

INFEZIONI DA VIRUS IN PIANTE OFFICINALI. VI CONTRIBUTO INDAGINE IN TRENTINO

M.G. BELLARDI, L. TAMANINI, C. RATTI, A. BENNI

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali - Patologia Vegetale
Alma Mater Studiorum. Università di Bologna. Via F. Re, 8. 40126 (BO)
bellardi@imolanet.com

RIASSUNTO

È stata eseguita un'indagine epidemiologica al fine di individuare le infezioni virali più frequenti su piante officinali coltivate in Trentino. Le specie esaminate facevano parte dei campi sperimentali dell'ISFA (Istituto Sperimentale per l'Assestamento Forestale e per l'Alpicoltura; Villazzano, Trento). Sono stati prelevati campioni fogliari sintomatici di: *Armoracia rusticana* P.Gaertner (giallume internervale, bollosità ed aree necrotiche), *Chrysanthemum parthenium* Bernh. (giallume internervale, necrosi marginali ed arricciamento del lembo), *Echinacea angustifolia* DC. (nanismo della pianta, bollosità, clorosi e mosaico), *Ruta graveolens* L. (giallume). Il virus del mosaico del cetriolo (CMV) è stato individuato nelle prime tre specie; il virus del mosaico della rapa (TuMV) in *R. graveolens*. La presenza di questi due virus è stata diagnosticata applicando le tecniche di "routine" (saggi biologici, microscopia elettronica, PAS-ELISA, IME, GLAD) e quelle molecolari di RT-PCR. È la prima segnalazione di CMV in *A. rusticana* e *C. parthenium*, e di TuMV in *R. graveolens*.

Parole chiave: virus del mosaico del cetriolo, virus del mosaico della rapa, *Armoracia rusticana*, *Chrysanthemum parthenium*, *Echinacea angustifolia*, *Ruta graveolens*

SUMMARY

VIRUS INFECTIONS ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS. VI REPORT SURVEY IN TRENTINO REGION

During an epidemiological survey carried out in Trentino region (Northern Italy) to identify the most frequently virus infections occurring in medicinal and aromatic plants, cucumber mosaic virus (CMV) and turnip mosaic virus (TuMV) have been found in crops located at the ISFA (Istituto Sperimentale per l'Assestamento Forestale e per l'Alpicoltura; Villazzano, Trento). CMV infected *Armoracia rusticana* P.Gaertner (yellow leaves and necrotic areas), *Chrysanthemum parthenium* Bernh. (interveinal yellow areas, necrosis and leaf crinkle) and *Echinacea angustifolia* DC. (stunting, chlorosis and mosaic on the leaves); TuMV infected *Ruta graveolens* L. (yellow leaves). CMV and TuMV presence was detected in all these species by applying virological tests (mechanical inoculations on herbaceous plants, electron microscopy, PAS-ELISA, IME, GLAD, RT-PCR). This is the first report of CMV infecting *A. rusticana* and *C. parthenium*, and of TuMV infecting *R. graveolens*.

Key words: cucumber mosaic virus, turnip mosaic virus, *Armoracia rusticana*, *Chrysanthemum parthenium*, *Echinacea angustifolia*, *Ruta graveolens*

INTRODUZIONE

In Italia, le ricerche epidemiologiche sulle infezioni virali delle piante officinali sono iniziate nel 1992 ed hanno riguardato principalmente coltivazioni allestite in Emilia-Romagna:

Giardini di Officinali, campi sperimentali, aziende specializzate in questo settore ed anche Orti Botanici universitari come quello di Parma e di Bologna (Bellardi *et al.*, 2002; Bellardi e Rubies-Autonell, 2003). Solo sporadicamente sono stati eseguiti controlli virologici su campioni vegetali provenienti da altre regioni: la valeriana (*Valeriana officinalis* L.), ad esempio, è stata riscontrata infetta dal virus dell'avvizzimento maculato del pomodoro (*tomato spotted wilt virus*: TSWV) in Liguria (Bellardi *et al.*, 1999) e da quelli del mosaico del cetriolo (*cucumber mosaic virus*: CMV) e dell'avvizzimento della fava (*broad bean wilt virus*: BBWV) in Trentino-Alto Adige (Bellardi *et al.*, 1998).

Se perciò è possibile oggi, a distanza di oltre dieci anni, avere un quadro esauriente dello "stato sanitario" in materia di virus delle piante officinali coltivate in Emilia-Romagna, quasi nulla si sa relativamente ad altre regioni. È per questo motivo che si è ritenuto utile estendere le indagini ad altre zone di produzione iniziando dal Trentino, e precisamente dalle coltivazioni dell'ISAFa (Istituto Sperimentale per l'Assessment Forestale e per l'Alpicoltura, Villazzano, Trento) dove, nel 1998 era stata individuata la valeriana infetta da CMV e BBWV. Ricordiamo che presso l'ISAFa è allestita una collezione di circa un centinaio di piante officinali e che vengono periodicamente effettuate prove agronomiche su specie diverse. Sempre presso l'ISAFa, ha sede la Federazione Italiana Produttori Piante Officinali (FIPPO) a cui sono iscritti una sessantina di soci sparsi in tutta la penisola.

Di seguito vengono riportati i risultati dell'indagine condotta in Trentino che ha portato alla individuazione di alcuni "nuovi" ospiti naturali di CMV e del virus del mosaico della rapa (*turnip mosaic virus*: TuMV).

MATERIALI E METODI

Reperimento dei campioni

I campioni sottoposti ad indagine virologica sono stati prelevati nell'estate-autunno 2002, nel corso di tre sopralluoghi presso i campi sperimentali di piante officinali dell'ISAFa. In particolare, sono state esaminate le seguenti specie che presentavano sintomi a probabile eziologia virale sulla parte epigea: *A Armoracia rusticana* P.Gaertner, *Chrysanthemum parthenium* Bernh., *Echinacea angustifolia* DC., *Ruta graveolens* L.

– *A Armoracia rusticana* (famiglia: *Brassicaceae*; Rafano, Cren, Barbaforte): i primi sintomi sono stati notati nel mese di settembre. Le foglie, malformate e bollose, evidenziavano giallume internervale e necrosi localizzate (figura 1).

– *Chrysanthemum parthenium* (famiglia: *Compositae*; Tanaceto, Partenio): alcune piante, localizzate a gruppi lungo la fila, mostravano sulle foglie ingiallimento internervale più o meno marcato, necrosi del margine ed arricciamento del lembo (figura 2).

– *Echinacea angustifolia* (famiglia: *Compositae*; Echinacea): le piante, con vistoso nanismo, producevano foglie bollose e caratterizzate da clorosi e mosaico (figura 3). I sintomi sono stati osservati da settembre a novembre.

– *Ruta graveolens* (famiglia: *Rutaceae*; Ruta): circa il 50% delle piante mostrava un evidente giallume sulle foglie, soprattutto quelle poste nella parte distale del fusto; i fiori erano asintomatici (figura 4).

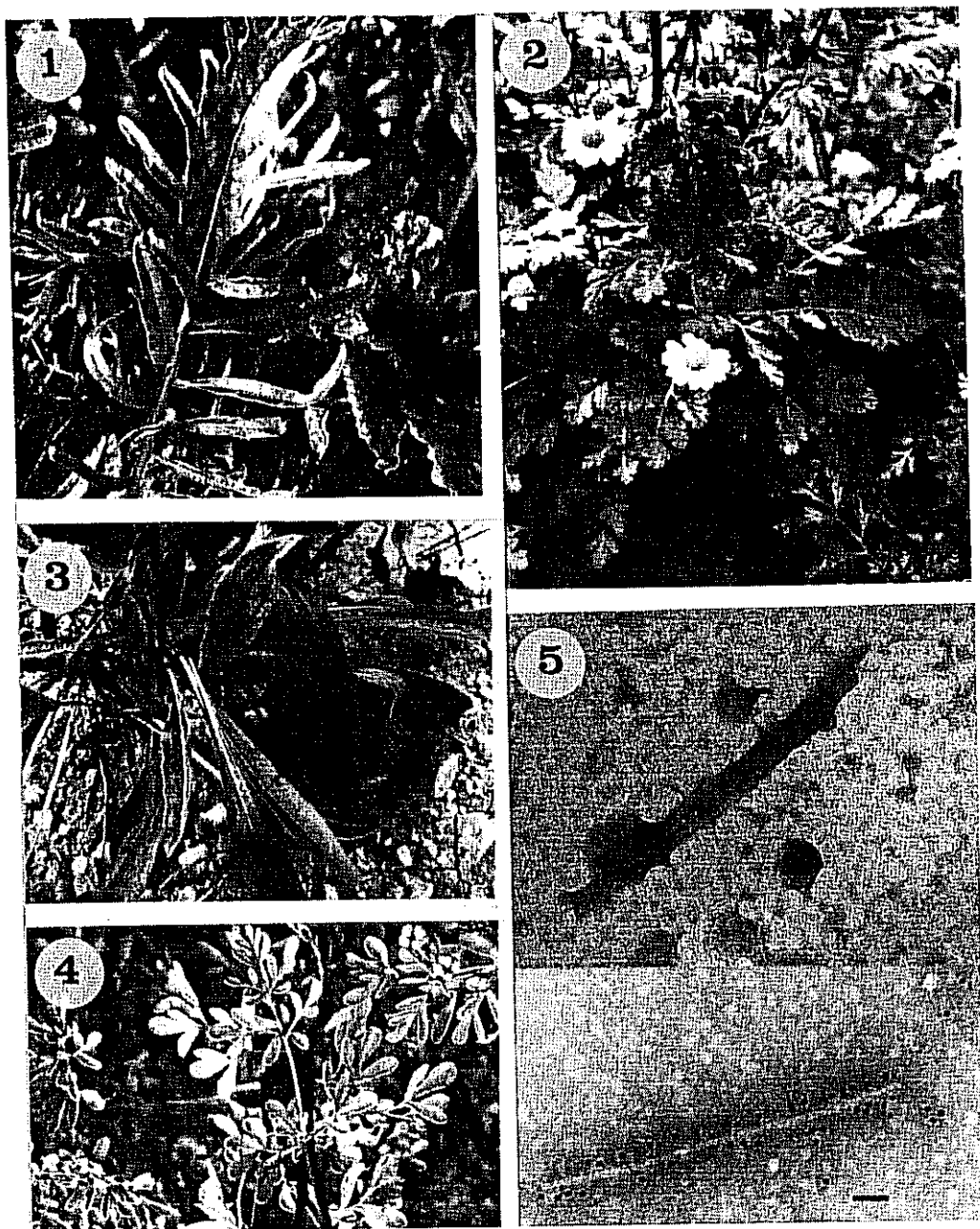


Figura 1 – *A. rusticana*: le foglie evidenziano giallume e necrosi. Figura 2 – *C. parthenium*: la pianta mostra ingiallimento internervale. Figura 3 – *E. angustifolia*: la pianta, con vistoso nanismo, produce foglie con clorosi e mosaico. Figura 4 – *R. graveolens* mostra un evidente giallume sulle foglie. Figura 5 – TuMV (nella ruta) identificato mediante ISEM e GLAD (barra = 80 nm).

Indagini virologiche

Tutti i campioni sono stati utilizzati per eseguire inoculazioni meccaniche su piante di saggio appartenenti alle seguenti famiglie botaniche: *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Compositae*, *Borraginaceae*, *Brassicaceae*, *Hypericaceae*, *Lamiaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Apiaceae*, *Valerianaceae*. Porzioni di foglie sintomatiche sono state macerate in presenza di tampone fosfato 0,01M, pH 7, addizionato del 3% di PEG (glicole polietilenico, p.m. 6.000).

Osservazioni al microscopio elettronico Philips CM10 (80 KV) sono state eseguite utilizzando porzioni fogliari di ciascun campione e delle piante inoculate mostranti sintomi (metodo del *leaf-dip*). A tale scopo il succo cellulare è stato contrastato con PTA (acido fosfotungstico) all'1%.

Per i saggi sierologici è stata applicata la tecnica ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) "indiretta", impiegando la proteina A (PAS-ELISA) (Edwards e Cooper, 1985). Nei saggi immunoenzimatici sono stati utilizzati i sieri contro i seguenti virus: CMV (PVAS 30) e virus dell'aspermia del pomodoro (*tomato aspermy virus*: TAV) (PVAS 24) (forniti dalla American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, USA); BBWV sierotipo I e II (forniti dall'Istituto di Fitoviologia Vegetale, CNR, Torino); virus del mosaico dell'erba medica (*alfalfa mosaic virus*: AMV) (disponibile presso il DiSTA-Patologia Vegetale).

Ulteriori saggi sierologici sono stati eseguiti applicando le tecniche di immunomicroscopia elettronica (IME) (*decoration*) (Milne e Luisoni, 1977) e di immunomarcatura con particelle di oro colloidale (*gold-labelled antibody decoration*: GLAD), di 15 nm di diametro, coniugate con siero di capra anti-coniglio (Lin, 1985). In questi saggi IME e GLAD sono stati utilizzati i sieri contro i seguenti virus: TuMV, virus della maculatura nervale del garofano (*carnation vein mottle virus*: CVMV), virus del mosaico giallo del fagiolo (*bean yellow mosaic virus*: BYMV) e virus del mosaico giallo dello zucchini (*zucchini yellow fleck virus*: ZYFV) (forniti dall'Istituto di Fitoviologia Vegetale, CNR, Torino); virus della maculatura del bidens (*bidens mottle virus*: BMV) (PVAS 105), BYMV (PVAS 368), virus A della patata (*potato virus A*: PVA) (PVAS 266) e virus Y della patata (*potato virus Y*: PVY) (PVAS 50a) (forniti dall'ATCC, USA); virus della rottura di colore del tulipano (*tulip breaking virus*: TBV) (fornito dallo Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, U.K.); virus del mosaico dell'alstroemeria (*alstroemeria mosaic virus*: AIMV) e virus del mosaico della fresia (*freesia mosaic virus*: FMV) (forniti dal Bulb Research Centre, Lisse, the Netherlands).

La determinazione dell'infezione virale in *C. parthenium* è stata effettuata mediante indagine RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*: reazione di trascrizione inversa abbinata alla reazione a catena della polimerasi) impiegando coppie di "primers" specifiche per CMV (tabella 1). Il protocollo applicato per l'estrazione di RNA è stato quello indicato da Logemann *et al.* (1987).

Tabella 1 – Sequenza nucleotidica dei primers utilizzati per la reazione di RT-PCR; Accession number: sequenza su cui sono stati disegnati i "primers"

Nome	Sequenza (5' – 3')	Nucleotidi (Accession number)
CMV3R	AGT GAC TTC AGG CAG T	1986- <u>2001</u> (Y16926)
CMV3F1	GCT TGT TTC GCG CAT TCA	<u>1566</u> - 1583 (Y16926)

RISULTATI

A seguito delle indagini virologiche è risultato:

- *A. rusticana*: è stato isolato ed identificato (in PAS-ELISA) CMV che è stato trasmesso a 11 delle 24 specie erbacee inoculate distribuite in 10 famiglie botaniche.
- *C. parthenium*: è stato isolato ed identificato (in PAS-ELISA e mediante RT-PCR) CMV che è stato trasmesso a 6 delle 20 specie inoculate appartenenti a 9 famiglie botaniche.
- *E. angustifolia*: è stato isolato ed identificato (in PAS-ELISA) CMV che ha infettato 13 delle 25 specie inoculate distribuite in 10 famiglie botaniche.
- *R. graveolens*: non è stata isolata meccanicamente nessuna entità virale. Nei *leaf-dip* eseguiti con succo fogliare di ruta ed osservati al microscopio elettronico erano presenti particelle virali filamentose lunghe circa 750 nm tipiche dei *Potyvirus*. A seguito dell'applicazione della tecnica IME (*decoration*) si è ottenuta una debole reazione di "decorazione" delle particelle utilizzando i sieri anti-BMV ed anti-ZYFV, ed una marcata "decorazione" con l'anti-TuMV. L'applicazione della tecnica GLAD ha consentito di identificare con esattezza il potyvirus presente in ruta come un isolato di TuMV (figura 5).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questa indagine mette in evidenza l'elevata frequenza di infezioni virali anche su specie officinali coltivate in Trentino. Il virus maggiormente frequente risulta essere CMV, a conferma di quanto già in precedenza riscontrato in Emilia-Romagna (Bellardi e Rubies-Autonell, 2003).

La sintomatologia osservata su *A. rusticana*, ed associata alla presenza di CMV interessava almeno il 50% delle piante in coltivazione. Da quanto si apprende dalla Letteratura questo virus non era mai stato riscontrato in precedenza su rafano, pianta che viene invece indicata quale ospite naturale del virus del mosaico del tabacco (*tabacco mosaic virus*: TMV) (Schmelzer e Schmidt, 1997) e di TuMV, virus chiamato in passato anche con il nome di *horseradish mosaic virus*: virus del mosaico del rafano. Le indagini virologiche eseguite sui campioni sintomatici raccolti in Trentino non hanno però messo in evidenza la presenza di questi due virus, ma del solo CMV.

Relativamente a *C. parthenium*, dalla Letteratura non risultano segnalazioni di infezioni virali naturali su questa specie, mentre tra i fitoplasmi, AY (*aster yellows*: giallume dell'astro) è stato individuato su piante caratterizzate da giallume fogliare in Canada (Wang e Hiruki, 2001). Nei saggi PAS-ELISA, il succo fogliare di *Nicotiana benthamiana* L. (specie infettata meccanicamente con succo fogliare di *C. parthenium*) ha dato risultato positivo in corrispondenza dei sieri anti-CMV ed anti-TAV (entrambi *Cucumovirus*). Le correlazioni sierologiche tra questi due virus non sono state ancora del tutto chiarite. Alcuni Autori concordano con il fatto che CMV e TAV siano correlati sierologicamente; altri, invece, hanno verificato come CMV sia sierologicamente correlato a TAV "ceppo B" (isolato pomodoro), ma non ai tre isolati "aspermy" provenienti dal genere *Chrysanthemum*, proponendo per questi ultimi il nome "*chrysanthemum aspermy virus*" (Bowen e van Zaayen, 1995). TAV, responsabile di nanismo e deformazioni sul "*Chrysanthemum*" coltivato è quindi comunemente chiamato "*chrysanthemum aspermy virus*". Per avere la conferma che effettivamente nei campioni prelevati di *C. parthenium* fosse presente CMV e non TAV, è stata condotta una RT-PCR utilizzando una coppia di "primers" disegnata sulle zone di sequenze nucleotidiche più conservate di CMV, e che ha consentito di identificare senza ombra di dubbio il virus isolato come CMV.

Anche in *E. angustifolia* è stata riscontrata la presenza di CMV che infettava il 50% delle piante in coltivazione. Questo virus era già stato individuato in Italia su questa specie nel 1997, in coltivazioni dell'Emilia-Romagna (Bellardi e Rubies-Autonell, 2003).

Per quanto riguarda infine la ruta, nei campioni esaminati con sintomi di giallume sulle foglie, è stata riscontrata la presenza di un potyvirus che però non è stato trasmesso alle piante erbacee inoculate. La sua identificazione come un isolato di TuMV, è avvenuta mediante l'applicazione delle tecniche sierologiche abbinate alla microscopia elettronica IME e GLAD. Questo ritrovamento costituisce il primo caso di infezione naturale da TuMV in *R. graveolens*.

CMV, riscontrato su due "nuovi" ospiti naturali (rafano e partenio) si conferma quale virus più diffuso e pericoloso, non solo per le piante di notevole interesse agronomico (orticole, ornamentali, fruttiferi, foraggere, ecc.), ma anche per le specie officinali che soltanto negli ultimi anni stanno suscitando un certo interesse di mercato. Parallelamente, con la ruta, si allunga anche la lista degli ospiti naturali di TuMV, virus segnalato in questi ultimi anni su altre specie officinali, quali *Hesperis matronalis* L., *Polygonum fagopyrum* L. e *Digitalis lanata* L., coltivate in Emilia-Romagna (Bellardi e Rubies-Autonell, 2003).

La "standardizzazione" del processo produttivo di droghe e fitocomplessi non può essere disgiunto da quello di ordine sanitario. È quindi necessario, per potere salvaguardare la qualità del nostro prodotto, applicare nei confronti delle malattie ad eziologia virale le misure di controllo e prevenzione più efficienti ed in tempo debito.

LAVORI CITATI

- BELLARDI M.G., RUBIES-AUTONELL C., VENDER C., 1988. *Valeriana officinalis*, nuovo ospite naturale del virus dell'avvizzimento della fava (BBWV). *Atti Giornate Fitopatologiche 1998*, 789-794.
- BELLARDI M.G., VICCHI V., ROGGERO P., DELLAVALLE G., LISA V., 1999. *Valeriana officinalis*, nuovo ospite naturale di tomato spotted wilt virus. *Informatore fitopatologico*, 49(3), 47-49.
- BELLARDI M.G., RUBIES-AUTONELL C., BERTACCINI A., 2002. Infezioni da virus e fitoplasmi in piante officinali in Emilia-Romagna: V contributo. Orti Botanici. *Informatore fitopatologico*, 52(12), 52-56.
- BELLARDI M.G., RUBIES-AUTONELL C., 2003. Update on virus diseases of medicinal and aromatic plants in Italy. *Agricoltura Mediterranea*, 133, 1-6.
- BOUWEN I., VAN ZAAYEN A., 1995. Chrysanthemum. In: *Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops* (Ed. J. Wiley and Sons, Chichester, West Sussex, UK), 396-408.
- EDWARDS M.L., COOPER J.I., 1985. Plant virus detection using a new form of indirect ELISA. *Journal of Virological Methods*, 11, 309-313.
- LIN N., 1985. Gold-IgG complexes improve the detection and identification of viruses in leaf dip preparations. *Journal of Virological Methods*, 8, 181-231.
- LOGEMANN J., SCHELL J., WILLMITZER L., 1987. Improved method for the isolation of RNS from plant tissue. *Analytical Biochemistry*, 163, 16-20.
- MILNE R.G., LUISONI E. 1977. Rapid immunoelectron microscopy for virus preparation methods. *Virology*, 6, 265-281.
- SCHMELZER K., SCHMIDT H.E., 1997. Das Tabakmosaik. In: *Pflanzliche Virologie 2* (Ed. K. Schmelzer e D. Spaar; Akademie Verlag, Berlino, Germania), 294-301.
- WANG K., HIRUKI C., 2001. Use of heteroduplex mobility assay for identification and differentiation of phytoplasmas in the aster yellows group and the clover proliferation group. *Phytopathology*, 91, 546-552.