

Laboratorio di Nematologia Agraria del C.N.R. - Bari, Italia  
Laboratorio di Fitovirologia Applicata del C.N.R. - Torino, Italia

TRICHODORUS VIRULIFERUS (NEMATODA, TRICHODORIDAE),  
VETTORE DEL VIRUS 'RATTLE' DEL TABACCO (TRV)  
NELL'ASTIGIANO <sup>(1)</sup><sup>(2)</sup>

di

F. ROCA, M. CONTI e F. LAMBERTI

Indagini condotte nel 1965 nell'Italia settentrionale sulla diffusione del virus 'rattle' del tabacco (« tobacco rattle virus » = TRV) hanno rivelato la presenza di quattro specie di nematodi appartenenti al genere *Trichodorus* Cobb: *T. viruliferus* Hooper, 1963; *T. teres* Hooper, 1962; *T. nanus* Allen, 1957, e di pochi esemplari, reperiti solo in una località del Piemonte, di una specie considerata indescritta (Van Hoof *et al.*, 1966). Gli Autori rilevarono, in particolare, che *T. viruliferus* è un vettore diffuso e relativamente efficiente di TRV in gran parte delle località campionate.

La presenza di TRV nella zona orticola di Asti, con incidenze localmente elevate su colture di peperone (*Capsicum frutescens* L.) (Conti e Masenga, 1977), e preliminari osservazioni epidemiologiche sulla malattia, che indicavano chiaramente una attiva trasmissione del virus attraverso il terreno, ci hanno indotto a sottoporre alcuni campioni ad analisi nematologiche. Il terreno prelevato nella rizosfera di piante di peperone con sintomi di TRV è risultato frequentemente infestato da *T. viruliferus*. Le indagini sono quindi proseguite per verificare l'efficienza di questo nematode come vettore di TRV e, localmente, la sua importanza nella diffusione del virus. I risultati sono riportati nel presente lavoro.

---

<sup>(1)</sup> *Trichodorus viruliferus* (Nematoda, Trichodoridae), vector of Tobacco Rattle virus (TRV) in the province of Asti.

<sup>(2)</sup> Ricerca eseguita nell'ambito del Progetto Finalizzato « Virus ».

a) *Prove di trasmissione attraverso il terreno.*

Poiché nei campioni di terreno prelevati inizialmente sono stati reperiti soltanto pochi esemplari di *T. viruliferus*, le prime prove di trasmissione sono state effettuate direttamente attraverso il terreno.

Il 25 marzo 1974, in un orto di Asti, sono stati prelevati tre campioni di terreno nella rizosfera di altrettante piante di peperone 'Quadrato d'Asti' che presentavano tipici sintomi di TRV. Ogni campione<sup>(3)</sup> è stato suddiviso in due parti, una delle quali è stata sterilizzata in autoclave: le sei parti di terreno così ottenute (tre sterilizzate e tre come da prelievo in campo) sono state poste in vasi separati. In ciascuno di questi sono stati seminati dieci semi di cetriolo (*Cucumis sativus* L. 'Genfer Marketer') e trapiantate cinque piantine di tabacco (*Nicotiana tabacum* L. 'White Burley') con la terza foglia in principio di espansione. Le radici di queste piante sono state quindi prelevate dopo diversi intervalli di tempo, lavate accuratamente in acqua corrente, e macerate con mortaio e pestello in presenza di tampone fosfato 0,01 M, pH 7,0. L'estratto è stato inoculato su piante indicatrici di TRV: tabacco e *Nicotiana glutinosa* L. TRV è stato isolato da due piante di tabacco cresciute, in terreno non sterilizzato, per 21 giorni e da una mantenutavi per 35 giorni (Tabella I). I controlli effettuati da cetriolo hanno tutti dato esito negativo, così come quelli effettuati dalle piante testimoni, allevate in terreno sterilizzato.

L'isolato di TRV ottenuto dal terreno è stato identificato con antisiero specifico anti-TRV (A.T.C.C., PV As-73) ed è stato confrontato sintomatologicamente, su 14 diversi ospiti differenziali, con un isolato ottenuto da peperone della stessa zona (Conti, 1974), risultando indistinguibile da esso.

Ulteriori tentativi di isolamento del virus dal terreno sono stati effettuati nell'agosto 1974 e nel maggio 1975. Le prove hanno interessato otto campioni prelevati nella rizosfera di piante di patata, peperone e pomodoro con sintomi tipici di TRV. L'isolamento del virus è stato tentato sia mediante piante-esca, con le stesse modalità già descritte, sia inoculando l'acqua di percolamento raccolta dai campioni in esame (annaffiati con acqua sterilizzata) su piante indicatrici

---

<sup>(3)</sup> L'analisi nematologica dei campioni ha rivelato che erano presenti da 4 a 5 *T. viruliferus* per 500 g di terreno.

di TRV. Sia nel 1974 che nel 1975, i controlli effettuati con entrambi i metodi hanno avuto esito negativo.

I tentativi di isolamento del virus sono proseguiti nel novembre 1976, impiegando il metodo delle foglie-esca (« bait leaf method », Van Hoof, 1976). Il terreno, prelevato ancora nella rizosfera di peperoni affetti da TRV, è stato distribuito in due terrine (cm 25 x 35 x 6) in cui sono state stratificate, ad 1 cm di profondità, foglie completamente espanse di tabacco 'White Burley'. In entrambe le terrine, la superficie del terreno è stata ricoperta con carta bibula, mantenuta umida con acqua sterilizzata. Una delle terrine è stata conservata in serra a  $23 \pm 1,5^{\circ} \text{C}$ , l'altra in camera climatica a  $15 \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ . Una settimana più tardi, nella prima terrina 2 foglie su 8 presentavano lesioni locali puntiformi, necrotiche, con ampio alone clorotico

Tabella I - Isolamento di TRV da terreno mediante piante-esca di tabacco.

Periodo di esposizione delle piante-esca in terreno infetto (giorni)	Piante indicatrici inoculate da radici di piante-esca	Campione di terreno		
		A	B (a)	C
7	<i>N. glutinosa</i>	—	—	—
21	tabacco	—	—	+ (82)
21	tabacco	—	—	+ (2)
35	tabacco	—	—	+ (4)
35	tabacco	—	—	—
35	<i>N. glutinosa</i>	—	—	—

(a) isolamento negativo: —; isolamento positivo: + (in parentesi: numero di lesioni locali su singole piante indicatrici).

(Fig. 1A); nella seconda terrina, tenuta in cella climatica, non era rilevabile alcun sintomo su 11 foglie. Queste foglie sono state estratte dal terreno ed esposte a luce artificiale (con fotoperiodo di 14 ore, a 3.500 lux); entro quattro giorni, cinque di esse hanno manifestato lesioni locali necrotiche di tipo anulare, abbastanza tipiche per TRV (Fig. 1B). Tutte le lesioni locali osservate su foglie di tabacco sia nell'una che nell'altra terrina sono state controllate separatamente per inoculazione su ospiti differenziali di TRV con esito positivo (Fig. 1C).

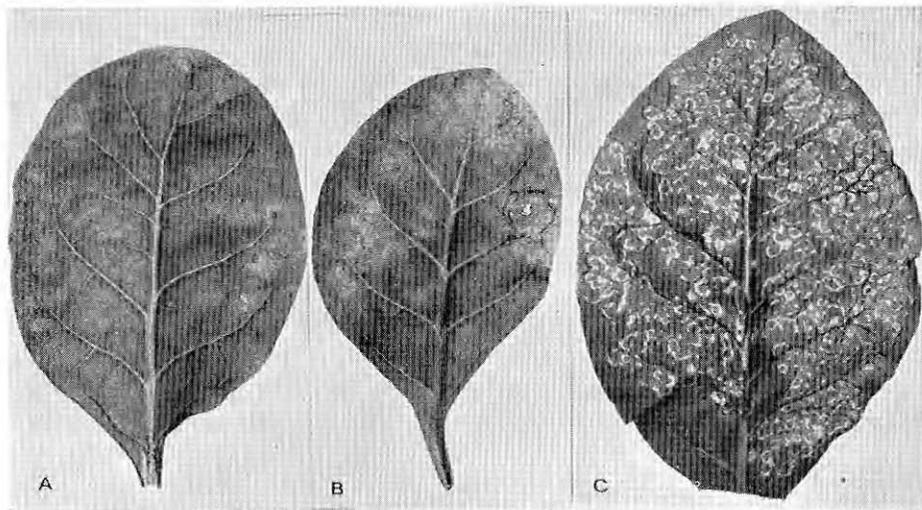


Fig. 1 - Foglie di tabacco « White Burley » con lesioni locali da TRV: A e B, isolamenti ottenuti su foglie-esca; C, sintomi ottenuti per inoculazione meccanica da foglie-esca su piante indicatrici.

b) *Prove di trasmissione con nematodi.*

All'inizio di maggio, nel 1976, è stato osservato un discreto numero di esemplari di *T. viruliferus* in campioni di terreno, prelevati nella rizosfera di peperoni coltivati in uno degli orti in cui TRV è endemico, ma non presentanti ancora sintomi di virosi. I nematodi sono stati estratti dal terreno e trasferiti direttamente in vasetti contenenti giovani piantine di pomodoro, allevate in serra, in terreno sterilizzato.

Successivamente, verso la fine dello stesso mese, sono stati estratti da terreno fresco altri esemplari di *T. viruliferus*: questi, suddivisi in gruppi di 10, 20 e 30 individui, sono stati macerati in mortaio, in presenza di tampone fosfato 0,01 M, pH 7,0, ed inoculati su piante indicatrici di TRV per strofinamento.

Le prove effettuate sia saggiando l'infettività dei nematodi, sia inocolandone l'estratto meccanicamente, hanno avuto tutte esito negativo.

Ulteriori tentativi, effettuati nell'estate 1976 (2 luglio) deponendo nematodi sulle radici di piantine di pomodoro hanno invece sortito,

in numerosi casi, trasmissione di TRV. Come di consueto, il terreno è stato prelevato nella rizosfera di piante di peperone con evidenti sintomi di TRV e i nematodi ne sono stati estratti con il metodo dei setacci di Cobb, leggermente modificato. Gli esemplari di *T. viruliferus* sono stati immessi, in numero variabile da 3 a 15, senza fare distinzioni per sesso o stadio di sviluppo, in vasetti contenenti 20cc di una miscela sterilizzata di terreno di medio impasto e sabbia (2:1). In ogni vasetto è stata trapiantata una piantina di peperone 'Quadrato d'Asti' oppure di pomodoro 'Supermarmande'; ogni prova è stata effettuata su 4 piantine di peperone e 4 di pomodoro, mantenendo i vasetti in serra a 23-24 °C, immersi in sabbia sterile costantemente umida.

Tabella II - *Trasmissione di TRV mediante T. viruliferus estratti dal terreno e fatti alimentare su radici di piante indicatrici.*

Numero nematodi per singola pianta	Piante infettate/inoculate	
	pomodoro	peperone
0	0/4	0/4
3	1/4	1/4
6	2/4	3/4
9	2/4	3/4
12	3/4	2/4
15	3/4	2/4

Quattro settimane dopo l'immissione dei nematodi, benché nessuna delle piantine presentasse sintomi di infezione, si è effettuato un controllo individuale delle piante mediante inoculazione meccanica su tabacco 'White Burley' e *Callistephus chinensis* (L.) Nees. TRV è stato isolato sia da peperone che da pomodoro in 11 casi su 20; nessuna delle piante di controllo, non esposte a *T. viruliferus*, è risultata infetta (Tabella II). Due mesi dopo l'inoculazione, tutte le piante di peperone risultate infette al controllo su piante indicatrici presentavano tipici sintomi di TRV sulle foglie apicali (Fig. 2).

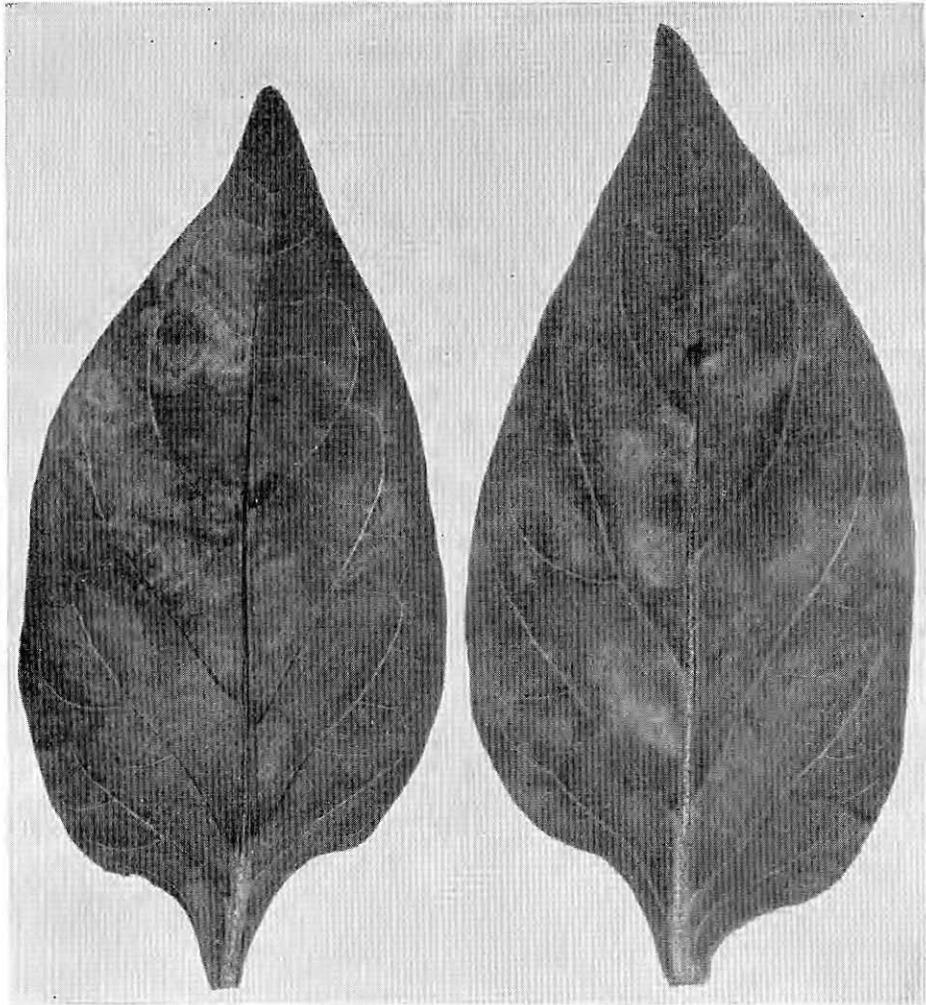


Fig. 2 - Foglie di peperone « Quadrato d'Asti » con sintomi di TRV a seguito di trasmissione sperimentale con *Trichodorus viruliferus*.

c) *Osservazioni in campo.*

Nel 1976 sono state effettuate osservazioni sulla diffusione di TRV in colture di peperone. È stata prescelta una coltura di modeste dimensioni, costituita da 10 file di 12 piante ciascuna, per un totale complessivo di 120 piante. Tale coltura era situata negli immediati

dintorni di Asti, in orto tipico della zona, in cui TRV è endemico.

Le piante di peperone, seminate in letto caldo in febbraio, sono state controllate individualmente a fine aprile, poco prima del trapianto in pien'aria, per inoculazione su tabacco e *N. glutinosa*: in nessun caso è stato isolato TRV. Ulteriori controlli effettuati sul terreno di semina, sia per mezzo di piante-esca, sia per inoculazione di acqua di percolamento del terreno sulle suddette piante indicatrici, hanno confermato che il semenzaio era esente da TRV. Il trapianto in campo è avvenuto il 4 maggio. Sono stati effettuati, in seguito, ripetuti sopralluoghi, ricercando ogni volta l'eventuale presenza di sintomi di tipo TRV su tutte le piante. Le piante sospette sono state controllate per inoculazione meccanica su ospiti differenziali del virus, oppure sierologicamente, impiegando estratti fogliari chiarificati e concentrati come antigeni e PV As-73 (A.T. C.C.) come antisiero (Conti, in preparazione).

Il primo controllo (19 maggio) è risultato negativo; il secondo, effettuato il 23 giugno, ha permesso di individuare 5 piante infette su 120 (4%). I casi di infezione da TRV sono aumentati nei controlli successivi, fino ad un massimo finale di 24 (20%), al termine della coltura (Fig. 3). I primi sintomi fogliari, consistenti in vistose maculature biancastre di tipo anulare (« ringspot ») o a bersaglio (Lovisolò e Conti, 1976; Conti e Masenga, 1977), sono stati osservati in giugno, prevalentemente su foglie medio-adulte.

Fila	Pianta												Percentuale di piante infettate alle varie date di osservazione	
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII		
I						X		O				X		19 maggio : 0,0 23 giugno : 4,0 □ 11 agosto : 12,5 X 9 settembre : 17,5 O 7 ottobre : 20,0 Δ
II											O			
III	X													
IV						Δ		□	O					
V	X				□	O	X	X						
VI	X	□		□	X					O		X		
VII	□	Δ												
VIII	X													
IX														
X		O										Δ		

Fig. 3 - Diffusione naturale di TRV in coltura di peperone infestata da *T. viruliferus*.

## CONCLUSIONI E DISCUSSIONE

Le indagini descritte nel presente lavoro confermano che *T. viruliferus* è vettore di TRV nell'Italia settentrionale (Van Hoof *et al.*, 1966) e indicano, in particolare, che il nematode diffonde il virus nell'Astigiano. A partire dal 1969, in diversi orti di questa zona si sono ripetutamente riscontrati danni rilevanti da TRV in colture di peperone, nelle quali la percentuale di piante infette ha raggiunto punte del 25%. Sempre nella stessa zona, il virus è stato recentemente reperito anche in pomodoro, patata e bietola da coste (Conti, in preparazione); da peperone è stato anche isolato nella tipica area capsicola di Carmagnola, presso Torino (Conti e Masenga, 1977).

Le prove sperimentali di trasmissione attraverso il terreno indicano che *T. viruliferus* è vettore efficiente di TRV; l'isolamento del virus, infatti, è stato ottenuto anche da campioni che non contenevano più di 4-5 esemplari del nematode per 500 g di terreno. L'incoerenza dei risultati, dovuta peraltro anche al numero limitato di campioni di terreno saggiati ogni volta, ed alla differente sensibilità delle tecniche impiegate per il rilevamento del virus, è probabilmente da attribuirsi alla grande influenza che temperatura (Van Hoof, 1975) ed umidità del terreno (Van Hoof, 1976) esercitano sull'attività vetrica del nematode, la cui presenza è stata accertata nella zona in cui TRV è endemico, praticamente durante l'intero periodo vegetativo. Le prove effettuate dal 1974 al 1976, infatti, hanno consentito l'isolamento del virus dal terreno da marzo (1974, mediante piante esca) a novembre (1976, mediante foglie esca), e, ripetutamente, durante l'estate (1976, mediante trasmissione diretta, con nematodi estratti dal terreno, a piante indicatrici). Le osservazioni condotte in campo suggeriscono, tuttavia, che nella zona *T. viruliferus* è particolarmente attivo, come vettore di TRV, nel periodo da giugno ad agosto (Fig. 3).

Per quanto riguarda le diverse tecniche utilizzate per il rilevamento del virus, e cioè quella delle piante-esca (Van Hoof, 1968; delle foglie-esca (Van Hoof, 1976), e della trasmissione per mezzo di nematodi estratti dal terreno (Raski e Hewitt, 1963), si può rilevare quanto segue:

- il metodo delle foglie-esca è sensibilmente più rapido di quello delle piante-esca, fornendo una risposta diretta entro 10-15 giorni dall'inizio del saggio. Nella maggioranza dei casi, infatti, sono evitabili le inoculazioni di controllo su piante indicatrici, essendo

le lesioni locali di TRV su foglie-esca abbastanza tipiche ed evidenti (Fig. 1);

- il rilevamento di TRV mediante piante-esca richiede 3-4 settimane (Van Hoof *et al.*, 1966), oltre al tempo necessario per il saggio di controllo su piante indicatrici che, in questo caso, è comunque necessario;
- nei saggi effettuati con piante-esca in terreno naturalmente infestato da *T. viruliferus*, il tabacco è risultato più sensibile del cetriolo, sebbene entrambe queste specie siano indifferentemente consigliate allo scopo (Harrison, 1970).

Peperone e pomodoro, infine, sono risultati buone piante-saggio, raccomandabili nelle prove di trasmissione diretta di TRV, impiegando nematodi come vettori.

Si ringraziano il Sig. G. Gaviani per l'assistenza fornita nel corso dei rilevamenti in campo e per le fotografie in Fig. 1 e il Sig. F. Elia per le fotografie in Fig. 2 e 3.

#### R I A S S U N T O

Il virus « rattle » del tabacco (TRV) è endemico nell'area orticola di Asti, risultando dannoso particolarmente alle colture di peperone. Ricerche condotte dal 1974 al 1976, hanno dimostrato che il vettore naturale del virus, nell'area suddetta, è il nematode *Trichodorus viruliferus* Hooper. L'isolamento di TRV è stato ottenuto sia attraverso il terreno, mediante piante-esca e foglie-esca, sia per trasmissione con nematodi estratti dal terreno stesso e deposti sulle radici di piante indicatrici in terreno sterilizzato. *T. viruliferus* è risultato vettore efficiente di TRV, particolarmente attivo, in natura, nel periodo giugno-agosto.

#### S U M M A R Y

*Trichodorus viruliferus* (Nematoda, Trichodoridae), vector of tobacco rattle virus in the province of Asti.

Tobacco rattle virus (TRV) is endemic in the horticultural area around Asti, Northwest Italy, where it causes serious losses to pepper crops. Investigations over a period of three years (1974-76) indicate that the natural vector of the virus is the nematode *Trichodorus viruliferus* Hooper. TRV has been either isolated from the soil by both bait-plant or bait-leaf methods, or transmitted by nematodes extracted from the soil and tested on the root system of indicator plants grown in sterile conditions. *T. viruliferus* has been found to be an efficient vector of TRV, particularly active in the field in the period from June to August.

## LAVORI CITATI

- CONTI M., 1974 - Virosi del peperone in Piemonte e prospettive di lotta. *Inform. Econ.*, 1: 19-23.
- CONTI M. e MASENGA V., 1977 - Identification and prevalence of pepper viruses in Northwest Italy. *Phytopath. Z.* (in stampa).
- HARRISON B. D., 1970 - Tobacco rattle virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses N. 12.
- LOVISOLO O. e CONTI M., 1976 - Virus e virosi del peperone. *Ital. Agric.*, 113: 90-103.
- RASKI D. J. e HEWITT W. B., 1963 - Plant-parasitic nematodes as vectors of plant viruses. *Phytopathology*, 53: 39-47.
- VAN HOOF H. A., 1968 - Transmission of Tobacco Rattle virus by *Trichodorus* species. *Nematologica*, 14: 20-24.
- VAN HOOF H. A., 1975 - The effect of temperature on the transmission of Tobacco Rattle virus in Tulips by *Trichodorus*, using the « bait leaf » method. *Nematologica*, 21: 104-108.
- VAN HOOF H. A., 1976 - The effect of soil moisture content on the activity of *Trichodorid* nematodes. *Nematologica*, 22: 260-264.
- VAN HOOF H. A., 1976 - The bait leaf method for determining soil infestation with tobacco rattle virus-transmitting trichodorids. *Neth. J. Pl. Path.*, 82: 181-185.
- VAN HOOF H. A., MAAT D. Z. e SEINHORST J. W., 1966 - Viruses of the tobacco rattle virus group in Northern Italy: their vectors and serological relationships. *Neth. J. Pl. Path.*, 72: 253-258.

---

Accettato per la pubblicazione il 9 agosto 1977.