

Laboratorio di Nematologia Agraria del C.N.R.
70126 Bari - Italia

REAZIONI ISTOLOGICHE ED ISTOCHIMICHE
INDOTTE DA *LONGIDORUS APULUS*
IN RADICI DI SEDANO E CICORIA⁽¹⁾

di

TERESA BLEVE ZACHEO, G. ZACHEO e F. LAMBERTI⁽²⁾

Il rinvenimento, in Puglia, di una nuova specie appartenente al genere *Longidorus*, *L. apulus* Lamberti et Bleve Zacheo (1977), nella rizosfera di numerose colture ortensi, spesso in deperimento, ci ha indotti a studiare le alterazioni istologiche ed istochimiche che questo nematode provoca sulle radici delle piante attaccate.

Materiali e metodi

Piantine di Cicoria (*Cichorium intybus* L.) e di Sedano (*Apium graveolens* L.), con due foglie vere, sono state trapiantate in sabbia sterile, in vasetti di plastica, in serra a 22° C ed inoculate, due giorni più tardi, ciascuna con 100 femmine di *L. apulus*, allevato in serra su radici di *Chenopodium amaranticolor* L. Tre settimane dopo l'inoculazione delle piantine, sono state prelevate delle radici che, dopo fissaggio in CRAF (acido cromico, acido acetico, formalina), sono state disidratate nella serie T.B.A. (alcol terziario butilico) ed incluse in paraffina. Sezioni trasversali e longitudinali dello spessore di 10 µm sono state colorate con safranina e fast greeh, montate in Per-

(1) Histological and histochemical reactions induced by *Longidorus apulus* in celery and chicory roots.

(2) Si ringraziano vivamente il Prof. O. Arrigoni ed il Dr. J. Giebel per i suggerimenti.

mount (Johansen, 1940) ed osservate al microscopio per determinare le alterazioni morfologiche indotte dal parassita.

L'indagine istochimica è stata effettuata su sezioni dello spessore di 100 μm tagliate a mano. L'attività perossidasi è stata determinata mediante la reazione benzidinica (Pearse, 1960), incubando, a temperatura ambiente, le sezioni in una miscela costituita da 1 ml di NH_4Cl (soluzione satura), 1 ml di soluzione acquosa al 5% di Na-EDTA, 9 ml di benzidina (soluz satura in H_2O) ed una o due gocce di una soluzione al 3% di H_2O_2 ; il controllo è stato preparato senza H_2O_2 e con l'aggiunta di una o due gocce di 2 mM KCN e Na N_3 . Dopo dieci minuti le sezioni sono state lavate in acqua distillata e, fermata la reazione con Na N_3 , sono state montate su vetrini. Per la determinazione dell'attività tirosinasi (Nemeč, 1962) le sezioni sono state incubate per tre ore a 37° C in una miscela costituita da una soluzione DOPA 5,6 mM in tampone fosfato 1/15 M a pH 7,4; per il controllo è stata aggiunta al mezzo una goccia di 2 mM KCN e NA N_3 . Anche queste sezioni, prima di essere montate, sono state lavate due volte in acqua distillata. Una modificazione del metodo Barnett e Seligman (Barka e Anderson, 1965) è stata adottata per la localizzazione delle esterasi non specifiche. Le sezioni sono state immerse per dieci minuti, a 20° C, in una miscela costituita da 2,5 mg di 5-bromo-4-cloroindossiacetato sciolto in 0,5 ml di alcol etilico al 95%, 1 ml di una soluzione acquosa 0,01 M di ferrocianuro di potassio, 1 ml di una soluzione 0,01 M di ferricianuro di potassio e 4 ml di tampone trismaleato 0,2 M a pH 7. Le sezioni di controllo sono state preventivamente riscaldate per cinque minuti a 100° C prima di essere incubate nel mezzo.

Risultati

L. apulus attacca le radici delle piante da noi studiate esclusivamente nella zona dell'apice radicale. Piantine osservate due giorni dopo l'inoculazione del parassita mostrano l'area interessata dalla puntura rigonfia a modo di galla apicale. L'apice così ingrossato cessa di allungarsi e spesso si necrotizza (Fig. 1 a). Dalle nostre osservazioni, compiute tre settimane dopo l'inoculazione, è apparso che il sito in cui il nematode si nutre è diverso per i due ospiti considerati. Su Cicoria, infatti, *L. apulus* tende ad inserire lo stiletto negli strati cellulari immediatamente posteriori alla caliptra (Fig. 1 b) per cui le

prime cellule ad essere danneggiate sono quelle dei meristemi apicali. Quelle che però rivelano profonde alterazioni sono le cellule derivate dal procambio, mentre quelle che derivano dal meristema fondamentale e dal protoderma appaiono normali. Le alterazioni rilevabili nelle cellule del procambio incominciano con un'ipertrofia nell'area d'inserzione dello stiletto; segue, poi, un'idrolizzazione progressiva delle stesse cellule, fino alla scomparsa totale delle pareti cellulari ed alla formazione di un'area vescicolosa ripiena di sostanza amorfa (Fig. 1 c, d). Nel cilindro corticale si nota, a ridosso dello strato epidermico, un'intensificazione della divisione cellulare ed un successivo differenziamento precoce dei tessuti. L'infezione provoca, inoltre, abnorme emissione di radici laterali.

Dalle nostre osservazioni risulta che il sito di alimentazione del nematode, in radici di Sedano, non interessa mai i primi strati di cellule meristematische adiacenti alla caliptra (Fig. 1 e). Nella zona interessata dall'inserzione dello stiletto si ha, insieme ad una precoce differenziazione dei tessuti, ispessimento delle pareti cellulari e, quindi, formazione di lesioni a partire dai primi strati del cilindro corticale. Inoltre, non sono mai state osservate grosse alterazioni del tessuto procambiale come si riscontra nelle radici di Cicoria. Gli strati di cellule adiacenti al sito di alimentazione del parassita, nel cilindro corticale, presentano cellule fortemente ipertrofiche, con nuclei molto ingrossati (Fig. 1 f). Sono qui molto meno evidenti le zone iperplastiche osservate in radici di Cicoria.

Per ciò che concerne i rapporti tra attività trofica del parassita ed attività enzimatica, nelle cellule interessate, è stato notato che nell'area in cui il nematode si è alimentato si verifica un aumento di attività perossidasi. Tale aumento delle perossidasi ritrova, in radici di Sedano, nel cilindro corticale, nell'area di attacco del nematode e nelle cellule circostanti, sino a quelle a ridosso del cilindro centrale, che non è però risultato, spesso, interessato dal fenomeno (Fig. 2 b). In radici di Cicoria, invece, la presenza di perossidasi è stata riscontrata, oltre che nelle cellule corticali, anche in quelle del procambio, specie quando sono in atto processi di idrolizzazione (Fig. 2 a). L'attività perossidasi è particolarmente intensa nelle cellule iperplastiche del parenchima corticale.

L'attività tirosinasi sembra, invece, essere localizzata, sia in Cicoria che in Sedano, sulle pareti delle cellule epidermiche, nelle zone iperplastiche, nel cilindro centrale, dove si localizza in modo particolare nell'endoderma, nel periciclo e nei fasci (Fig. 2 c, d).

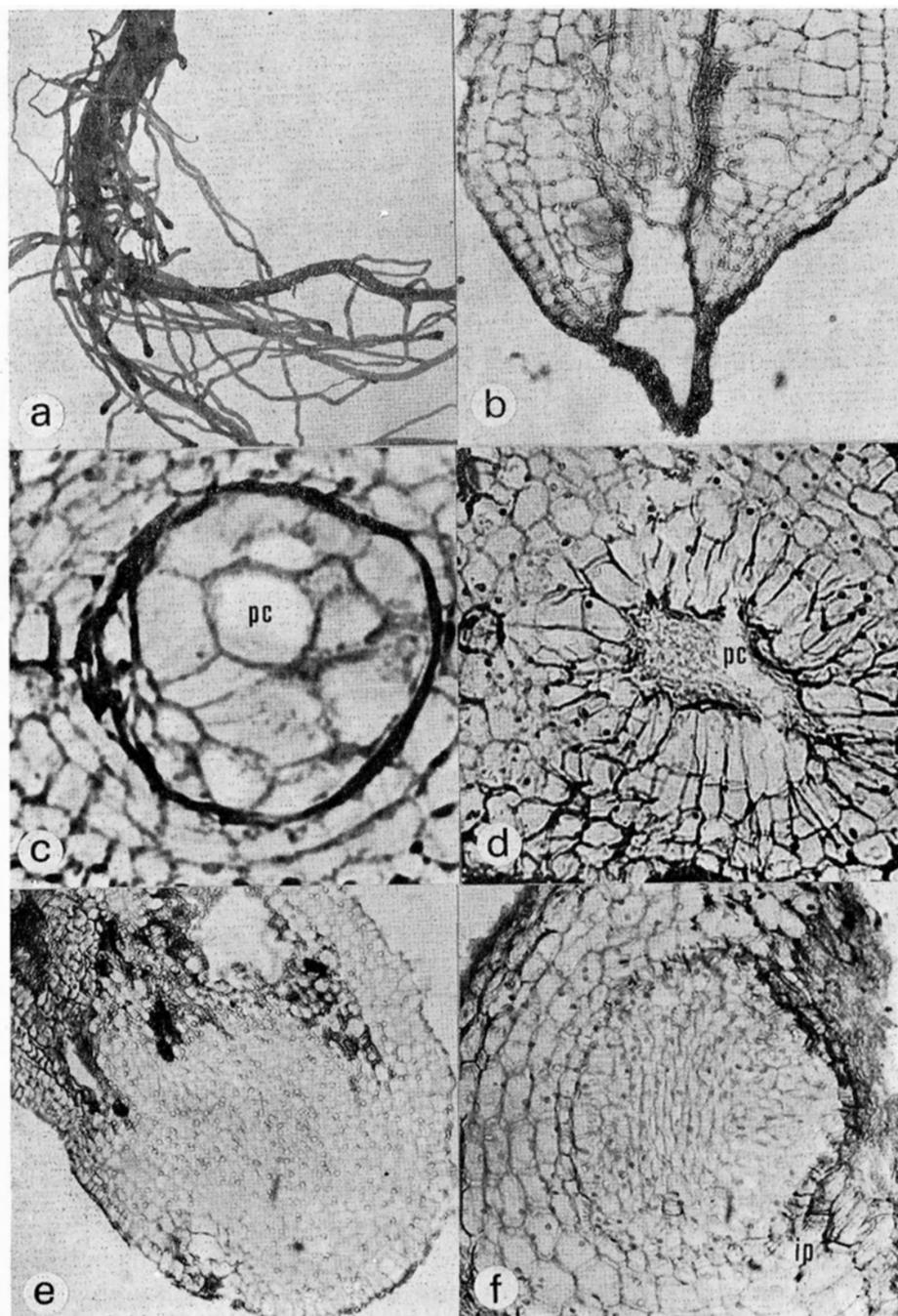


Fig. 1 - Danni indotti da *Longidorus apulus* su apici radicali: apparato radicale di una pianta di Cicoria con apici ingrossati e necrotici (a) sezione longitudinale di apice radicale di Cicoria con cellule ipertrofiche e necrosi (b); sezione trasversale di apice di Cicoria con procambio (pc) ipertrofico, delimitato da necrosi (c) e idrolizzato (d); sezione longitudinale (e) e trasversale (f) di un apice radicale di Sedano con necrosi, lesioni ed ipertrofia (ip).

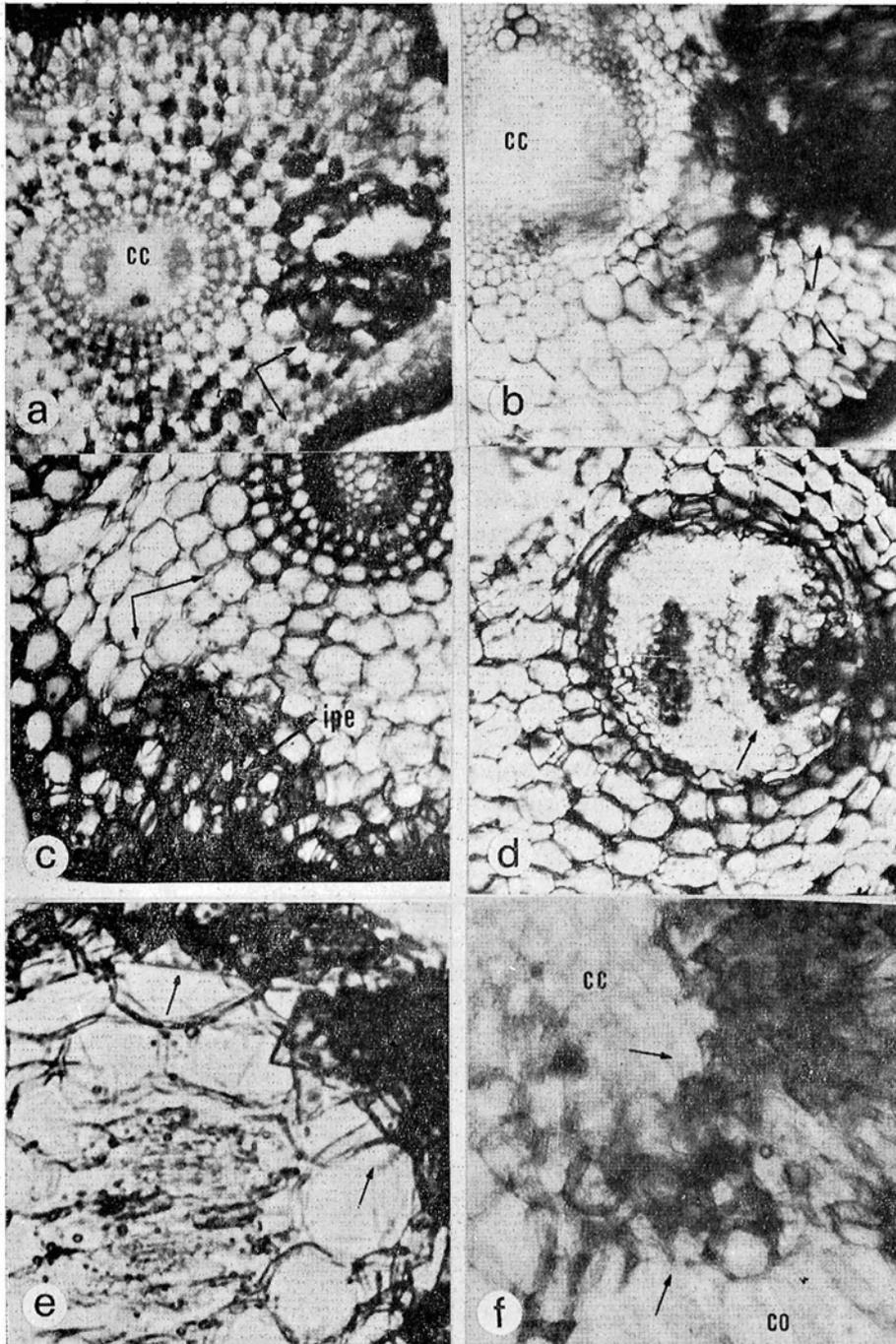


Fig. 2 - Localizzazione istochimica di alcuni enzimi in sezioni trasversali di apici radicali attaccati da *L. apulus*: sezioni di Cicoria (a) e Sedano (b) mostranti aree con intensa attività perossidasi; aree di attività tirosinasi nell'epidermide e nelle zone iperplastiche (ipe) e nel cilindro centrale in radici di Cicoria (c) e di Sedano (d); esterasi non specifiche in epidermide di Cicoria (e) e nel cilindro corticale (co) e nel cilindro centrale (cc) di Sedano (f).

Le esterasi non specifiche sembrano interessare, in radici di Sedano, le cellule adiacenti al sito di alimentazione e, quando il danno si estende a tutto il parenchima corticale, si osservano attività esterasiche anche nel cilindro centrale (Fig. 2 f). L'attività di questi enzimi è, in radici di Cicoria, più intensa nelle cellule epidermiche e nei primi strati sottostanti del parenchima corticale, ma mai nelle cellule ipertrofiche, circostanti il punto di attacco (Fig. 2 e).

Discussione

L. apulus, come altre specie di *Longidorus* (Cohn, 1970; Cohn e Orion, 1970; Cohn, 1975), si nutre sull'apice radicale degli ospiti attaccati e induce ingrossamenti apicali, inattivazione del meristema apicale, con conseguente arresto irreversibile della crescita e proliferazione di radici laterali. I tessuti interessati dall'attività trofica del parassita presentano iperplasia ed ipertrofia cellulari ed un'anticipata differenziazione dei tessuti meristemati. Su Cicoria mostrano, accanto ad iperplasia corticale, una ipertrofia sia a carico delle cellule parenchimatiche circostanti la zona d'attacco, sia a carico delle cellule del procambio.

In accordo con Wyss (1975), su Sedano, non è stata rinvenuta iperplasia corticale, mentre sono ben evidenti strati di cellule ipertrofiche, con pareti notevolmente ispessite, nell'area circostante le cellule danneggiate.

L'intensa attività perossidasi osservata nelle cellule parenchimatiche circostanti la zona di alimentazione del nematode è attribuibile alle lesioni inferte dallo stiletto ed alla conseguente proliferazione cellulare. L'attività di questo enzima aumenta negli apici attaccati, inizialmente nelle cellule epidermiche, diffondendosi poi nelle cellule corticali adiacenti alle cellule epidermiche necrotizzate (Hussey e Krusberg, 1970; Giebel *et al.*, 1971; Epstein, 1972; Veech e Endo, 1969). Ciò suggerisce che la perossidasi gioca un ruolo importante nella formazione di condizioni che possono favorire la sintesi di lignina sulle pareti delle cellule interessate dall'azione patogena del nematode. Questa attività, infatti, non è evidente nelle cellule ipertrofiche. D'altra parte l'intensa attività tirosinasi osservata in queste cellule potrebbe, ossidando i composti fenolici, influenzare i processi indolacetico-ossidasi (Giebel *et al.*, 1971).

L'accumulo di esterasi non specifiche, riscontrato nell'epidermide,

potrebbe suggerire che esse siano strettamente collegate all'azione trofica del nematode e che da questo sito iniziale si diffondano, poi, in tutta l'area di alimentazione.

L'aumentata attività di questi enzimi nei tessuti dell'ospite è, probabilmente, anche in funzione della quantità di saliva che il parassita inietta nel sito di alimentazione, prima di iniziare la sua attività trofica. Hussey (1973) e Bird (1974) hanno, infatti, rinvenuto rispettivamente perossidasi ed esterasi nello stiletto e nelle tasche amfidiali di nematodi.

R I A S S U N T O

Sono state esaminate le reazioni istologiche ed istochimiche indotte da *Longidorus apulus* Lamberti et Bleve Zacheo su radici di Cicoria (*Cichorium intybus* L.) e Sedano (*Apium graveolens* L.). Il nematode attacca la zona apicale delle radici provocando formazione di piccole galle. Nella corteccia, nelle radici di Cicoria, è stata osservata iperplasia ed ipertrofia, nelle cellule del procambio seguita da idrolizzazione progressiva delle pareti cellulari. Su radici di Sedano non si osserva mai iperplasia ed i tessuti interessati dall'attacco del nematode si presentano ipertrofici, con cellule a pareti ispessite e lesioni che, dagli strati corticali, s'inoltrano fino alla regione procambiale. Un'intensa attività enzimatica è stata determinata nelle cellule parenchimatiche coinvolte nell'azione trofica del nematode.

S U M M A R Y

Histological and histochemical reactions induced by Longidorus apulus in celery and chicory roots.

The histological and histochemical reactions induced by *Longidorus apulus* Lamberti et Bleve Zacheo in roots of celery (*Apium graveolens* L.) and chicory (*Cichorium intybus* L.) have been studied. The nematode attacks the root tip forming small galls. Hyperplasia in the cortex and hypertrophy in the cambial cells, followed by progressive hydrolysis of the cellular wall, have been observed in roots of chicory. Hyperplasia was not observed on celery roots where the tissues attacked by the nematode were hypertrophic, with thickened cell walls and with lesions of the cortical layers extending inwards to the beginning of the procambial region. Intense enzymatic activity was identified in the parenchymatic cells affected by the feeding activity of the nematode.

LAVORI CITATI

- BARKA T. e ANDERSON P. J., 1965 - Histochemistry: Theory, Practice and Bibliography. Harper and Row, New York, 660 p.
- BIRD A. F., 1974 - Plant response to root-knot nematode. *An. Rev. Phytophath.*, 12: 69-85.
- COHN E., 1970 - Observations on the feeding and symptomatology of *Xiphinema* and *Longidorus* on selected host roots. *J. Nematol.*, 2: 167-173.

- COHN E., 1975 - Relations between *Xiphinema* and *Longidorus* and their host plants. In Nematode Vectors of Plant Viruses (eds. F. Lamberti, C. E. Taylor e J. W. Seinhorst) Plenum Press, London e New York, 365-386.
- COHN E. e ORION D., 1970 - The pathological effect of representative *Xiphinema* and *Longidorus* species on selected host plants. *Nematologica*, 16: 423-428.
- EPSTEIN E., 1972 - Biochemical changes in terminal root galls caused by an ectoparasitic nematode, *Longidorus africanus*: phenols, carbohydrates and cytokinins. *J. Nematol.*, 4: 246-250.
- GIEBEL J., KRENZ J. e WILSKI A., 1971 - Localization of some enzymes in roots of susceptible and resistant potatoes infected with *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica*, 17: 29-33.
- HUSSEY R. S., 1973 - Peroxidase from *Meloidogyne incognita*. *Physiol. Plant Pathol.*, 3: 223-229.
- HUSSEY R. S. e KRUSBERG L. R., 1970 - Histopathology of an oxidative pattern in Wando peas infected with two populations of *Ditylenchus dipsaci*. *Phytopathology*, 60: 1818-1825.
- JOHANSEN D. A., 1940 - Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co., Inc., N. Y., 523 p.
- LAMBERTI F. e BLEVE ZACHEO T., 1977 - Two new species of *Longidorus* (Nematoda: Longidoridae) from Italy. *Nematol. mediterr.*, 5: 73-83.
- NEMEČ B., 1962 - Botanická mikrotechnika. Československé Akademie Ved. Praha, 482 p.
- PEARSE A. G. E., 1960 - Histochemistry: theoretical and applied. 2nd. ed., Little, Brown and Co., Boston, 998 p.
- VEECH J. A. e ENDO B. Y., 1969 - The histochemical localization of several enzymes of soybeans infected with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita acrita*. *J. Nematol.*, 1: 265-276.
- WYSS U., 1975 - Feeding of *Trichodorus*, *Longidorus* and *Xiphinema*. In Nematode Vectors of Plant Viruses (eds. F. Lamberti, C. E. Taylor e J. W. Seinhorst) Plenum Press, London e New York, 203-221.

Accettato per la pubblicazione il 22 marzo 1977.