ATTI *Giornate Fitopatologiche*, 2012, 2, 671-674

SEGNALAZIONE DEL VIROIDE DEL TUBERO FUSIFORME DELLA PATATA IN *SOLANUM JASMINOIDES* NELLA REGIONE MARCHE

S. MUROLO[1], S. TALEVI[2], L. LANDI[1], G. ROMANAZZI[1]
[1]Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, Università Politecnica delle Marche - Via Brecce Bianche, 60131 Ancona
[2]ASSAM Servizio Fitosanitario Regionale, Regione Marche, Via Dell'Industria, 1 – 60027 Osimo Stazione (AN)
g.romanazzi@univpm.it

RIASSUNTO

Il viroide del tubero fusiforme della patata (*Potato spindle tuber viroid* – PSTVd) è un patogeno in grado di determinare gravi perdite di produzione per le solanacee e quindi annoverato tra gli organismi considerati da quarantena. Si trasmette per seme, tramite tuberi, per polline e soprattutto per contatto, attraverso attrezzi contaminati. E' stato rinvenuto in diverse regioni italiane, prevalentemente in piante ornamentali, nelle quali determina infezioni latenti. Nella primavera 2011 è stato realizzato un monitoraggio in alcuni vivai marchigiani per verificare la presenza di PSTVd in piante di *Solanum jasminoides*, trovate infette dal viroide in altre regioni italiane. Le analisi biomolecolari hanno evidenziato la presenza di PSTVd in campioni di *S. jasminoides* anche nelle Marche. Tale ritrovamento impone il monitoraggio della situazione fitosanitaria di altri ospiti, quali ad esempio il pomodoro, già rinvenuto infetto da PSTVd in Liguria. Vista l'importanza per l'economia regionale del settore florovivaistico, si è proceduto alla sensibilizzazione dei produttori e, nei casi di accertamento del patogeno, alla selezione di piante madri sane da cui prelevare il materiale di propagazione.
Parole chiave: quarantena, RT-PCR, vivaio

SUMMARY

REPORT ON *POTATO SPINDLE TUBER VIROID* INFECTION OF *SOLANUM JASMINOIDES* IN THE MARCHE REGION, CENTRAL-EASTERN ITALY

Potato spindle tuber viroid (PSTVd) is a pathogen that can induce high losses of production in Solanaceae, and hence it is included in the list of quarantine pathogens. It is transmitted by seeds, tubers and pollen, and particularly by contact through contaminated tools. It has been found in some Italian regions, mainly in ornamental plants, where it causes latent infection. During the Spring of 2011, a survey was carried out in some plant nurseries in the Marche region to detect PSTVd in plants of *Solanum jasminoides* as seen in other Italian regions. Molecular analyses detected PSTVd in several samples of *S. jasminoides* in Marche. It is now important to check the sanitary status of other crops, e.g. tomato, which has already been shown to be infected in the Liguria region. Considering the value for the regional economy of plant nurseries, we have warned stakeholders that should the presence of the pathogen be confirmed, there is the need for selection of healthy mother plants for use as propagation material.
Key words: quarantine, RT-PCR, nursery

INTRODUZIONE

Il viroide del tubero fusiforme della patata (*Potato spindle tuber viroid* – PSTVd), appartenente alla famiglia *Pospiviroidae*, con un genoma non incapsidato, circolare, a singolo filamento di RNA (ssRNA), costituito da 357-360 nt (Flores *et al*., 2011), è in grado di determinare perdite anche del 50% della produzione in patata (Pfannenstiel e Slack, 1980).

Nel 2006 sono state segnalate per la prima volta infezioni latenti di PSTVd in piante ornamentali di *Solanum jasminoides* in Germania ed in Olanda (Anonymous, 2006a, 2006b). Successivamente, lo stesso patogeno è stato diagnosticato in diversi Paesi Europei anche in altre solanacee ornamentali che includono esemplari asintomatici di *S. rantonnetii*, *Brugmansia* spp. e *Streptosolen jamesonii* (Verhoeven *et al*., 2008; EFSA, 2011). La presenza di questo viroide in Italia è stata segnalata per la prima volta nel 2007, quando sono state identificate piante di *S. jasminoides* e di *S. rantonnetii* infette da PSTVd in vivai dell'Italia centrale e meridionale (Di Serio, 2007). PSTVd è annoverato tra gli organismi da quarantena (allegato II, Parte A, Sezione II, della direttiva Europea 2000/29/CE), in quanto facilmente trasmissibile attraverso il seme, il polline e soprattutto per contatto, durante le operazioni colturali effettuate utilizzando attrezzi da lavoro contaminati. Ha un ampia gamma di ospiti sperimentali, riuscendo ad infettare ben 156 specie appartenenti a 32 famiglie (Jeffries, 1998). Infezioni causate da PSTVd sono state, fra l'altro, segnalate su avocado (Querci *et al*., 1995), pepino (Shamloul *et al.*, 1997) e più recentemente su piantine di pomodoro che presentavano vistosi sintomi di nanismo, accartocciamento fogliare e parziale necrosi (Navarro *et al*., 2009; Silletti *et al*., 2009).

Poiché la diffusione di questo patogeno potrebbe rappresentare una grave minaccia per gli stati membri dell'UE, sono state adottate misure fitosanitarie di emergenza al fine di impedire l'introduzione e la diffusione del PSTVd all'interno della Comunità (Decisione della Commissione 2007/410/CE del 12 giugno 2007 e Decreto Ministeriale 28 gennaio 2008).

Obiettivo di questa indagine è stato la verifica della presenza di PSTVd in esemplari di *S. jasminoides* coltivati nella regione Marche.

MATERIALI E METODI

La legislazione fitosanitaria in vigore affida ai Servizi fitosanitari regionali la periodica realizzazione di controlli ufficiali per verificare la presenza di PSTVd nei territori di propria competenza. In ottemperanza a tali disposizioni, durante la primavera 2011, sono stati prelevati trenta esemplari di *S. jasminoides* rappresentativi di diversi lotti di piante propagate vegetativamente ed allevate in serra presso vivai marchigiani.

Dopo aver effettuato delle osservazioni visive alla ricerca di alterazioni ascrivibili ad agenti di natura virale e virus simile, sono state raccolte da ciascuna pianta venticinque foglie. Il campione fogliare è stato polverizzato in un mortaio in presenza di azoto liquido e da 200 mg di polvere è stata effettuata l'estrazione degli acidi nucleici totali (TNA), utilizzando il kit RNeasy Plant (Qiagen). Gli acidi nucleici sono stati sottoposti successivamente alla reazione a catena della polimerasi preceduta dalla reazione di trascrizione inversa in un unico tubo (one step RT-PCR). La reazione di RT-PCR è stata realizzata in un volume totale di 25 µl contenente: 5 µl di buffer 5× per *Taq* polimerasi (Promega), 1,5 µl di $MgCl_2$ (25 mM), 0,2 µl di una soluzione di desossiribonucleotidi (10 mM), 1,25 µl di primer PSTVd-32/PSTVd-33 (10 µM) (Di Serio, 2007), 0,2 µl di *Taq* polimerasi (Promega) (5 U/µl), 0,2 µl di AMV (Promega) (30 U/µl) e 0,3 RNAse OUT (Promega) (40 U/µl) e 2 µl di TNA estratto. La reazione di amplificazione è stata condotta in un termociclatore, MyCycler Termocycler (Bio-Rad) impostando il programma: 46°C per 30 min, seguiti da 3 min a 94°C e 40 cicli di 94°C per 30 sec, 62°C per 30 sec e 72°C per 60 sec. Infine, è stato previsto un ulteriore step di 72°C per 7 min. L'analisi dei frammenti amplificati è stata effettuata analizzando un'aliquota di 10 µl di prodotto amplificato mediante elettroforesi su gel di agarosio. Al gel di agarosio preparato alla concentrazione di 1,5 g su 100 ml di tampone di migrazione TAE 1×, sono stati aggiunti 10 µl di SYBR Safe DNA gel stain (10000 ×) (Invitrogen). Un ladder commerciale 50 pb Ladder (Promega) è stato utilizzato per il controllo della dimensione della bande

amplificate. L'elettroforesi è stata condotta a 90 V per 20 minuti. Successivamente il gel è stato visualizzato e fotografato mediante l'acquisitore di immagini Gel Doc XR (Bio-Rad).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Quasi tutti i campioni analizzati sono risultati infetti da PSTVd. Nei campioni infetti così come anche nel controllo positivo (gentilmente fornito dal CRA-PAV di Roma) si è ottenuto un amplicone specifico di circa 360 pb, corrispondente al genoma del viroide. Dal campione sano e dall'acqua non sono stati ottenuti prodotti di amplificazione. Fino ad ora, nella regione Marche non era stata segnalata la presenza di PSTVd, rinvenuto invece in diverse altre regioni italiane (Di Serio, 2007; Silletti *et al*., 2009; Costantini *et al*., 2011).

La problematica relativa alle infezioni viroidali in solanacee ornamentali è resa ancora più complessa dalla segnalazione di piante di *S. jasminoides* asintomatiche infette dal viroide del nanismo del crisantemo (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd), anch'esso viroide da quarantena inserito nell'allegato II, Parte A, Sezione II, della direttiva Europea 2000/29/CE che induce una grave malattia in crisantemo. Infine, non meno importanti sono le recenti segnalazioni di altri viroidi in altre ornamentali, ad esempio il viroide del nanismo apicale del pomodoro (*Tomato apical stunt viroid*, TASVd) su *Cestrum* spp., o il viroide dell'exocortite degli agrumi (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) su *S. jasminoides*, verso i quali, pur non essendo organismi da quarantena, è necessario garantire la qualità fitosanitaria delle produzioni floricole nazionali (Luigi *et al*., 2011; Torchetti *et al*., 2011).

Il ritrovamento di piante infette da PSTVd, la facilità con cui il viroide si diffonde, la latenza in ospiti ornamentali e l'impatto economico che può avere soprattutto nel settore orticolo, come documentato in altre regioni italiane (Navarro *et al*., 2009; Silletti *et al*., 2009), impone una particolare attenzione nel monitoraggio delle aree vocate al florovivaismo e al settore orticolo della regione. Contemporaneamente, risulta sempre più pressante la necessità di individuare delle piante ornamentali capostipite sane, selezionate da un punto di vista clonale e sanitario, a cui i vivaisti possano attingere per le successive fasi di moltiplicazione.

Ringraziamenti

Lavoro svolto grazie al progetto "Monitoraggio del viroide del tubero fusiforme della patata" promosso dall'ASSAM, Regione Marche.

LAVORI CITATI

Anonymous, 2006a. Isolated finding of *Potato spindle tuber viroid* on *Solanum jasminoides* in the Netherlands. *EPPO Reporting Service 2006,* 7 (142), 5.

Anonymous, 2006b. Isolated finding of *Potato spindle tuber viroid* on *Solanum jasminoides* in Germany. *EPPO Reporting Service 2006,* 8 (159), 2.

Costantini E., Luigi M., Luison D., Mangiaracina P., Albanese G., Tomassoli L., Faggioli F., 2011. Diagnosis, characterization and diffusion of Pospiviroids in ornamentals in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 93, S4.14.

Di Serio F., 2007. Identification and characterization of *Potato spindle tuber viroid* infecting *Solanum jasminoides* and *S. rantonnetii* in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 89, 297-300.

EFSA, 2011. Scientific Opinion on the assessment of the risk of solanaceous pospiviroids for the EU territory and the identification and evaluation of risk management options. *EFSA Journal*, 9(8), 2330.

Flores R., Di Serio F., Navarro B., Duran-Vila N., Owens R.A., 2011. Viroids and viroid diseases of plants. In: Studies in Viral Ecology, Volume One: Microbial and Botanical Host Systems. (Ed: Christon J. Hurst) John Wiley & Sons, pp. 311-346.

Jeffries C., 1998. *FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm, No. 19. Potato.* FAO, Rome (IT).

Luigi M., Luison D., Tomassoli L., Faggioli F., 2011. Diffusion and molecular analysis of Pospiviroids on ornamental plants in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 93, 1-5.

Navarro B., Silletti M.R., Trisciuzzi V.N., Di Serio F., 2009. Identification and characterization of potato spindle tuber viroid infecting tomato in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 91, 723-726.

Pfannenstiel M.A., Slack S.A., 1980. Response of potato cultivars to infection by the *Potato spindle tuber viroid*. *Phytopathology*, 70, 922-926.

Querci M., Owens R.A., Vargas C., Salazar L.F., 1995. Detection of potato spindle tuber viroid in avocado growing in Peru. *Plant Disease*, 79, 196-202.

Shamloul A.M., Hadidi A., Zhu S.F., Singh R.P., Sagredo B., 1997. Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19, 89-96.

Silletti M.R., Navarro B., Bozzano G., Trisciuzzi V. N., Di Serio F., 2009. Il viroide PSTVd minaccia pomodoro e patata. *L'Informatore Agrario*, 11, 89-90.

Torchetti E.M., Navarro B., Trisciuzzi V.N., Silletti M. R., Di Serio F. 2011. Mixed viroid infections of *Solanum jasminoides* in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 93, S4.61.

Verhoeven J.T.J., Jansen C.C.C., Roenhorst J.W., 2008. First report of Pospiviroids infecting ornamentals in the Netherlands: *Citrus exocortis viroid* in *Verbena* sp., *Potato spindle tuber viroid* in *Brugmansia suaveolens* and *Solanum jasminoides*, and *Tomato apical stunt* in *Cestrum* sp. *Plant Pathology*, 57, 399.