

APPLICAZIONE DELLA TECNICA IMMUNOENZIMATICA (ELISA) PER LA INDIVIDUAZIONE
DI UN POTYVIRUS DELL'AGLIO

RABITI A.L., MARANI F., POGGI POLLINI C., GIUNCHEDI L., PIZZI L.

Istituto di Patologia Vegetale, Università degli Studi, Bologna

RIASSUNTO

Nell'ambito di un programma di qualificazione sanitaria per le infezioni da virus dell'aglio è stata messa a punto la tecnica sierologica immunoenzimatica (ELISA), secondo il metodo indiretto con proteina A, per la diagnosi di un potyvirus dell'aglio sierologicamente correlato con il virus del nanismo giallo della cipolla e debolmente correlato con il virus della striatura gialla del porro. L'antisiero al virus previamente preparato in coniglio è stato neutralizzato con succo estratto da piante sane ed è stato utilizzato diluito 1:2500 e 1:1500 rispettivamente per il primo e il secondo trattamento. I tessuti da saggiare sono stati triturati in tampone di estrazione nel rapporto (p/v) di 1 a 20..

Sulla base dei risultati delle prove sierologiche il virus in esame è stato riscontrato in un limitato numero (1,7%) di piante della cv. Piacentino Bianco provenienti da apici meristematici alla terza moltiplicazione in ambiente protetto nei confronti degli afidi, mentre non è stato riscontrato in un altro gruppo di piante durante la prima moltiplicazione vegetativa dopo il risanamento.

Lavoro eseguito nell'ambito del programma "Miglioramento genetico-sanitario dell'aglio "Piacentino Bianco" finanziato dalla Regione Emilia-Romagna.

SUMMARY

APPLICATION OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) IN THE DETECTION OF A GARLIC POTYVIRUS

Under a certification programme concerning garlic virus infection, an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with protein A was adopted according to Edwards and Cooper (1985), for the diagnosis of a garlic potyvirus. This virus was serologically correlated with onion yellow dwarf virus and distantly correlated with leek yellow stripe virus. The virus antiserum was prepared previously in rabbit and neutralized with sap extracted from healthy plants. The antiserum was used at dilutions of 1:2500 and 1:1500 for the first and second treatment. The plant tissue samples were extracted in 1:20 (w/v) extraction buffer.

The serological results showed that a very small number (1,7%) of garlic plants cv. Piacentino Bianco, obtained from meristem-tip culture, were infected during the third multiplication in an aphid-protected environment, whereas no infection was found in another group of plants during the first multiplication after meristem-tip culture.

Introduzione

L'aglio (Allium sativum L.) in tutte le aree di coltivazione è infettato da vari agenti virali che inducono gravi alterazioni a livello fogliare quali mosaico, striature clorotiche, deformazioni della lamina e che possono portare ad una riduzione nella produzione valutata dal 25 al 50% (Messiean et al., 1981; Marani et al., 1988). Sintomi simili sono stati spesso riscontrati anche nelle coltivazioni di aglio in Emilia-Romagna (Marani e Bertaccini, 1983). Da diversi anni la regione Emilia-Romagna ha avviato un programma per il risanamento da agenti virali tramite la coltura in vitro di apici meristematici, della cv. "Piacentino Bianco", già certificata esente da funghi e nematodi (Marani e Bertaccini, 1980; Bertaccini et al., 1986; Marani et al., 1986; Tacconi, 1986). E' nata così l'esigenza di disporre di un metodo di diagnosi più rapido rispetto a quello inizialmente adottato della osservazione al microscopio elettronico, per verificare lo stato sanitario, rispetto a tale virus, del materiale proveniente dal

processo di risanamento. In particolar modo ci sembra essenziale poter controllare lo stato sanitario dell'aglio, derivato dal processo di risanamento, che viene moltiplicato in pieno campo, al fine di ottenere materiale qualificato sanitariamente da distribuire agli agricoltori per la attività produttiva.

Materiali e metodi

a) Neutralizzazione dell'antisiero

Per eliminare la reazione nei confronti dei normali componenti delle piante, l'antisiero, preparato in coniglio contro un virus purificato da piante di aglio naturalmente infette secondo il metodo che prevede l'uso di cloroformio-tetracloruro di carbonio (Mohamed e Young, 1981), è stato neutralizzato con la frazione proteica di foglie di piante sane di aglio ottenuta mediante precipitazione con solfato di ammonio e successiva dialisi in tampone fosfato salino (PBS).

Prove di immunoelettromicroscopia secondo la tecnica della decorazione hanno evidenziato la presenza nei tessuti utilizzati per la purificazione, di particelle allungate flessuose di circa 750 nm di lunghezza, che sono risultate completamente decorate con l'antisiero al virus del nanismo giallo della cipolla (onion yellow dwarf virus = OYDV), in accordo con quanto riportato da Mohamed e Young (1981) e sono risultate parzialmente decorate con l'antisiero al virus della striatura gialla del porro (leek yellow stripe virus = LYSV).

Per contro negli stessi preparati non sono mai state riscontrate particelle isodiametriche nè particelle allungate flessuose non decorate.

b) Messa a punto della tecnica ELISA e determinazione dell'infezione virale

L'accertamento del potyvirus in foglie e bulbi di piante di aglio, derivate dalla coltura in vitro di apici meristematici, coltivate in parte in serra, in parte in pieno campo è stato realizzato mediante il metodo ELISA indiretto con proteina A (PAS-ELISA) (Edwards e Cooper, 1985). Tale metodo prevede dapprima il trattamento delle piastre ELISA con proteina A, seguita dalla sensibilizzazione con antisiero specifico al virus in esame. Il procedimento continua poi con l'aggiunta nei pozzetti del succo estratto

dai tessuti da saggiare che sono stati triturati in tampone fosfato salino contenente Tween-20 (0,05%), polivinilpirrolidone (2%) e ovoalbumina (0,2%) nel rapporto 1:20 (peso/volume). In alternativa i tessuti da saggiare sono stati triturati in presenza di PBS contenente solamente lo 0,1 M di Na-EDTA (Katul e Makkouk, 1987). E' stato quindi aggiunto nuovamente l'antisiero specifico che si lega al virus, se eventualmente presente nel succo, trattenuto nel pozzetto dal primo strato di antisiero. E' stata infine addizionata proteina A coniugata all'enzima fosfatasi alcalina ed il suo substrato, il paranitrofenilfosfato. L'avvenuta reazione, che si evidenzia dal cambiamento del colore da bianco a giallo del substrato contenuto dei pozzetti, indica la presenza del virus. Le condizioni di incubazione sono state: una notte a 4°C in presenza dell'estratto dai tessuti vegetali, 30 minuti - 1 ora a temperatura ambiente con il substrato e 2-3 ore a 28-30° con i restanti trattamenti.

La proteina A e la proteina A coniugata sono state utilizzate alla concentrazione di 1 µg/ml e alla diluizione di 1:1000. Una serie di prove effettuate adottando tali concentrazioni standard e utilizzando succo estratto da piante sane e da piante infette di aglio ha permesso di ricavare le diluizioni ottimali, ossia quelle che consentono la massima differenziazione fra l'assorbimento del succo da tessuti infetti e quello da tessuti sani, per il primo ed il secondo strato di antisiero che sono risultate rispettivamente 1:2500 e 1:1500. E' stata inoltre determinata la massima diluizione del succo estratto da tessuti infetti in grado di provocare una risposta positiva. Sono stati considerati positivi i campioni con un valore di assorbanza a 410 nm almeno 3 volte superiore al valore medio del controllo sano.

E' stata inoltre effettuata un'indagine per valutare la distribuzione e la concentrazione del virus in bulbi in riposo vegetativo: ciascun bulbo è stato quindi suddiviso in bulbilli che sono stati saggiati singolarmente.

Risultati e conclusioni

La tecnica sierologica ELISA da noi utilizzata si è dimostrata idonea all'individuazione del potyvirus nelle foglie e nei bulbi di aglio.

L'antisiero utilizzato, previa neutralizzazione con il succo di piante

sane, consente di discriminare chiaramente i campioni sani da quelli infetti. Come si può riscontrare nella tabella 1 i valori medi di assorbimento per il succo da bulbi infetti in riposo vegetativo sono risultati nettamente superiori a quelli del succo da bulbi sani. Anche l'assorbimento del succo estratto dai tessuti fogliari infetti durante il periodo primaverile-inizio estate, seppure mediamente inferiore a quello del succo estratto dai bulbi infetti, è risultato sempre nettamente differenziabile dall'assorbimento ottenuto da tessuti fogliari sani.

Tab. 1 - Valori medi di assorbimento (a 410 nm) del succo estratto da bulbi in riposo vegetativo e da foglie di aglio infetti e sani (valori medi ottenuti da 100 campioni)

Bulbi infetti	= 1.04	Foglie infette	= 0.84
Bulbi virus-esenti	= 0.02	Foglie virus-esenti	= 0.02

Per quanto riguarda la concentrazione del virus nei vari bulbilli che costituiscono il bulbo essa è risultata omogenea (Tab. 2).

TAB. 2 - Valori medi di assorbimento (a 410 nm) del succo estratto da bulbilli infetti (valori medi ottenuti da 50 bulbi)

Bulbilli	esterni	= 0,95
"	intermedi	= 0,95
"	interni	= 0,92

Il tampone di estrazione additivato del solo Na-EDTA ha provocato valori medi di assorbimento dei campioni infetti inferiori rispetto al tampone di estrazione con ovoalbumina e con polivinilpirrolidone, nella determinazione

del potyvirus. Infine la diluizione limite del succo estratto da tessuti infetti, in grado di provocare una reazione positiva è risultata pari a 1:512 sia quando questo veniva diluito in tampone di estrazione che quando per la sua diluizione si utilizzava l'estratto fogliare di piante sane.

Relativamente allo stato sanitario di piante provenienti da apici meristematici, i controlli effettuati su oltre 400 agli alla terza moltiplicazione, in ambiente protetto nei confronti degli afidi, hanno evidenziato la presenza dell'1,7% di piante infette. Per contro non è stata riscontrata alcuna infezione in un altro gruppo di piante durante la prima moltiplicazione vegetativa dopo il risanamento.

I risultati di questo lavoro indicano la validità della tecnica ELISA nella diagnosi del potyvirus in esame. La maggiore concentrazione di virus nei bulbi rispetto alla parte aerea consente, in un programma di controllo sanitario, di utilizzare questa parte di pianta anche durante il riposo vegetativo.

La presenza di campioni infetti riscontrata nel materiale in moltiplicazione in ambiente protetto nei confronti degli afidi può essere imputata ad infezioni non rilevate dai controlli precedentemente effettuati al microscopio elettronico con la tecnica del "leaf dip" per la bassa concentrazione delle particelle virali, senza potere escludere la possibilità di infezioni naturali accidentali da parte di afidi durante la moltiplicazione delle piante.

Per quanto riguarda l'elevata diluizione limite di reazione dell'antisiero, e quindi la sua capacità di determinare basse concentrazioni di virus è un dato utile per avviare una precisa strategia di controllo di questa infezione, in particolare per accertarne il livello nelle coltivazioni per la produzione di bulbi da seme. In tale caso è possibile, infatti, saggiare gruppi di piante come un unico campione secondo metodiche statistiche ormai ampiamente utilizzate (Moran et al., 1985) senza che l'affidabilità del metodo venga compromessa, potendo così ampliare di gran lunga il numero delle piante che si possono esaminare e, pertanto, l'attendibilità del controllo stesso. La tecnica immunoenzimatica indiretta per la sua minore

specificità, rispetto, ad esempio, al metodo DAS-ELISA offre il vantaggio di potere evidenziare eventuali ceppi del virus in esame con caratteristiche sierologiche diverse e può così consentire il controllo di materiale d'importazione.

Bibliografia

BERTACCINI A., MARANI F., BORGIA M. (1986). Shoot-tip culture of different garlic lines for virus elimination. Riv.Ortoflorofrutt.It., 70, 97-105.

EDWARDS M.L., COOPER J.I. (1985) . Plant virus detection using a new form of indirect ELISA. J.Virol. Methods, 11, 309-319.

KATUL L., MAKKOUK K.M. (1987). Occurrence and serological relatedness of five cucurbit potyviruses in Libanon and Syria. Phytopath.medit., 26, 36-42.

MARANI F., BERTACCINI A. (1980). Risanamento dell'infezione virale dell'aglio mediante coltura di apici meristematici. Atti Giornate Fitopatologiche, Suppl. 2, 23-30.

MARANI F., BERTACCINI A. (1983). Virosi delle liliacee ortive: cipolla, aglio, porro. L'Italia agricola, 1, 104-111.

MARANI F., BERTACCINI A., OTTOLINI P., ROSSI V. (1986). Il risanamento da virus dell'aglio "Bianco Piacentino": possibilità di certificazione. Atti Giornate Fitopatologiche 1, 461-478.

MARANI F., PIZZI L., OTTOLINI P., CHIUSA B. (1988). Osservazioni sul campionamento agronomico di cloni di aglio piacentino da seme virus-esenti. Atti Convegno Tecnico Inter. "Risanare e moltiplicare l'aglio da seme", Monticelli d'Ongina, 1° ottobre 1988, 20-22.

MESSIEAN C.M., YUCEF-BENKADA M., BEYRIES A. (1981). Rendement potential et tolérance aux virus chez l'ail (Allium sativum). Agronomie, 1 (9), 795-762.

MORAN J.R., WILSON J.M., GARRETT R.G., SMITH P.R. (1985). ELISA indexing of commercial carnations for carnation mottle virus using a urease-antibody conjugate. Plant Pathology, 34, 467-471.

MOHAMED N.A., YOUNG B.R. (1981). Garlic yellow streak virus, a potyvirus infecting garlic in New Zeland. Ann.Appl.Biol., 97, 65-74.

TACCONI R. (1986). Certificazione sanitaria dell'"Aaglio bianco piacentino". Inf.tore Fitopatologico, 4, 19-20.