

## INFEZIONI DA VIRUS IN PIANTE OFFICINALI IN EMILIA- ROMAGNA

M.G. BELLARDI, C. RUBIES-AUTONELL, M. MONTANARI, M. TURINA

Istituto di Patologia Vegetale, Via F. Re, 8, 40126 Bologna

### Riassunto

È stata condotta in Emilia-Romagna un'indagine preliminare per individuare le infezioni virali che con più frequenza si presentano nelle coltivazioni di piante officinali causando riduzioni qualitative e quantitative del prodotto, fresco e/o secco. A tale scopo, sono stati eseguiti sopralluoghi nel Giardino Officinale di Casola-Valsenio (RA) nel 1992, 1993 e 1995, reperendo campioni con sintomi fogliari di probabile eziologia virale. Sono risultati infetti da uno o più virus: *Galega officinalis*, *Levisticum officinale*, *Hesperis matronalis*, *Thymus vulgaris*. Il virus del mosaico del cetriolo (CMV) è stato isolato da *G. officinalis* (risultata contemporaneamente infetta anche da un secondo virus costituito da particelle filamentose) e da *H. matronalis* (infetta contemporaneamente da un potyvirus). Il virus del mosaico del sedano (CeMV) è stato per la prima volta individuato in *L. officinale*; un virus non ancora indentificato è stato isolato da *T. vulgaris*. I virus più diffusi risultano quelli trasmessi da afidi. Dato che non è consentito utilizzare prodotti chimici nelle coltivazioni di piante officinali, le infezioni devono essere prevenute scegliendo, ad esempio, per l'allestimento degli impianti aree montane, piovose e ventilate ove è più difficile che avvengano infestazioni da afidi vettori di questi patogeni.

**Parole chiave:** piante officinali, virosi, diagnosi, prevenzione.

### Summary

#### VIRUS INFECTIONS ON OFFICINAL PLANTS IN EMILIA-ROMAGNA

A preliminary survey was carried out in Emilia-Romagna to identify the most frequently occurring viral infections in officinal plants which affect the quality and quantity of the fresh and/or dry product. For this purpose, inspections were made at the Officinal Garden at Casola-Valsenio (Ravenna) in 1992, 1993 and 1995. Samples were collected with leaf symptoms of probable viral origin. One or more viruses were found in *Galega officinalis*, *Levisticum officinale*, *Hesperis matronalis*, *Thymus vulgaris*. Cucumber mosaic virus (CMV) was isolated from *G. officinalis* (that was also infected by a second virus consisting of filamentous particles) and from *H. matronalis* (also infected by a potyvirus). Celery mosaic virus (CeMV) was found for the first time in *L. officinale*; an unidentified virus was isolated from *T. vulgaris*.

The most widespread viruses were those transmitted by aphids. Since the use of chemical products is not permitted in the cultivation of officinal plants, the infections must be prevented, for example, by growing them in well-ventilated mountain areas with plenty of rain where there is less likelihood of infestations by the aphid vectors of these pathogens.

**Key words:** officinal plants, virus disease, diagnosis, prevention.

## Introduzione

In questi ultimi anni, in Italia, è andata progressivamente aumentando la richiesta di prodotti e di piante officinali da parte delle industrie farmaceutiche, liquoristiche, alimentari e cosmetiche e l' "erboristeria" in senso lato ha assunto un sempre maggiore interesse da parte del "grosso pubblico". Al tempo stesso, però, al vistoso incremento dei consumi, non ha fatto seguito un aumento della coltivazione; anzi, il volume della produzione erboristica italiana è andata via via riducendosi in relazione, soprattutto, alla netta e progressiva flessione della raccolta, considerata non sufficientemente remunerativa.

Una delle cause prioritarie di questa situazione è senz'altro l'elevato costo della mano d'opera, per cui si preferisce importare piante officinali da Paesi stranieri, qualitativamente inferiori a quelle nazionali, ma fortemente competitive in termini di costi.

Nel complesso quadro della scarsa produttività delle coltivazioni di piante officinali, si inseriscono le malattie dovute a funghi, batteri, virus, insetti, nematodi ed acari, malattie che influiscono negativamente sulla produzione sia quantitativamente che qualitativamente. Ciò nonostante, nel nostro Paese gli studi specifici sulle diverse sindromi che queste piante possono manifestare, sono stati condotti in maniera tutt'altro che sistematica e continuativa. Ad esempio, per quanto riguarda le infezioni virali, le notizie sono scarse e frammentarie, frutto di ricerche eseguite negli anni '50-'60 e sul finire degli anni '80 (Gigante, 1955; Lovisolo e Luisoni, 1963-1964; Pisi e Bellardi, 1987 e 1988).

Alla luce di quanto sopra, si è ritenuto necessario riprendere le indagini sulle infezioni virali delle piante officinali al fine di individuare quelle maggiormente frequenti e causa di cambiamenti qualitativi e quantitativi del prodotto finale, sia fresco che secco, destinato al consumo diretto e/o a trasformazioni industriali. Di seguito vengono riportati i risultati delle indagini preliminari in tal senso condotte.

## Materiali e metodi

### *-Reperimento dei campioni-*

Nel periodo estivo-autunnale del 1992 ed in quello primaverile-estivo del 1994 e 1995 sono stati eseguiti diversi sopralluoghi nel Giardino Officinale di Casola-Valsenio (RA), ove vengono coltivati numerosi generi e specie di piante officinali ed aromatiche destinate sia al consumo fresco che secco. Si tratta di una vasta area, posta in zona collinare (250 m s.l.m.), organizzata in terrazzamenti suddivisi in lotti destinati alla produzione delle singole officinali, a cui si affiancano il semenzaio ed il vivaio (fase pre-trapianto).

L'accurato esame visivo delle piante nei vari stadi di crescita ha permesso di individuare alcuni casi di probabile eziologia virale, e precisamente:

*Levisticum officinale* ("sedano di montagna": *Umbelliferae*). Alcune giovani piante si presentavano di taglia ridotta, meno vigorose, e con foglie caratterizzate da maculature clorotiche e/o un mosaico giallo sul lembo. La coltivazione era stata ottenuta utilizzando seme prodotto nello stesso Giardino Officinale nel 1991.

*Passiflora* sp. (*Passifloraceae*). Le foglie manifestavano ingiallimento a livello delle nervature e mosaico giallo.

*Polygonum fagopyrum* ("grano saraceno": *Polygonaceae*). Le foglie erano caratterizzate da un vistoso mosaico giallo sul lembo.

*Galega officinalis* (*Leguminosae*). Le foglie manifestavano un mosaico o delle striature gialle (Fig. 1).

*Melilotus* sp. (*Leguminosae*). Le foglie mostravano un mosaico giallo.

*Hesperis matronalis* ("viola matronale": *Cruciferae*). Le piante erano di taglia ridotta, mentre le foglie si presentavano bollose, malformate e caratterizzate da un mosaico clorotico molto accentuato (Fig. 2).

*Thymus vulgaris* (*Labiatae*). Le piante, poco vigorose, producevano foglie clorotiche.

#### -Indagini virologiche-

Tutti i campioni sono stati utilizzati per eseguire inoculazioni meccaniche su piante erbacee di saggio appartenenti alle seguenti famiglie botaniche: *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Cruciferae*, *Labiatae*, *Leguminosae*, *Solanaceae*, *Umbelliferae*. Porzioni di foglie sintomatiche sono state macerate in presenza di tamponi (t.) differenti come molarità ed aggiunta di antiossidanti: t. fosfato 0,1M, pH 7,0; t. fosfato 0,01M, pH 7,0, addizionato del 3% di PEG (glicole polietilenico, p.m. 6.000); t. fosfato 0,1M, pH 7,0, contenente 0,1% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>; t. fosfato 0,1M, pH 7,2, contenente 0,2% DIECA.

Osservazioni al microscopio elettronico Philips CM10 (80 KV) sono state eseguite utilizzando porzioni fogliari di ciascun campione e delle piante erbacee inoculate e mostranti sintomi (metodo del 'leaf-dip'). A tale scopo il succo cellulare è stato contrastato con acido fosfotungstico (PTA) all'1%, tamponato a pH 7,0, o con acetato di uranile (AU) al 2%.

A seconda degli esiti degli inoculi eseguiti e delle osservazioni dei preparati al microscopio elettronico, si è proceduto applicando alcune delle seguenti metodologie:

-Inclusione in resina Spurr di piccole porzioni di tessuto fogliare (Rubies-Autonell e Valle-ga, 1987). Le sezioni ultrasottili, ottenute con lama di vetro con ultramicrotomo Reichert Om-U3, colorate con AU (2,5% in alcool etilico 95°) e citrato di piombo, sono state osservate al microscopio elettronico.

-Saggi sierologici. Sono state applicate le tecniche di immunomicroscopia elettronica (IME) ('decoration') (Milne e Luisoni, 1977) e quella di immunomarcatura con particelle di oro colloidale ('gold-labelled antibody decoration': GLAD), di 15 nm di diametro, coniugate con siero di capra anti-coniglio (Biorad) (Lin, 1984).

-Saggi immunoenzimatici. Sono state applicate le tecniche ELISA ('enzyme-linked immunosorbent assay') "diretta" (DAS-ELISA) (Clark e Adams, 1997) ed "indiretta" (PAS-ELISA), impiegando la proteina A (Edwards e Cooper, 1985).

## Risultati

In quattro dei sette campioni esaminati e mostranti i sintomi descritti e' stata accertata la presenza di uno o più virus.

*L. officinale*. Gli inoculi eseguiti macerando porzioni fogliari in presenza di t. contenente 3% di PEG, hanno consentito di infettare *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa* (lesioni locali cloro-necrotiche dopo circa 7 giorni) e *Nicotiana clevelandii* (infezione latente). Le osservazioni al microscopio elettronico dei preparati ('leaf-dip') sia di *L. officinale* che delle piante erbacee inoculate ed infettatesi, hanno evidenziato la presenza di particelle virali filamentose, lunghe circa 750 nm. L'applicazione delle tecniche sierologiche IME ('decoration') e GLAD utilizzando un siero anti-CeMV ('celery mosaic virus': virus del mosaico del sedano) (fornito dall'Istituto di Fitovirologia Applicata, Torino), ha permesso di identificare il potyvirus come un isolato di CeMV (Fig. 3).

*G. officinalis*. A seguito degli inoculi eseguiti con succo fogliare in presenza di t. contenente 1% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, sono risultate infette: *C. amaranticolor* e *C. quinoa* (lesioni locali puntiformi, necrotiche, dopo 4-5 giorni), *Nicotiana tabacum* cv Samsun e cv White Burley, *N. glutinosa*, *Cucumis sativus*, *Lycopersicum esculentum*, *Gomphrena globosa*, piante che hanno manifestato sintomi sistemici di grave intensità (mosaico, bollosità, deformazione fogliare, ecc.). Le osservazioni al microscopio elettronico dei preparati di succo grezzo di *G. officinale* ha evidenziato la presenza di particelle virali filamentose, di lunghezze variabili comprese fra 730 e 870 nm. Nei preparati ottenuti utilizzando succo fogliare delle piante erbacee inoculate e mostranti sintomi, non sono state osservate simili particelle.

Il virus trasmesso mediante inoculazione meccanica alle piante di saggio è stato identificato come un isolato di CMV ('cucumber mosaic virus': virus del mosaico del cetriolo), applicando la tecnica DAS-ELISA ed utilizzando il corredo Loewe, Biochemica GmbH, Germania.

*H. matronalis*. Una prima serie di inoculi ha permesso di infettare *C. amaranticolor*, *C. quinoa* e *C. murale* (lesioni locali cloro-necrotiche dopo 6-8 giorni) e, successivamente, *Pisum sativum* (infezione latente). Le osservazioni al microscopio elettronico di succo fogliare di *H. matronalis* e delle piante inoculate ed infettatesi ('leaf-dip'), hanno evidenziato la presenza di particelle virali filamentose di circa 750 nm di lunghezza; le osservazioni, sempre al microscopio elettronico, di sezioni ultrasottili di tessuto di *H. matronalis* incluso in resina, hanno fatto rilevare la presenza di particelle virali filamentose, inclusi citoplasmatici tipici dei potyvirus (Fig. 4) ed anche la presenza di aggregati cristallini di particelle virali sferoidali.

Saggi immunoenzimatici PAS-ELISA eseguiti utilizzando quindici antisieri di altrettanti potyvirus sono risultati negativi. In particolare sono stati saggiati i sieri contro i seguenti virus (v.): BYMV ('bean yellow mosaic virus': v. del mosaico giallo del fagiolo); ISMV ('iris severe mosaic virus': v. del mosaico grave dell'iris); PSbMV ('pea seed-born mosaic virus': v. del mosaico del pisello nato da seme); TEV ('tobacco etch virus': v. etch del tabacco); HBV ('henbane mosaic virus': v. del mosaico dell'henbane); CVMV ('carnation vein mottle virus': v. della maculatura nervale del garofano); IMMV ('iris mild mosaic virus': v. del mosaico leggero dello iris); PVY ('potato virus Y': v. Y della patata); BCMV

('bean common mosaic virus': v. del mosaico comune del fagiolo); FreMV ('freesia mosaic virus': v. del mosaico della fresia); BMV ('bidens mosaic virus': v. del mosaico del bidens); ZYMV ('zucchini yellow mosaic virus': v. del mosaico giallo dello zucchini); ZYFV ('zucchini yellow fleck virus': v. della macchiatura gialla dello zucchini); WMV-1 e WMV-2 ('watermelon virus-1' e '-2': v. 1 e v. 2 del cocomero) (antisieri di varia provenienza; Bertaccini *et al.*, 1994). L'applicazione della tecnica sierologica IME ('decoration') utilizzando un siero anti-TuMV ('turnip mosaic virus': v. del mosaico della rapa) (fornito dall'Istituto di Fitoviologia Applicata, Torino) ha consentito di identificare il potyvirus come un isolato di TuMV.

Una seconda serie di inoculi, utilizzando sempre materiale originale di *H. matronalis*, ha permesso l'isolamento di un virus a particelle sferoidali che ha infettato una gamma di piante erbacee del tutto simile a quella riportata per CMV-*G. officinalis*. L'applicazione della tecnica immunoenzimatica PAS-ELISA ha confermato che il secondo individuato su viola matronale era anch'esso un isolato di CMV. Esito negativo è stato ottenuto saggiando, con la stessa tecnica, un siero anti-TNV ('tobacco necrosis virus': virus della necrosi del tabacco) fornito dall'Istituto di Fitoviologia Applicata, Torino.

*T. vulgaris*. Gli inoculi eseguiti utilizzando il t. addizionato del 2% di DIECA, hanno permesso d'infettare *C. amaranticolor*, *C. quinoa* e *C. murale* (anulature locali cloronecrotiche dopo circa 20 giorni). Le osservazioni al microscopio elettronico di succo grezzo di timo e delle piante inoculate e mostranti sintomi, hanno evidenziato la presenza di particelle filamentose, lunghe mediamente 436 nm.

Nelle sezioni ultrasottili di timo e *C. amaranticolor* sintomatico, sono stati osservati aggregati di particelle virali presenti nel citoplasma delle cellule del mesofillo, il più delle volte posti accanto a cloroplasti internamente degenerati e vescicolati Rubie-Autonell e Turina, 1994). I saggi PAS-ELISA con sieri contro carlavirus e potexvirus hanno dato esito negativo. In particolare sono stati utilizzati i sieri, di varia provenienza, contro: ACaV ('alstroemeria carlavirus': carlavirus dell'alstroemeria); CLV ('carnation latent virus': v. latente del garofano); ChVB ('chrysanthemum virus B': v. B del crisantemo); NLV ('narcissus latent virus': v. latente del narciso); NeLV ('nerine latent virus': v. latente della nerina); ShLV ('shallot latent virus': virus latente dello scalogno); ALSV ('artichoke latent S virus': v. S latente del carciofo); AVM ('artichoke virus M': v. M del carciofo); PVM ('potato virus M': v. M della patata); PVS ('potato virus S': v. S della patata); CYMV ('clover yellow mosaic virus': v. del mosaico giallo del trifoglio); NMV ('narcissus mosaic virus': v. del mosaico del narciso); NeVX ('nerine virus X': v. X della nerina); PVX ('potato virus X': v. X della patata); TVX ('tulip virus X': v. X del tulipano).

Per quanto riguarda i restanti tre campioni: *Passiflora* sp., *P. fagopyrum* e *Melilotus* sp., sia gli inoculi meccanici che le osservazioni al microscopio elettronico hanno dato esito negativo.

### Discussione

Da queste prime indagini condotte in Emilia-Romagna emerge come molte piante officinali evidenzino spesso sintomi dovuti probabilmente a virus la cui trasmissione a piante

erbacee di saggio è resa difficile dalla presenza nei tessuti di principi attivi ed.essenze capaci di interferire con l'inoculazione.

Di particolare interesse risulta l'individuazione di CMV su *G. officinalis*, pianta che, come si evidenzia dalle osservazioni al microscopio elettronico ('leaf-dip'), era contemporaneamente infetta da almeno un secondo virus costituito da particelle filamentose, ma che non è stato trasmesso a piante di saggio. Si tratta, in ogni caso, della prima segnalazione di virus su *G. officinalis*, dato che non sono stati fino ad oggi riportati altri casi di infezioni su questa leguminosa; studi specifici sono stati invece condotti in Finlandia sulla resistenza di *G. orientalis* all'infezione artificiale di sei virus, fra cui CMV (Valkonen, 1993).

Anche in *H. matronalis* è stata riscontrata un'infezione mista dovuta ancora a CMV ed a TuMV. Dalla Letteratura si apprende che questa crucifera è ospite naturale di CMV, TuMV e di RMV ('ribgrass mosaic virus': virus del mosaico della piantaggine; *Plantago* spp.) (Ford *et al.*, 1988). Il potyvirus trasmesso a *C. amaranticolor*, *C. quinoa* e *P. sativum* dai campioni di viola matronale raccolti a Casola-Valsenio è risultato essere quindi TuMV, virus che notoriamente infetta un'ampia gamma di piante erbacee, fra cui alcune amarantacee e numerose solanacee; il nostro isolato sembra, al momento, infettare invece un numero limitato di piante. Occorrono quindi ulteriori approfondimenti per meglio caratterizzarlo.

Per quanto riguarda il sedano di montagna, ricordiamo che questa ombrellifera era già stata segnalata ospite naturale di ArMV ('arabis mosaic virus': virus del mosaico dell'arabis) (von Wolf e Schmelzer, 1972). Alla luce delle indagini eseguite L. officinale può essere considerato un nuovo ospite anche di CeMV. Questo isolato appare molto simile a quello individuato su *Petroselinum crispum* in Germania ed in Italia (Bellardi *et al.*, 1991).

Il virus a particelle allungate presente su timo e trasmesso a chenopodiacee, in base alle modificazioni indotte nei tessuti infetti osservati al microscopio elettronico, potrebbe appartenere ai carlavirus (Koenig, 1982). Anche in questo caso occorrono ulteriori analisi virologiche per definirne l'identità.

Nel complesso, appare evidente come le infezioni più frequenti siano dovute a potyvirus e cucumovirus, trasmessi da afidi. La scelta del luogo di coltivazione è quindi fondamentale al fine della prevenzione delle virosi comunemente diffuse da questi vettori. È noto, infatti, che ventosità, altitudine e precipitazioni, sono fra i principali fattori ambientali da considerare quando si devono allestire impianti di specie suscettibili a virus trasmessi da afidi, in quanto la loro entità può favorire o meno la presenza di quest'ultimi (esempio tipico è quello delle patate da seme prodotte in zone montane). A nostro avviso, le condizioni climatiche ad altitudini medio-basse non sono fra le più idonee per la prevenzione delle infestazioni da afidi e quindi delle infezioni da virus da questi trasmessi. In Italia molti terreni posseggono invece tale prerogativa (soprattutto come altitudine e piovosità) e potrebbero essere impiegati con molteplici vantaggi: recupero del paesaggio e ripresa dell'erboristeria, favorendo quindi la produzione nazionale e, di conseguenza, riducendo l'importazione da Paesi stranieri.

#### Ringraziamenti

Si ringrazia il Sig. Sauro Biffi ("Giardino Officinale" di Casola-Valsenio, Ravenna) per l'aiuto fornito nel reperimento dei campioni e la costante collaborazione.

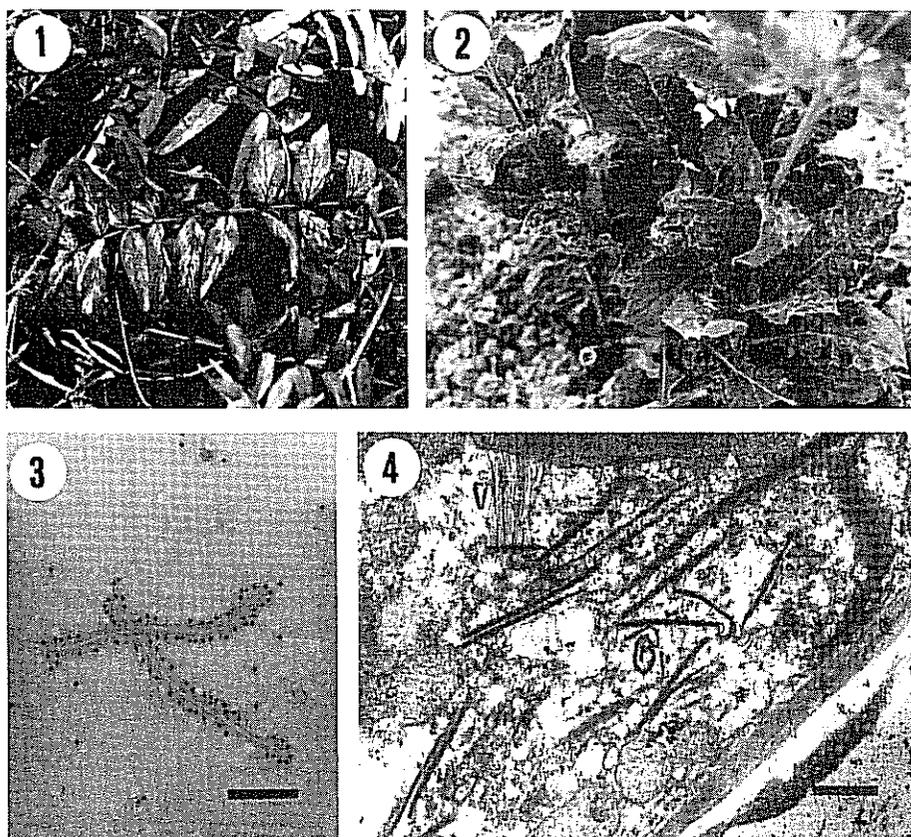


Fig. 1. *Galega officinalis*, infetta da CMV e da almeno un secondo virus costituito da particelle filamentose, le cui foglie mostrano un mosaico giallo.

Fig. 2. *Hesperis matronalis* infetta da CMV e da un potyvirus: la taglia è ridotta e le foglie, bollose e malformate, evidenziano un mosaico clorotico.

Fig. 3. Fotografia al microscopio elettronico di particelle di CeMV in succo di *Levisticum officinale* a cui è stata applicata la tecnica GLAD, con l'impiego di oro colloidale. Barra = 250 nm.

Fig. 4. Fotografia al microscopio elettronico di una sezione ultrasottile di tessuto fogliare di *H. matronalis*: si notano gli inclusi tipici dei potyvirus ed un fascio di particelle virali (v). Barra = 500 nm.

Lavori citati

- BELLARDI M.G., BERTACCINI A., LUGARESI C. (1991). Un grave deperimento del prezzemolo riccio sa deme. *Informatore fitopatologico*, 41(5), 62-64.
- BERTACCINI A., BELLARDI M.G., MARANI F., RABITI A. (1994). A potyvirus infecting *Chrysanthemum frutescens*. *Acta Horticulturae*, 377, 107-114.
- CLARK M.F., ADAMS A.N. (1977). Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
- EDWARDS M.L., COOPER J.I. (1985). Plant virus detection using a new form of indirect ELISA. *Journal Virological Methods*, 11, 309-313.
- FORD R.E., BECZNER L., HAMILTON R.I. (1988). Turnip, cucumber, and ribgrass mosaic viruses isolated from *Hesperis matronalis* in British Columbia. *Plant Disease*, 72, 101-106.
- GIGANTE R. (1955). Nota preliminare sopra un mosaico osservato sulla *Salvia sclarea*. *Bollettino Stazione Patologia Vegetale*, 13, 67-77.
- KOENIG R. (1982) - Carlavirus Group. *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses*, 259, 4 pp.
- LIN N. (1984). Gold-IgG complexes improve the detection and identification of viruses in leaf dip preparations. *Journal Virological Methods*, 8, 181-190.
- LOVISOLO O., LUISONI E. (1963-1964). Nuove virosi della *Mentha piperita* L. e presenza in questa pianta di un inibitore di virus. *Accademia delle Scienze di Torino*, 98, 213-225.
- MILNE R.G., LUISONI E. (1977). Rapid immunoelectron microscopy for virus preparation methods. *Virology*, 6, 265-281.
- PISI A., BELLARDI M.G. (1987). Sull'importanza delle indagini fitopatologiche nella standardizzazione della qualità delle erbe officinali. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, 126, 45-48.
- PISI A., BELLARDI M.G. (1988). Indagine fitopatologica su piante officinali ed aromatiche in Italia. *Informatore fitopatologico*, 39(10), 57-62.
- VALKONEN J.P.T. (1993). Resistance to six viruses in the legume goat's rue (*Galega orientalis* Lam.). *Annals of Applied Biology*, 123, 309-314.
- VON WOLF P., SCHMELZER K. (1972). Untersuchungen an Virus Krankheiten der Umbelliferen. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene*, 2, 665-672.
- RUBIES-AUTONELL C., TURINA M. (1994). A filamentous virus isolated from thyme (*Thymus vulgaris*) in Italy. Proceedings of IX Congress of The Mediterranean Phytopathological Union, 525-528.
- RUBIES-AUTONELL C., VALLEGA V. (1987). Observations on a mixed soil-borne wheat mosaic virus and wheat spindle streak mosaic virus infection in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Journal of Phytopathology*, 119, 111-121.