

RISANAMENTO DELL'AGLIO ROSSO DI SULMONA E VERIFICA MEDIANTE RT-PCR DELL'ESENZIONE DA VIRUS IN MERICLONI OTTENUTI DOPO MICROPROPAGAZIONE

D. TABANELLI⁽³⁾, D. D'ASCENZO⁽¹⁾, I. SANTILLI⁽¹⁾, A. RICCI⁽⁴⁾,
R. DI PRIMIO⁽²⁾, A. BERTACCINI⁽³⁾

⁽¹⁾ Servizio Fitosanitario - A.R.S.S.A. - Regione Abruzzo - via Nazionale, 38 Villanova (PE)

⁽²⁾ Laboratorio di micropropagazione "Apice Pianta" via Foro, 112 Ripa Teatina (CH)

⁽³⁾ DiSTA, Patologia Vegetale, Alma Mater Studiorum Via Fanin 44 (BO) - Univ. Bologna

⁽⁴⁾ A.R.S.S.A - Regione Abruzzo- Sede Decentrata via Q. Sella, Sulmona (AQ)

opm.pe@rgn.it

RIASSUNTO

L'aglio rosso di Sulmona rappresenta un prodotto ad elevato grado di tipicità, molto apprezzato dai mercati nazionali ed esteri. Poiché negli ultimi anni si è assistito ad una progressiva degenerazione sanitaria del materiale di moltiplicazione che ha determinato una forte riduzione delle rese produttive ed uno scadimento qualitativo, si è avviato un programma di risanamento nei confronti dei virus OYDV, GCLV, LYSV e degli *Allexivirus* ritenuti i principali responsabili di questo deperimento. I meristemi apicali di bulbilli selezionati in campo seguendo parametri prestabiliti, sono stati sottoposti a micropropagazione e i germogli ottenuti sono stati saggati con tecniche immuno-enzimatiche. Campioni prelevati dai mericlioni risultati negativi sono stati ulteriormente saggati mediante RT-PCR; i mericlioni risultati virus esenti sono stati micropropagati ed allevati su substrati sterili in serra di ambientamento a prova di insetti per l'ottenimento di bulbilli di prima moltiplicazione.

Parole chiave: aglio, risanamento, virus, micropropagazione, RT-PCR

SUMMARY

VIRUS ELIMINATION FROM ROSSO DI SULMONA GARLIC AND RT-PCR CONTROLS ON MERICLONES OBTAINED AFTER MICROPROPAGATION

The "Rosso di Sulmona" garlic is a typical product very appreciated in national and international markets. In the last years it was observed a progressive degeneration of propagative materials that induced a severe reduction of its production and quality, a sanitation program to eliminate OYDV, GCLV, LYSV, and *Allexivirus* was started. Meristem tip-derived shoots taken garlic bulbs selected in the fields were micropropagated and tested with immunoenzymatic techniques. Samples derived from mericlones resulted negative were further tested in RT-PCR. Virus free shoots, after further micropropagation, were re-established in sterile soil under insect proof greenhouse to produce small bulbs.

Key words: garlic, virus elimination, micropropagation, RT-PCT

INTRODUZIONE

L'aglio rosso di Sulmona (*Allium sativum* L. biotipo "rosso di Sulmona") è un prodotto tipico i cui caratteri sono stati definiti in sede d'iscrizione al Registro Nazionale delle varietà (DM 2803/92). La coltura si estende su circa 150 ettari interessando più di 200 aziende produttrici e vede nella Valle Peligna (AQ) il suo principale areale di coltivazione. L'elevato contenuto in olii essenziali quali diallilsolfuro-DS e diallilsolfuro-DSS che conferiscono, tra l'altro, l'aroma e sapore piccante, lo rendono particolarmente adatto anche per l'utilizzo in campo farmaceutico ed erboristico. Nel corso degli anni si è assistito ad una progressiva

degenerazione sanitaria del materiale di moltiplicazione che ha determinato la riduzione delle rese produttive ed il peggioramento delle caratteristiche qualitative (Lot *et al.*, 1998). Tra le problematiche fitosanitarie individuate, oltre al *Ditylenchus dipsaci*, nematode degli steli e dei bulbi, sono stati riscontrati i virus OYDV, *Onion yellow dwarf virus* (virus del nanismo giallo della cipolla) GCLV, *Garlic common latent virus* (virus latente dell'aglio), LYSV, *Leek yellow stripe virus* (virus della striatura gialla del porro) ed gli *Allexivirus* (complesso virale trasmesso da acari). L'elevata diffusione di questi ultimi (praticamente presenti in maniera endemica) li fanno ritenere implicati nel processo di degenerazione (Bertaccini *et al.*, 2002).

Al fine di salvaguardare questa pregiata produzione si è ritenuto opportuno avviare un programma di risanamento nei confronti dei suddetti virus (Marani e Bertaccini, 1983). Esso ha riguardato la selezione massale in campo di piante ritenute idonee rispetto ad una serie di parametri prestabiliti quali: grandezza e conformazione del bulbo, tunicatura serrata dei bulbi e dei bulbilli, assenza di bulbilli non tunicati, colorazione rossa intensa ed aroma. I meristemi apicali dei bulbilli delle piante selezionate in campo sono stati sottoposti a micropropagazione e le piantine ottenute sono state saggiate con tecniche immunoenzimatiche (DAS-ELISA) impiegando antisieri commerciali. Le linee risultate negative sono state ulteriormente saggiate con tecniche molecolari (RT-PCR); quelle risultate sane sono state moltiplicate *in vitro* e successivamente allevate su substrati sterili in serra di ambientamento per l'ottenimento di bulbilli di prima moltiplicazione.

MATERIALI E METODI

La fase di micropropagazione ha avuto inizio con la separazione dei bulbilli tunicati, la rimozione delle tuniche esterne ed un abbondante lavaggio con acqua corrente. Successivamente, sotto cappa a flusso laminare si è provveduto a sterilizzare i bulbi a cui erano state rimosse le tuniche e con l'ausilio di un microscopio stereoscopico è stato effettuato il prelievo del meristema apicale, contenuto nella parte basale del bulbillo, di dimensioni molto ridotte (0,5-1 mm). L'apice prelevato è stato inserito in provette con substrato agarizzato. Sono state utilizzate formulazioni diverse messe a punto per le varie fasi di inizio coltura e, successivamente, di moltiplicazione e ingrossamento del bulbo.

Campioni prelevati da tutte le linee micropropagate (mericlioni) sono stati saggiati preliminarmente mediante saggi DAS-ELISA. Le reazioni enzimatiche sono state valutate alla lunghezza d'onda di 405 nm, dopo incubazione al buio e a temperatura ambiente utilizzando un fotometro Multiskan MCC 340. Ad ogni determinazione il campione veniva replicato tre volte in micropiastre che includevano la necessaria serie di controlli. I campioni saggiati venivano considerati infetti quando i valori di assorbanza risultavano superiori di almeno due volte la media dei controlli sani.

L'estrazione degli acidi nucleici per identificare i virus presenti nei 29 campioni di aglio rosso di Sulmona risultati negativi all'indagine sierologica ha previsto l'applicazione del seguente protocollo: sono stati impiegati 50-100 mg di tessuto fogliare fresco o conservato a -20°C che sono stati macinati in una provetta Eppendorf in azoto liquido con trapano manuale sterile. Sono quindi stati aggiunti 200 ml di Trizol (Invitrogen) a 4°C e si è mescolato energicamente aggiungendo poi 800 ml di Trizol ed incubando per 5 minuti a temperatura ambiente. Previa aggiunta di 200 ml di cloroformio ed agitazione per ottenere una sospensione uniforme si è poi centrifugato a 4°C per 15 minuti a 1200 rpm ("revolutions per minutes"). La fase acquosa soprannatante in cui sono contenuti gli acidi nucleici viene prelevata, riposta in ghiaccio e viene quindi effettuata la precipitazione degli acidi nucleici aggiungendo 500 µl di isopropanolo glaciale e lasciando riposare per 10 minuti a temperatura ambiente. Si centrifuga

quindi a 4°C per 10 minuti a 12000 rpm e si ottiene così un pellet successivamente purificato con 500 µl di etanolo glaciale al 75% e risospeso in 25 µl acqua deionizzata e sterilizzata.

Il campione così ottenuto e conservato a -20°C è stato utilizzato come "template" per la retrotrascrizione dell'RNA virale applicando la tecnica RT-PCR. Per la retrotrascrizione sono stati usati due tipi di primer diversi: i random-esameri, che possono retrotrascrivere tutti i tipi di RNA essendo costituiti da una miscela di esameri a sequenza casuale ed il primer IGP296, che risulta essere specifico per i virus appartenenti al genere degli *Allexivirus* (Botti *et al.*, 2003). La reazione di retrotrascrizione per ottenere il c-DNA è resa possibile partendo da 2 µg di RNA ottenuto con l'estrazione, ai quali vengono aggiunti 0,8 µl di primer (200 mM se si tratta di IGP296, 500 µg/ml se si tratta di random primer) ed acqua sterile fino a raggiungere un volume di 13 µl. La miscela viene lasciata in incubazione per 5 minuti a 70°C. Viene quindi aggiunto, per ogni campione analizzato, un mix di reazione composto da 5 µl di buffer (Promega M-MLV Reverse Transcriptase 5X reaction buffer M531A); 5 µl di d-NTP 2,5 mM; 0,5 µl di RT (Promega M-MLV Reverse Transcriptase 200 U/ml); 2,5 µl di acqua sterile. In ogni reazione di retrotrascrizione sono state impiegate, come controllo, anche miscele prive di acido nucleico, sostituito da acqua. La retrotrascrizione è stata effettuata lasciando i campioni per 1 ora a 42°C, per il primer IGP296, o a 37°C, per i random-esameri. Le susseguenti reazioni di PCR hanno visto l'impiego di primers specifici, in particolare si sono impiegati primers per l'identificazione dei virus appartenenti al genere degli *Allexivirus*, IGP295/296 (Botti *et al.*, 2003), per OYDV, G1, per LYSV, G2 e per GCLV, G3 (Shiboleth *et al.*, 2001). Il mix di reazione utilizzato conteneva 4-5 µl di c-DNA; buffer 2,5 µl (Polymed Buffer 10X); dNTP 2 µl (2,5 mM); -MgCl₂ 0,75 µl (Polymed 50mM); primers 0,5 µl (20 mM) ciascuno; Taq 0,16 µl (Polymed 5U/ml Polytaq); acqua sterile fino a 25 µl di volume finale. Sono stati utilizzati due cicli di PCR diversi a seconda dei primers utilizzati: per IGP295/296 si è utilizzato quello descritto da Botti *et al.* (2003) mentre con tutti gli altri primers, si è modificato il ciclo indicato da Shiboleth *et al.* (2001) come segue: 2 minuti a 94°C seguiti da 33 cicli, ciascuno caratterizzato da 30 secondi, a 94°C, 50°C, 72°C ed 1 ciclo finale di 5 minuti a 72°C.

Gli ampliconi ottenuti in seguito alla reazione di PCR utilizzando i primers G1, G2 e G3 sono stati visualizzati su gel di agarosio all'1%, mentre quelli ottenuti utilizzando IGP 295/296 sono stati visualizzati su gel di agarosio al 2%. La visualizzazione della reazione, in entrambi i gel, è stata eseguita con colorazione di bromuro di etidio all'1% in acqua e con osservazione e foto mediante fotocamera digitale del DNA reso fluorescente dagli ultravioletti del transilluminatore ad una lunghezza d'onda di 312 nm.

L'analisi del DNA amplificato è stata completata sottoponendolo a digestione con enzimi di restrizione. Miscele di 20 ml contenenti circa 2 µg di DNA amplificato, un enzima di restrizione nel suo tampone ed acqua, sono state lasciate incubare a 37°C od a 65°C (a seconda dell'enzima) per almeno 16 ore in bagnomaria seguendo lo schema seguente.

| Virus | Primers | Enzimi di restrizione |
|-------|---------|-----------------------------------|
| OYDV | G1 | <i>TaqI, TruI, Tsp5091</i> |
| LYSV | G2 | <i>TaqI, HinfI, MseI, RsaI</i> |
| GCLV | G3 | <i>Tsp5091, DdeI, HpaII, Tail</i> |

Per evidenziare le bande derivate dalla digestione enzimatica è stata effettuata l'elettroforesi verticale in gel di poliacrilammide al 5% in tampone TBE. La colorazione in bromuro di etidio e la fotografia agli ultravioletti (come indicato per i gel di agarosio) hanno permesso di osservare i risultati e di compararli fra loro.

E' stato inoltre effettuato il sequenziamento di alcuni campioni, scelti fra quelli che presentavano polimorfismi all'analisi RFLP utilizzando la chimica del "Big Dye Terminator" risultati infetti da OYDV e da GCLV.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I saggi sierologici sono stati effettuati su 91 mericlioni, per 29 di essi (31,9%) si sono avuti segnali negativi, e pertanto sono stati avviati all'analisi molecolare. 20 campioni (22,0%) sono risultati affetti dal virus LYSV, 30 pari al 33,0% positivi al GCLV e 12 pari al 13,2% positivi al virus OYDV. In 22 casi (24,2%) si sono riscontrate infezioni complesse.

I saggi RT-PCR effettuati sui mericlioni negativi hanno permesso di evidenziare la presenza di tutti i virus ricercati. 20 dei 29 campioni (69%) sono risultati comunque esenti da tutti i virus, mentre alcuni dei germogli saggiati sono risultati infetti da GCLV (3/29), da LYSV (3/29), da OYDV (4/29) e da *Allexivirus* (2/29), in alcuni casi i virus erano presenti in infezione mista (tabella 1).

Tabella 1 – Risultati dei saggi di RT-PCR

| Partita | Data saggio | IGP | Data saggio | G1 | G2 | Data saggio | G3 |
|-------------------|-------------|-----|-------------|----|----|-------------|----|
| AAV1 | 25.10.02 | - | 25.10.02 | - | - | 28.10.02 | + |
| X2 ₁ | 25.10.02 | - | 25.10.02 | - | - | 28.10.02 | - |
| X3 ₂ | 25.10.02 | - | 25.10.02 | - | - | 28.10.02 | - |
| CEP19 | 25.10.02 | - | 25.10.02 | - | - | 28.10.02 | - |
| AAV23 | 25.10.02 | - | 25.10.02 | - | - | 28.10.02 | - |
| 87 ₁ | 25.10.02 | - | 25.10.02 | - | - | 28.10.02 | - |
| 87 ₂ | 25.10.02 | - | 25.10.02 | - | - | 28.10.02 | - |
| 88 ₁ | 25.10.02 | - | 25.10.02 | - | - | 28.10.02 | - |
| 90 ₁ | 25.10.02 | - | 25.10.02 | + | - | 28.10.02 | - |
| 98 ₁ | 25.10.02 | - | 25.10.02 | - | - | 28.10.02 | - |
| 98 ₂ | 25.10.02 | - | 25.10.02 | + | - | 28.10.02 | - |
| 114 | 25.10.02 | + | 25.10.02 | - | + | 28.10.02 | + |
| 116 | 25.10.02 | - | 25.10.02 | - | - | 28.10.02 | - |
| 116 ₂ | 25.10.02 | - | 25.10.02 | + | - | 28.10.02 | + |
| 132 | 25.10.02 | - | 25.10.02 | + | + | 28.10.02 | - |
| 88 ₂ | 14.01.03 | - | 14.01.03 | - | - | 15.01.03 | - |
| 95 ₁ | 14.01.03 | - | 14.01.03 | - | - | 15.01.03 | - |
| 95 ₂ | 14.01.03 | - | 14.01.03 | - | + | 15.01.03 | - |
| 134 ₁ | 14.01.03 | + | 14.01.03 | - | - | 15.01.03 | - |
| AAV ₄ | 14.01.03 | - | 14.01.03 | - | - | 15.01.03 | - |
| AAV ₇ | 14.01.03 | - | 14.01.03 | - | - | 15.01.03 | - |
| AAV ₁₉ | 14.01.03 | - | 14.01.03 | - | - | 15.01.03 | - |
| AAV ₂₄ | 14.01.03 | - | 14.01.03 | - | - | 15.01.03 | - |
| CEP ₂ | 14.01.03 | - | 14.01.03 | - | - | 15.01.03 | + |
| CEP ₄ | 14.01.03 | - | 14.01.03 | - | - | 15.01.03 | - |
| CEP ₈ | 14.01.03 | - | 14.01.03 | - | - | 15.01.03 | - |
| CEP ₁₀ | 14.01.03 | - | 14.01.03 | - | - | 15.01.03 | - |
| CEP ₁₆ | 14.01.03 | - | 14.01.03 | - | - | 15.01.03 | - |
| GAP ₂₉ | 14.01.03 | - | 14.01.03 | - | - | 15.01.03 | - |

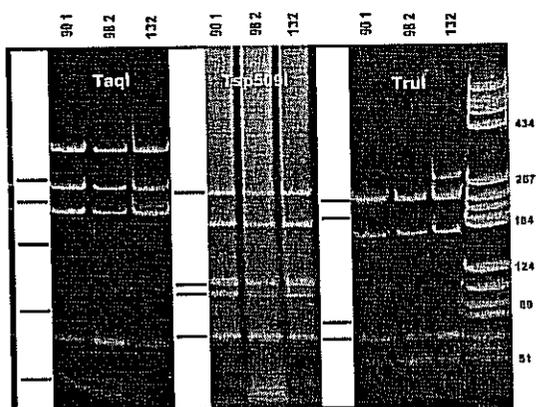


Figura 1 – Foto agli ultravioletti di gel di poliacrilamide al 5% in cui si vedono le bande ottenute dalla restrizione enzimatica della variante molecolare di OYDV individuata in aglio rosso di Sulmona (Abruzzo) (lunghezza delle bande del marker in nucleotidi). A sinistra di ogni foto digestioni virtuali del ceppo israeliano AF071226 (GenBank). Abbreviazioni come in tabella 1.

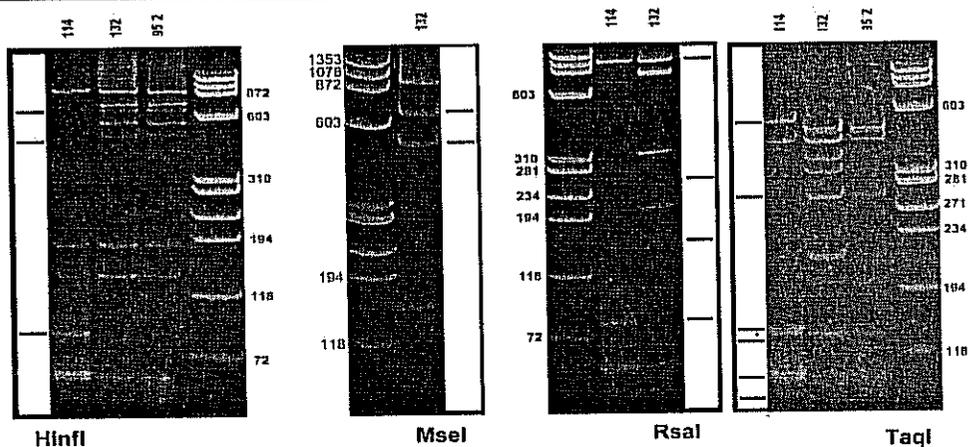


Figura 2 – Foto agli ultravioletti in cui si vedono i profili di restrizione ottenuti rispettivamente con *MseI* (a), *RsaI* (b), *Hinfl* (c), *TaqI* (d) di amplificati di LYSV da campioni di aglio rosso di Sulmona, a destra di ogni foto digestioni virtuali del ceppo giapponese D11118 (GenBank). Abbreviazioni come in tabella 1.

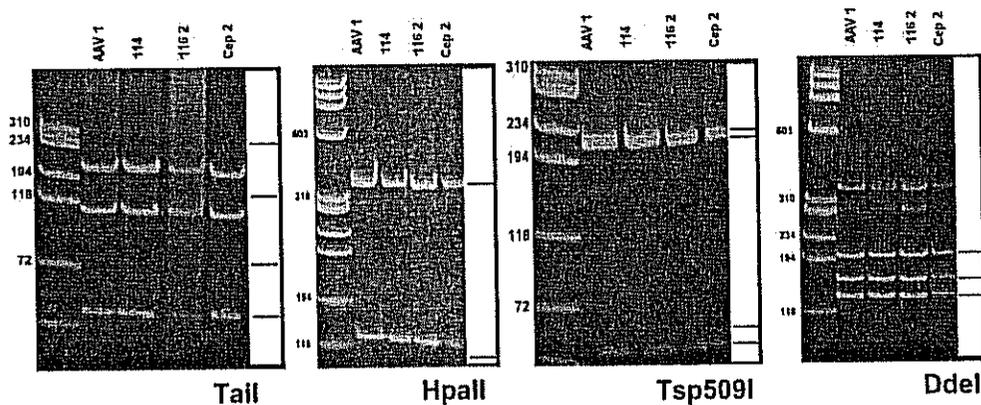


Figura 3 – Profili di restrizione con diversi enzimi ottenuti dagli amplificati di GCLV dei campioni di aglio rosso di Sulmona, a destra di ogni foto digestioni virtuali del ceppo giapponese AB004566.1 (GenBank). Abbreviazioni come in tabella 1.

L'analisi RFLP degli amplificati ottenuti con i primers specifici per OYDV non ha portato ad ottenere i profili attesi dalla restrizione enzimatica virtuale del ceppo AF071226 con gli enzimi *TaqI* e *TruI*, profili attesi si sono ottenuti invece con *Tsp509I* (figura 1); il sequenziamento evidenziato un'omologia del 98% con il medesimo ceppo. L'analisi RFLP degli amplificati ottenuti con i primers per LYDV hanno permesso di evidenziare che un campione aveva profili di restrizione diversi dagli altri due e che nessuno comunque mostrava i profili attesi dalla restrizione virtuale del ceppo D11118 (figura 2). I profili osservati per gli ampliconi di GCLV sono risultati uniformi: con *Tsp509I* e *TaqI* si è ottenuto il profilo atteso che invece non è stato osservato con *DdeI* e *HpaII* (figura 3). Il sequenziamento ha permesso di individuare un'omologia del 95% con AB004566.1. E' stato possibile evidenziare che i ceppi virali individuati nei campioni analizzati si discostano dai ceppi di controllo in maniera non troppo rilevante (a parte l'isolato di GCLV che appare omogeneo dal punto di vista molecolare ma abbastanza divergente dal ceppo di riferimento come sequenza complessiva).

Le piante con bulbo ingrossato provenienti da linee sicuramente sane sono state ambientate in serra a prova di insetti (screen-house) su terriccio molto drenante e successivamente poste all'aperto per la fase di indurimento. Tutte le piantine ambientate all'aperto sono state trapiantate, in novembre, in vasetti singoli, nuovi e con terriccio torboso drenato con pomice.

La raccolta effettuata in estate ha dato ottimi risultati con indici di moltiplicazione in media di 6-7 bulbilli per pianta. Su alcune piante non è stata rimossa l'infiorescenza allo scopo di ottenere bulbilli aerei da usare per ulteriori prove. I bulbilli di prima moltiplicazione, così ottenuti, sono stati, alla fine del 2003, trapiantati in pieno campo, in siti isolati da altre colture, per l'ottenimento di bulbilli da destinare alla commercializzazione per seme. In queste coltivazioni verranno effettuati ulteriori accertamenti diagnostici volti a verificare il mantenimento della sanità della semente.

CONCLUSIONI

Le tecniche diagnostiche e di micropropagazione hanno consentito di ottenere soddisfacenti risultati in termini di risanamento rispetto ai virus in questione. L'interesse mostrato da Associazioni e agricoltori spingono a continuare in questo lavoro per rilanciare, attraverso un miglioramento sanitario, produttivo e di qualità, una tradizionale coltivazione locale che, negli ultimi anni, aveva mostrato un forte declino.

LAVORI CITATI

- BERTACCINI A., BOTTI S., DRADI G., FOGHER C., TABANELLI D., GUADAGNINI M., PREVIATI A., 2002. Produzione di aglio micropropagato esente da virus. *VI Giornate scientifiche SOI, Spoleto 23-25 aprile, Atti Workshop*, 131-132.
- BOTTI S., D'URSO F., DAVINO S., BERTACCINI A., BRANCA F., DAVINO M., 2003. Individuazione di virus mediante RT-PCR in coltivazioni di aglio in Sicilia. *Informatore Fitopatologico*, 53(4), 46-49.
- LOT H., CHOVELON V., SOUCHE S., DELECOLLE B., 1998. Effects of Onion Yellow Dwarf and Leek Yellow Stripe Viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. *Plant Disease*, 82, 1381-1385.
- MARANI F., BERTACCINI A., 1983. Risanamento dell'infezione virale dell'aglio mediante coltura di apici meristemati. *Atti Giornate Fitopatologiche*, suppl., 2: 23-30.
- SHIBOLETH Y.M., GAL-ON A., KOCH M., RABINOWITZ H.D., SALOMON R., 2001. Molecular characterization of Onion yellow dwarf virus (OYDV) infecting garlic (*Allium sativum* L.) in Israel: Thermotherapy inhibits virus elimination by meristem tip culture. *Ann. Appl. Biol.*, 138, 187-195.