messa in radicazione presentava un sufficiente sviluppo (4-5 germogli

Tabella I - Percentuali di sopravvivenza degli apici meristematici nei substrati sperimentati.

Kinetina (mg/l) NAA (mg/l)	Kinetina (mg/l)			
	0,00	0,01	0,05	0,10
0,00	30	6	44	35
0,01	6	21	16	22
0,05	0	0	6	12
0,10	7	8	11	44
0,50	0	6	11	0

Tabella II - Radicazione del "54-C" e del "26-C" nei vari terreni usati.

MS* + Kinetina 0,1 mg/l	IBA (mg/l)			IAA (mg/l)		
	1	2	5	1	5	10
"26-C"	-	-	-	++	+++	+
"54-C"	++	+	-	-	+	-

MS	IAA (mg/l)			NAA (mg/l)		
	1	5	10	0,05	0,1	0,5
"26-C"	++	+++	++	-	-	+
"54-C"	-	-	-	-	+	-

\* base MS modificata in alcuni microelementi

- non é avvenuta radicazione

+ radicazione scarsa

++ radicazione discreta

+++ radicazione buona

di 7-10 cm di altezza) la comparsa delle radici avveniva nel 50% degli esemplari dopo 15-30 giorni dal trapianto.

Si sono incontrate invece notevoli difficoltà nella radicazione di "54-C" e "26-C". Sono stati sperimentati numerosi ormoni a diverse concentrazioni (Tabella II); le percentuali di radicazione sono state molto basse, al massimo si è riscontrato il 20% nel "26-C" in substrati contenenti acido indolacetico (IAA); per il "54-C" le difficoltà incontrate in questa fase sono state ancora maggiori. L'aggiunta del carbone attivo non ha influito sui risultati né per il "Precoce d'Argenteuil" né per i parentali.

Il trapianto in serra, se veniva effettuato quando le piantine erano provviste di numerose radici secondarie (Fig. 4), non ha presentato difficoltà e si sono riscontrate percentuali di sopravvivenza del 70-80%.

Per quanto concerne il risanamento, i risultati dei saggi delle piantine in provetta sono stati confermati da quelli effettuati sulle piantine radicate a distanza di 3 e 6-8 mesi dalla messa a dimora in terra (nei casi in cui tale verifica è stata possibile). Nella cv Precoce d'Argenteuil si è riscontrata una bassa percentuale di risanamento (4%); l'aggiunta al substrato di amantadina ha permesso di elevare tale percentuale fino al 30%. La concentrazione di questa sostanza non si è rivelata determinante ai fini del risanamento, come è illustrato nella seguente tabella riassuntiva:

Amantadina (mg/l)		0	50	100	150
% di risanamento	Precoce d'Argenteuil	4%	30%	29%	20%

Le percentuali di risanamento del "26-C" e del "54-C" sono state calcolate su di un numero non molto elevato di piante, sono comunque risultate variabili come si può vedere dalla seguente tabella:

Amantadina (mg/l)		0	50	100	150
% di risanamento	"54-C"	10%	30%	25%	14%
	"26-C"	52%	77%	70%	60%

Il "26-C" ha rivelato una notevole possibilità di risanamento anche in



Fig. 1 - Apice meristemático di Asparagus officinalis L. (indicato dalla freccia) si può notare la presenza di un primo abbozzo fogliare. Ingrandimento 550x.

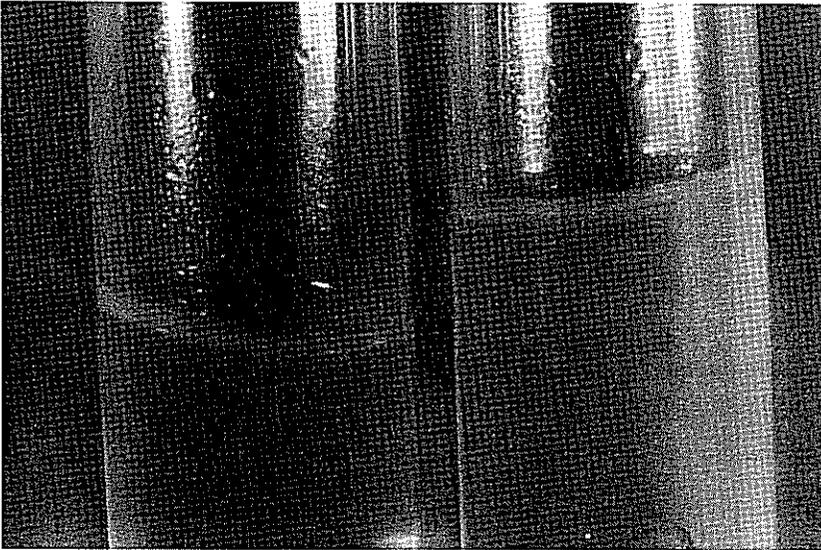


Fig. 2 - Germogli di asparago in substrato di crescita.

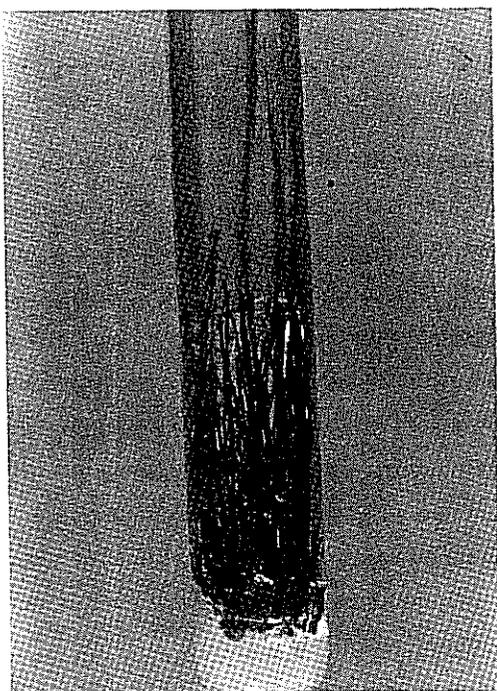


Fig. 3-Germogli di asparago in fase di moltiplicazione.

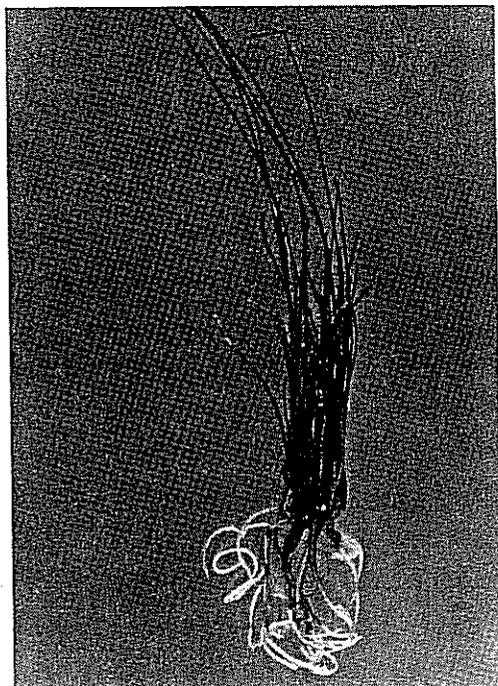


Fig. 4-Piantina di asparago che ha emesso numerose radici. La presenza delle radici secondarie favorisce una buona ripresa nella delicata fase del trapianto in terra.

assenza di amantadina (52%), comunque anche in questo caso come per il "54-C" la presenza della amantadina ha elevato sempre la percentuale di risanamento.

#### DISCUSSIONE

Sono reperibili in letteratura moltissimi lavori sperimentali sulla propagazione in vitro dell'asparago, in quanto, essendo la pianta dioica, questo tipo di propagazione é molto utile per mantenere costanti i caratteri genetici della pianta (Takatori et al., 1968; Murashige et al., 1972; Hasegawa et al., 1973). Recentemente alcuni genetisti hanno utilizzato come strumento di ricerca questa tecnica per il miglioramento genetico dell'asparago (Doré, 1977; Falavigna e Rossi, 1981; Falavigna et al., 1983). La più grossa mole di lavoro sotto tutti i punti di vista sulla coltura in vitro dell'asparago é stata finora effettuata negli Stati Uniti; in un primo tempo é stato sviluppato lo aspetto della propagazione massiva (Yang e Clore, 1973; 1974a; b; 1975; Yang, 1977), più recentemente é stato preso in considerazione l'aspetto del risanamento dalle infezioni virali (Yang e Clore, 1976; Yang 1979a; b).

I nostri risultati relativi alle prove di crescita e di moltiplicazione sono paragonabili a quelli riportati da Yang e Clore (1973) indipendentemente dalla cultivar o dal genotipo di asparago da cui si é partiti per l'espianto. Per quanto concerne invece il risanamento da AV2 abbiamo rilevato percentuali che non concordano, in generale con quelle riportate in letteratura (Yang e Clore, 1976; Yang, 1979b). Tali percentuali sono inoltre differenti a seconda del materiale prelevato e ciò potrebbe essere in relazione ad una differenza di virulenza dei diversi isolati di AV2 (Uyeda e Mink, 1981) che potrebbe influire sulla efficacia della tecnica usata. Si può inoltre ipotizzare un'influenza del genotipo dell'asparago come si può rilevare dai risultati ottenuti per il "54-C" ed il "26-C" che sono parentali a genotipo costante.

L'azione dell'amantadina come sostanza antivirale é nota in letteratura per alcuni virus animali ad RNA (Hoffman et al., 1965; Skehel et al., 1977). Nell'ambito della virologia vegetale é stata sperimentata con qualche successo contro i viroidi (Horst e Cohen, 1980) ma non ci risulta sia stata utilizzata in prove di terapia antivirale. Il suo meccanismo di azione non é chiaro: sembra inibire la diffusione del virus da una cellula all'altra oppure bloc-

care l'"uncoating" del virus una volta penetrato nella cellula (Polsinelli et al., 1978). I risultati da noi conseguiti utilizzando l'amantadina sono tuttavia preliminari in quanto occorre sperimentarla su di un numero più elevato di espianti. E' necessario verificarne l'azione alle concentrazioni più basse ed a quelle più alte, in quanto l'effetto antivirale sembra legato solo alla presenza e non alla concentrazione della sostanza. Si dovranno infine svolgere opportune ricerche per verificare l'azione a lungo termine dell'amantadina, verificare cioè che non si tratti soltanto di una riduzione temporanea della carica virale. Non abbiamo peraltro riscontri bibliografici relativi alla sua azione su altri virus vegetali, anche se i risultati ottenuti con altre sostanze antivirali (Virazolo) in prove condotte sui tessuti vegetali coltivati in vitro ed infetti da virus, paiono incoraggianti (Simpkins et al., 1981; Pennazio e Martelli, 1983).

#### RIASSUNTO

E' stata utilizzata la tecnica della coltura in vitro di apici meristematici per ottenere il risanamento dell'infezione da virus 2 (AV2) dell'Asparagus officinalis L.. Sono stati utilizzati apici prelevati da piantine della cv Precoce d'Argenteuil e dai parentali eterozigati ("26-C" e "54-C") di un ibrido recentemente costituito. La percentuale di risanamento é risultata variabile a seconda del materiale da cui si é partiti per l'espianto. Le percentuali più elevate di risanamento (50%) si sono avute nel "26-C". Esperimenti preliminari sull'effetto antivirale dell'amantadina, hanno fatto rilevare un incremento della percentuale di risanamento. Sono in corso prove per approfondire questi risultati.

#### SUMMARY

##### Asparagus plants free from Virus 2 infection.

The meristem-tip culture was used to obtain Asparagus officinalis L. plants free from virus 2 (AV2). Tips taken from seedlings of cv Precoce d'Argenteuil and heterozygote stock ("26-C" and "54-C") of a recently bred hybrid. The percentage of virus-free plants obtained using this technique varied according to the material used. The highest percentage of healthy plants (50%) was obtained with "26-C". Preliminary experiments on the anti-viral effect of amantadine revealed an increased percentage of healthy plants.

These results are being studied in depth.

BIBLIOGRAFIA

- BERTACCINI A., MARANI F., VISCHI M. (1982). Trasmissione per seme dell'asparago virus 2. La difesa delle piante, 5-6, 415-420.
- BERTACCINI A., MARANI F. (1983). Le virosi dell'asparago. *l'Italia agricola*, 1, 24-26.
- DORE' C. (1977). In vitro techniques as an efficient tool in asparagus breeding. *Acta Hort.*, 78, 89-93.
- FALAVIGNA A., ROSSI V. (1981). La propagazione in vitro dell'asparago (Asparagus officinalis L.) *Genet.Agr.*, 35, 61-62.
- FALAVIGNA A., TACCONI M.G., SORESSI G.P. (1983). Recent progress in asparagus (Asparagus officinalis L.) breeding by anther vitro culture. *Acta Hort.*, 131, 215-222.
- HASEGAWA P.M., MURASHIGE T., TAKATORI F.H. (1973). Propagation of asparagus through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cytohistological characteristics. *J.Amer.Soc. Hort. Sci.*, 98,(2), 143-148.
- HOFFMANN C.E., NEUMAYER E.M., HAFF R.F., GOLDSBY R.A. (1965). Mode of action of the antiviral activity of amantadine in tissue culture. *J.Bacteriol.*, 90, 623-628.
- HORST R.K., COHEN D. (1980). Amantadine supplemented tissue culture medium: a method for obtaining chrysanthemum free of chrysanthemum stunt viroid. *Acta Hort.*, 110, 315-319.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiol.Plant.*, 15, 473-497.
- MURASHIGE T., SHABDE M.N., HASEGAWA P.M., TAKATORI F.H., JONES J.B. (1972). Propagation of asparagus through shoot apex culture. I. Nutrient medium for formation of plantlets. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.*, 97, (2), 158-161.
- PENNAZIO S., MARTELLI G.P. (1983). La chemioterapia delle virosi delle piante. *La difesa delle piante*, 5, 291-320.
- POLSINELLI M., GALIZZI A., MAZZA G., SICCARDI A.G. (1978). *Microbiologia*. Ed. Boringhieri, 496 pp.

- SIMPKINS J., WALKEY D.G.A., NEELY HEATER A. (1981). Chemical suppression of virus in cultured plant tissues. *Ann.appl.Biol.*, 99, 161-169.
- SKEHEL J.J., HAY A.J., ARMSTRONG J.A. (1977). On the mechanisms of inhibition of influenza virus replication by amantadine hydrochloride. *J.gen.Virol.*, 38, 97-110.
- TAKATORI F.H., MURASHIGE T., STILLMAN J.I. (1968). Vegetative propagation of asparagus through tissue culture. *Hort.Science*, 3, (1), 20-22.
- UYEDA I., MINK G.I. (1981). Properties of asparagus virus II: a new member of the Ilarvirus group. *Phytopathol.* 71, 1264-1269.
- YANG H.J., CLORE W.J. (1973). Rapid vegetative propagation of asparagus through lateral bud culture. *Hort.Science*, 8, (2), 141-143.
- YANG H.J., CLORE W.J. (1974a). Development of complete plantlets from moderately vigorous shoots of stock plants of *Asparagus in vitro*. *Hort.Science*, 9, (2), 138-140.
- YANG H.J., CLORE W.J. (1974b). Improving the survival of aseptically-cultured asparagus plants in transplanting. *Hort.Science*, 9 (3), 235-236.
- YANG H.J., CLORE W.J. (1976). Obtaining virus-free plants of *Asparagus officinalis* L. by culturing shoot tips and apical meristems. *Hort.Science*, 11; (5), 474-475.
- YANG H.J., (1977). Tissue culture technique developed for *Asparagus* propagation. *Hort.Science*, 12 (2), 140-141.
- YANG H.J., (1979a). Early effects of viruses on the growth and productivity of asparagus plants. *Hort. Science*, 14, (6), 734-735.
- YANG H.J. (1979b). Mass production of virus-free *Asparagus officinalis* L. plants by tissue culture. *Proceed.Fifth Inter.Asparagus Symp.*, Geisenheim, 156-162.