

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

OSSERVAZIONI COMPARATIVE
DELLE ALTERAZIONI ISTOLOGICHE
INDOTTE DA *HETERODERA GOETTINGIANA*
E *MELOIDOGYNE JAVANICA* IN RADICI DI PISELLO⁽¹⁾

di

N. VOVLAS e R. N. INSERRA

Gli studi comparativi sulle alterazioni istologiche causate da diverse specie di nematodi sullo stesso ospite forniscono un valido aiuto per una migliore comprensione dei rapporti reciproci intercorrenti tra ospite e parassita a livello cellulare. Indagini a questo riguardo sono state effettuate su trifoglio ladino (*Trifolium repens* var. *giganteum* Lagr. - Fossat) e su barbabietola (*Beta vulgaris* L.) in presenza di infestazioni concomitanti di *Meloydogyne hapla* Chitw. e *Heterodera trifolii* Goffart e di *M. hapla* e *H. schachtii* Schmidt rispettivamente (Mankau e Lindford, 1970; Jatala e Jensen, 1976).

Al fine di comparare i danni causati a livello istologico da *H. goettingiana* Liebscher e da *M. Javanica* (Treub) Chitw. su pisello (*Pisum sativum* L.) sono state eseguite osservazioni su radici di questa leguminosa infestate da una popolazione lucana e una siciliana dei due nematodi. Inoltre sono stati esaminati al microscopio elettronico a scansione i particolari delle sculture cuticolari del cono vulvare di cisti di *H. goettingiana* non facilmente osservabili al microscopio ottico.

⁽¹⁾ Comparative observations of anatomical changes induced in pea roots by *Heterodera goettingiana* and *Meloidogyne javanica*.

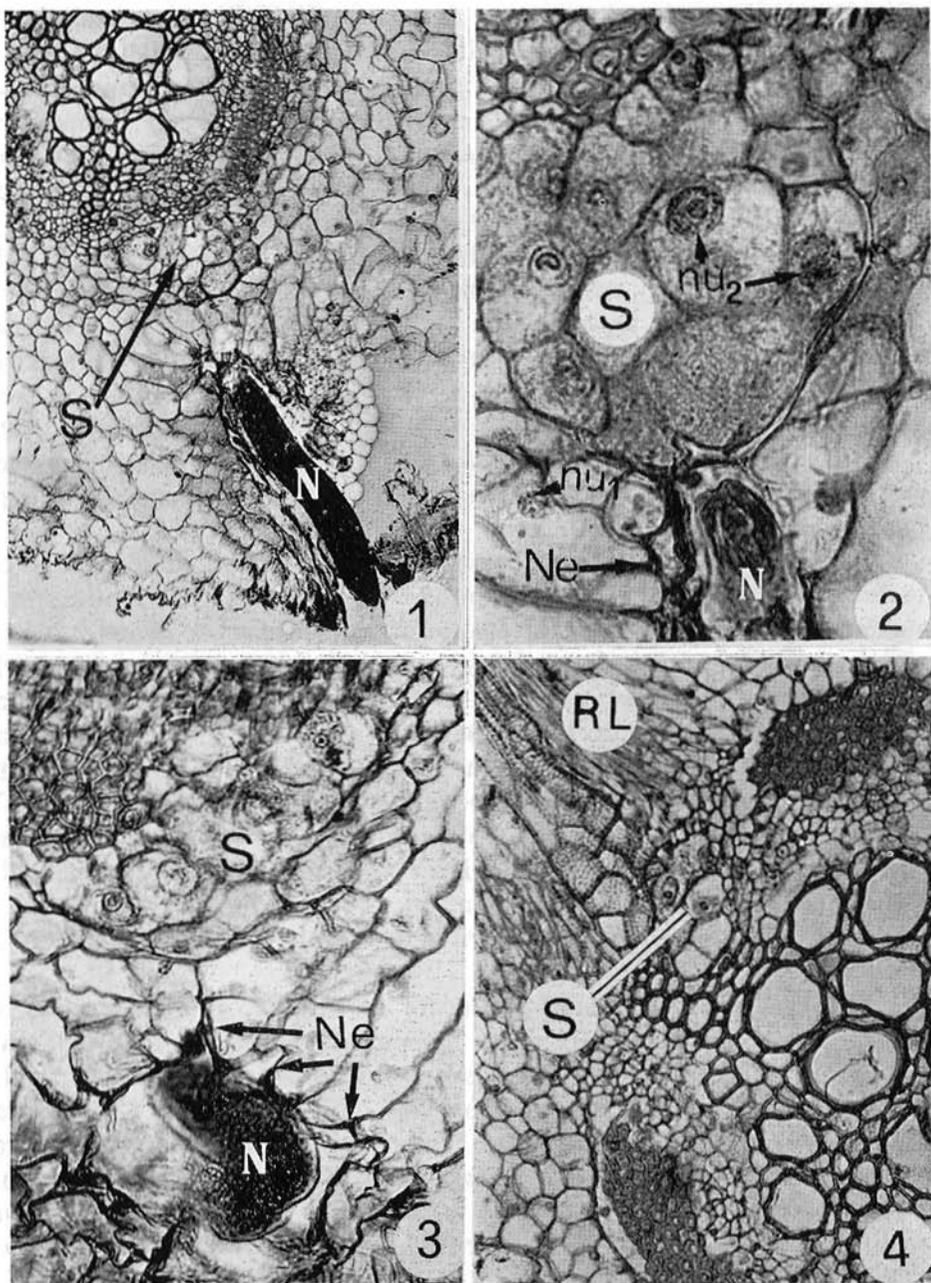
MATERIALI E METODI

Porzioni di radici di pisello var. « Verdone fulminante » recise da piante allevate in serra, in terreno artificialmente infestato da *H. goettingiana* o *M. javanica*, sono state fissate in F.A.A., disidratate, incluse in paraffina e tagliate trasversalmente e longitudinalmente in sezioni di 10-15 μm di spessore. Tutte le sezioni sono state lavate in xilolo, per liberarle dalla paraffina, una parte di esse è stata colorata con safranina e « fast-green », e montate permanentemente su vetrini per l'osservazione al microscopio ottico. Altre invece sono state essiccate all'aria, ricoperte di oro sotto vuoto di 10^{-5} Torr ed esaminate al microscopio elettronico a scansione. Cisti e femmine di *H. goettingiana*, rimosse da radici di pisello, sono state poste su vetrini a goccia pendente e riscaldate in lattofenolo allo scopo di rimuovere sia l'involucro cristallino che avvolgeva le cisti, sia l'ovisacco attaccato al corpo delle femmine adulte senza lasciare impurezze sulla superficie dell'area vulvare. In seguito porzioni di cisti e femmine adulte incollate su appositi porta-preparati e fatte essiccare a temperatura ambiente per alcune ore sono state preparate ed osservate al microscopio elettronico a scansione, utilizzando una accelerazione di voltaggio pari a 14 kw.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I sintomi osservati sulla porzione epigea di piante di pisello sia attaccate dal nematode cisticolo *H. goettingiana* che dal nematode galligeno *M. javanica*, risultavano indistinguibili. Le piante in ambedue i casi si presentavano clorotiche con stentato accrescimento, scarsa fioritura e produzione ridotta a pochi baccelli striminziti e con piccoli semi. L'esame dell'apparato radicale ha reso possibile l'individuazione dei due nematodi per la presenza di deformazioni e di galle, in caso di infestazioni di *M. javanica*, e per la presenza di numerose cisti sulla superficie delle radici, in caso di attacco di *H. goettingiana* (Fig. 17).

A livello istologico le sezioni trasversali delle radici infestate da *H. goettingiana*, a 25 giorni dalla penetrazione delle larve, mostravano sincizi plurinucleati e multipli costituiti da cellule ipertrofiche anch'esse polinucleate mantenenti, apparentemente, la loro indi-



Figg. 1-4 - Sezioni di pisello infestate da *Heterodera goettingiana* osservate al microscopio ottico: 1) sezione trasversale con sincizio (S) alla periferia della stele e con necrosi delle cellule del parenchima corticale adiacenti al corpo di un esemplare del nematode (N); 2-3) sincizio (S) con nuclei ipertrofici (nu 2) e cellule con nuclei normali (nu 1) e pareti necrotiche (Ne) accanto a un esemplare del nematode (N); 4) fasci vascolari interrotti da un sincizio (S) a livello del punto di differenziamento di una radice laterale (RL).

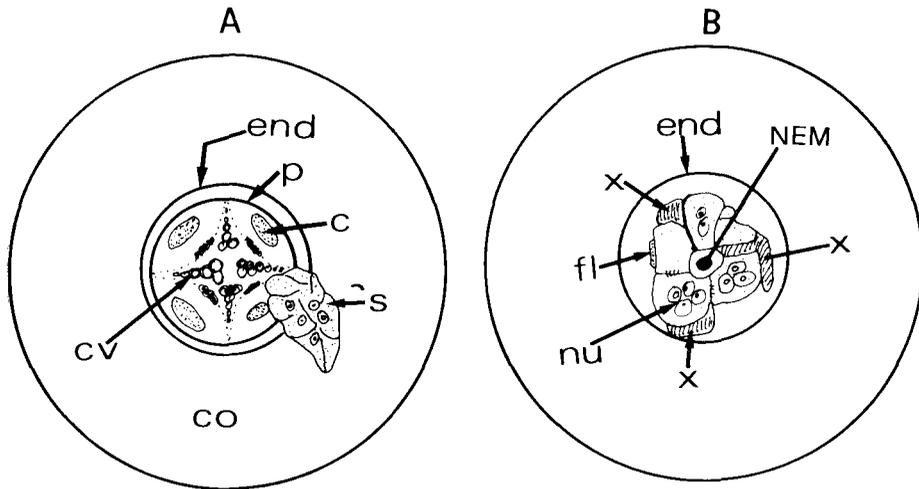
vidualità, ma mostrandoci soluzioni di continuità delle pareti cellulari, tali da permettere la fusione del citoplasma delle cellule adiacenti (Figg. 1, 2, 3, 4). I sincizi avevano pareti ispessite e citoplasma denso, granuloso, con nuclei e nucleoli ipertrofici (Fig. 2, nu2) rispetto a quelli delle cellule vicine non interessate dall'attacco (Fig. 2, nu1). Essi erano disposti generalmente alla periferia del cilindro centrale e non intaccavano profondamente la struttura degli elementi xilematici (Tav. I A). Tuttavia la parziale interruzione dei fasci vascolari con successiva compromissione della funzionalità delle radici laterali è stata notata a seguito della formazione di sincizi a livello dell'area di differenziazione delle stesse (Fig. 4). In prossimità dei sincizi le cellule apparivano compresse ed irregolarmente disposte in seguito alla disorganizzazione che i tessuti vicini avevano subito (Fig. 1). Inoltre le cellule adiacenti al corpo del nematode mostravano le pareti necrotizzate e, di conseguenza, colorate più intensamente (Figg. 2, 3) di quelle delle cellule sane.

Nelle sezioni trasversali e longitudinali di radici di pisello infestate da *M. javanica* il sintomo macroscopico che si osservava, immediatamente dopo l'attacco, era presenza di iperplasia dei tessuti circostanti i sincizi indotti dal nematode. A differenza dei sincizi causati da *H. goettingiana* quelli di *M. javanica* erano costituiti da cellule mantenenti la loro individualità e la cui dilatazione era dovuta a successive e ripetute divisioni nucleari senza citodieresi. Essi erano localizzati nella porzione centrale della stele della radice (Tav. I B) e a seguito della loro espansione alteravano la simmetria del cilindro centrale (Fig. 6), con successiva completa disorganizzazione dell'intera struttura della stele stessa, che presentava gli elementi xilematici compressi o addirittura interrotti dalla loro presenza (Figg. 7, 8, 9).

Dall'esame delle sezioni osservate al microscopio elettronico a scansione risultavano ancora più evidenti le caratteristiche dei sincizi indotti da *M. javanica* e la continuità delle pareti cellulari degli elementi polinucleati che li componevano (Figg. 9, 10, 11, 12). Inoltre è stato notato che più esemplari del nematode possono concorrere alla formazione dello stesso sincizio (Fig. 10). Il citoplasma dei sincizi appariva denso e coagulato a seguito dell'azione dei fissativi adoperati, mentre quello delle cellule adiacenti risultava dissolto (Figg. 9, 10, 12).

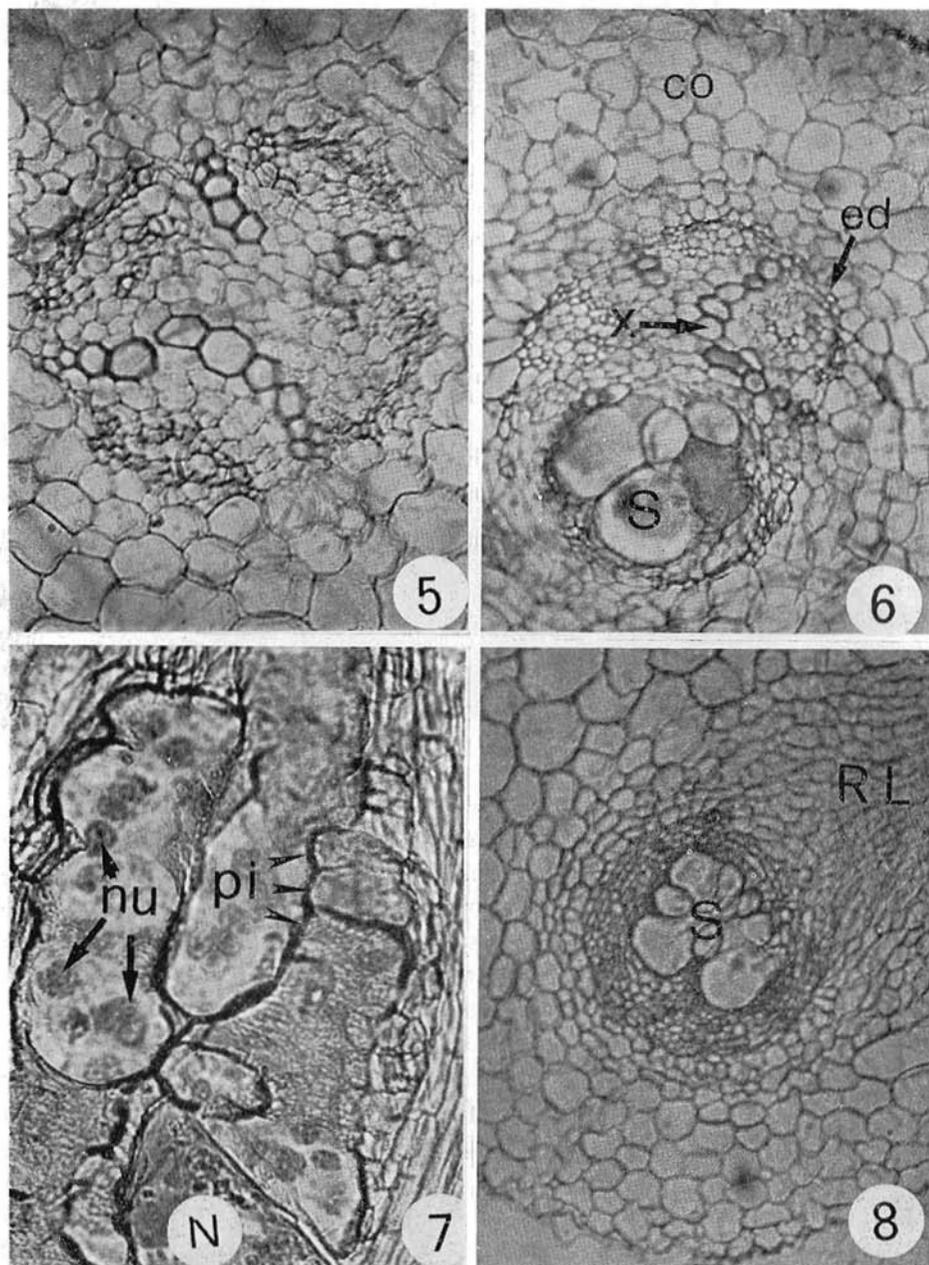
Le osservazioni effettuate al microscopio elettronico a scansione sulle cisti e sulle femmine adulte di *H. goettingiana* hanno permesso

Tav. I - Rappresentazione schematica di sincizi (S) indotti da *Heterodera goettingiana* (A) e *Meloidogyne javanica* (B) in radici di pisello: c = cribro (libro primario), co = parenchima corticale, cv = cordone vasale con accrescimento centripeto, end = endoderme, fl = floema, NEM = nematode, p = periciclo, S = sincizio, X = xilema.

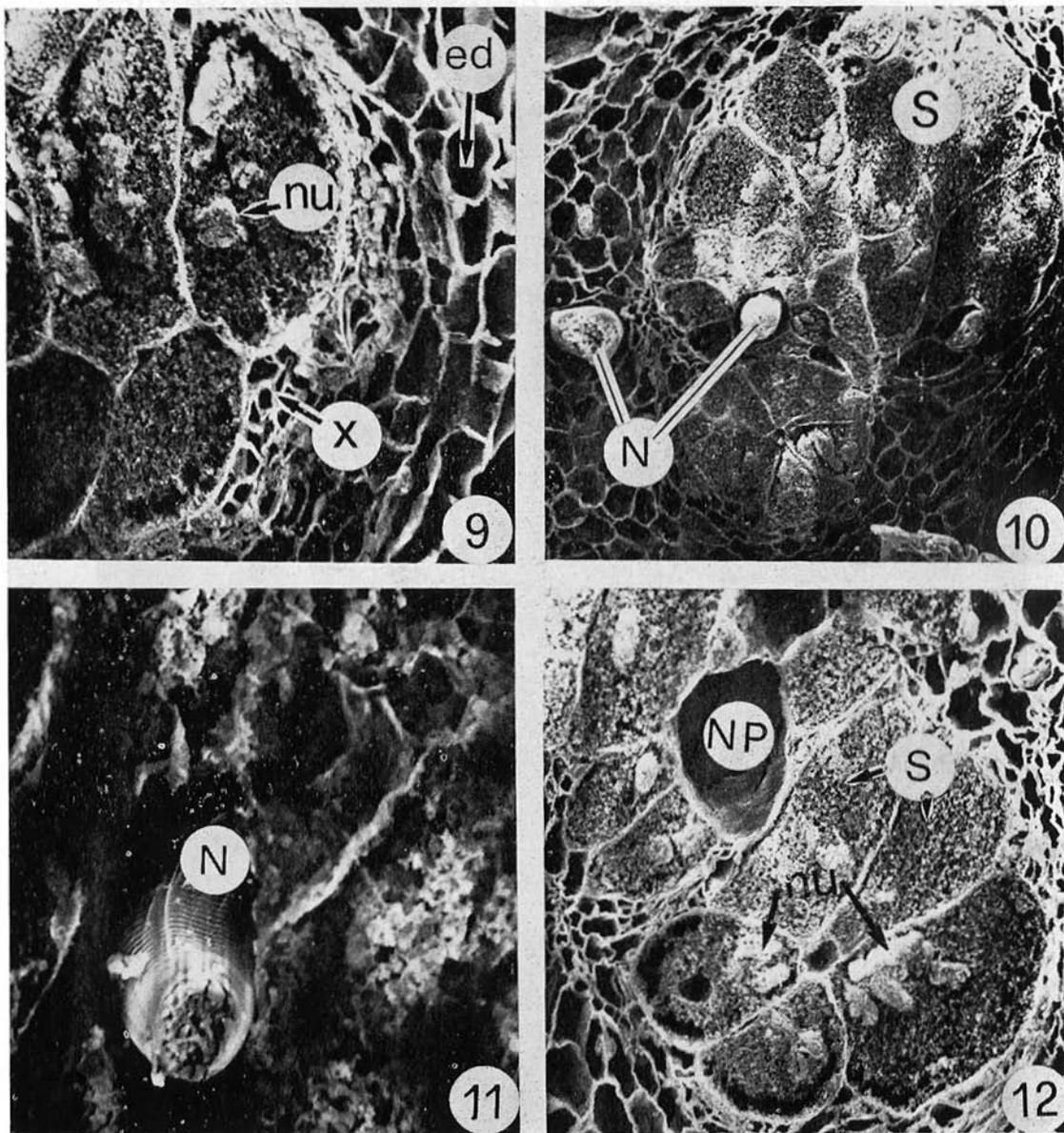


TAV. I

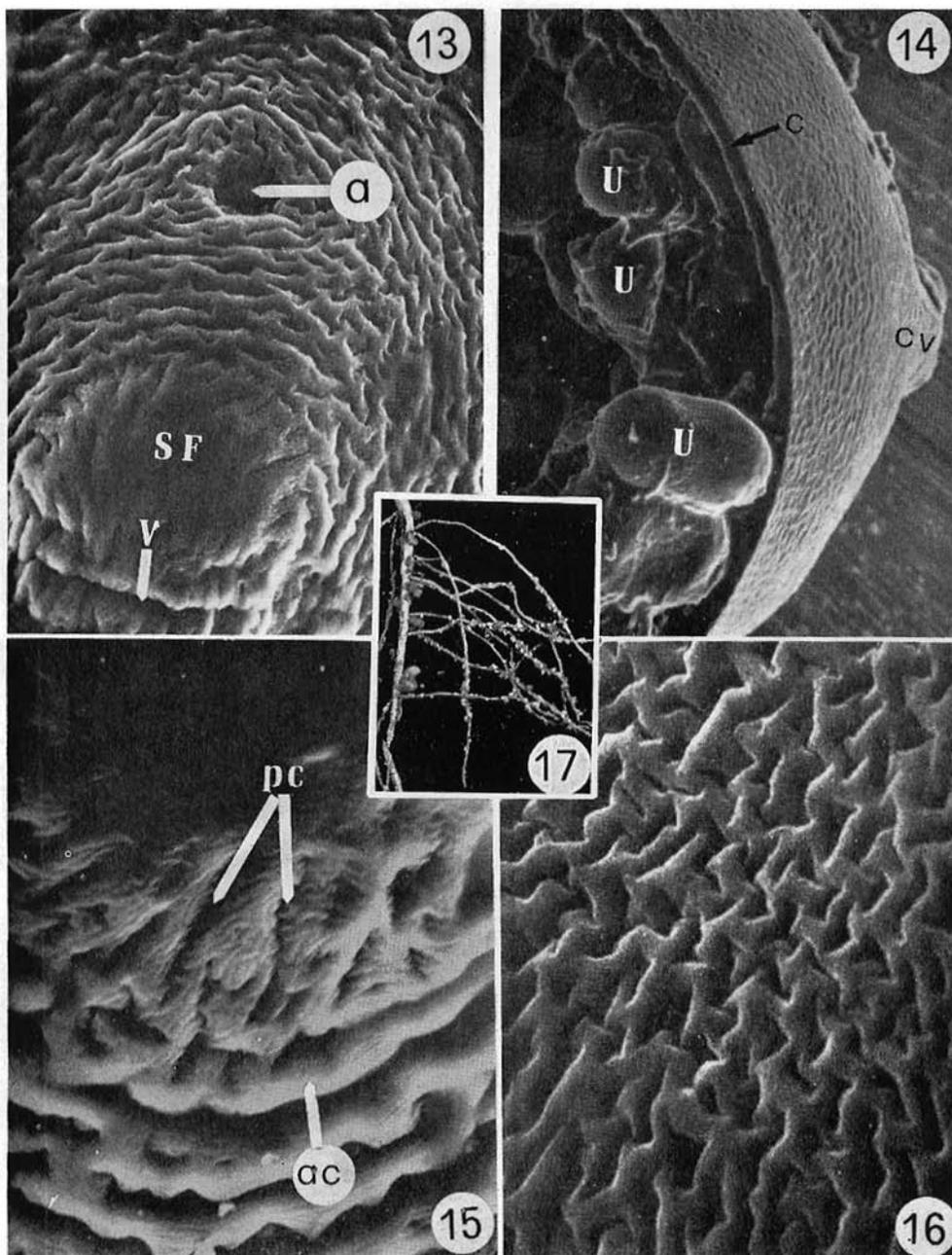
di mettere in risalto che le sculture cuticolari delle cisti sono composte da elementi rugosi ed irregolari disposti ad incastro con andamento a zig-zag, i quali delimitano dei piccoli spazi triangolari variamente profondi (Fig. 16). Dette sculture terminano posteriormente al cono vulvare con un anello cuticolare (Fig. 15) che le separa da quelle dell'area vulvare. Le sculture cuticolari di entrambe le semifenestre (quella dorsale e quella ventrale) sono risultate sempre identiche in tutti gli esemplari esaminati. Caratteristica delle sculture cuticolari delle semifenestre di *H. goettingiana* sembra essere la presenza di 10-12 pieghe cuticolari (Figg. 13, 15), aventi andamento radiale che connettono l'anello circumfenestrare con l'apertura vulvare. La fenestra è inoltre di forma allungata con un valore di L/l (lunghezza su larghezza) pari a circa 2 unità. L'apertura anale è localizzata al centro di un'area circolare di 8-10 μm di diametro e depressa rispetto al piano delle sculture cuticolari (Fig. 13). Essa è situata 50-60 μm posteriormente a quella vulvare.



Figg. 5-8 - Sezioni di radici di pisello infestate da *Meloidogyne javanica* viste al microscopio ottico: 5) sezione trasversale di radice sana; 6) cilindro centrale con elementi xilematici (X) compressi e disposizione dei fasci vascolari sconvolta da un sincizio (S); ed = endoderma; co = parenchima corticale; 7) particolare di sincizio polinucleato (nu), con pareti ispessite (Pi) a contatto con un esemplare del nematode (N); 8) sincizio (S) al centro della stele di una radice laterale (RL).



Figg. 9-12 - Sezioni di galla di radice di pisello infestate da *Meloidogyne javanica* osservate al microscopio elettronico a scansione: 9-10-12) sincizio (S) costituito da cellule ben distinte e polinucleate (nu) con citoplasma coagulato, accanto ad esemplari sezionati del nematode (N); ed = endoderme, NP = cavità lasciata da un esemplare del nematode staccatosi durante le operazioni di taglio del preparato, X = xilema; 11) esemplare del nematode (N) nel tessuto radicale.



Figg. 13-17 - Particolari della scultura della cuticola di *Heterodera goettingiana* visti al microscopio elettronico a scansione e radici di pisello ricoperte da cisti del nematode (17): (13) porzione del cono vulvare con apertura vulvare (V), semifenestre (SF) ed apertura anale (a); (14) ciste sezionata ad arte mostrante le uova (U), lo spessore della cuticola (c) e parte del cono vulvare (CV); (15) pieghe cuticolari (pc) ad andamento radiale aventi origine dall'anello circum-fenestrato (ac); (16) particolare della scultura della cuticola con elementi rugosi disposti ad incastro e a zig-zag delimitanti piccole cavità triangolari.

R I A S S U N T O

Le alterazioni istologiche indotte da *Heterodera goettingiana* Liebscher e *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitw. su pisello (*Pisum sativum* L.) sono state confrontate al microscopio ottico e al microscopio elettronico a scansione. In sezioni di radici infestate dal nematode cistico sono stati osservati sincizi polinucleati localizzati alla periferia del cilindro centrale con assenza di iperplasia dei tessuti adiacenti. In quelle delle radici attaccate dal nematode galigeno oltre a sincizi nel centro della stele è stata notata iperplasia delle cellule limitrofe e compressione degli elementi xilmatici. Vengono inoltre illustrati alcuni particolari della scultura cuticolare delle cisti di *H. goettingiana*, visti al microscopio elettronico a scansione.

S U M M A R Y

Comparative observations of anatomical changes induced in pea roots by *Heterodera goettingiana* and *Meloidogyne javanica*.

Anatomical changes induced by the cyst nematode *Heterodera goettingiana* Liebscher and the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitw. in pea (*Pisum sativum* L.) roots have been compared by the aid of light and scanning electron microscopy. Cross root sections infested with the cyst nematode showed polynucleate syncytia localized at the periphery of the central cylinder with interruption of the vascular bundles at the level of the lateral root initials. Cross section of *M. javanica*-infested roots showed syncytia in the centre of the stele with hyperplasia of the cells surrounding the syncytia and compression of the xylem elements. The cuticular patterns of *H. goettingiana* cyst walls observed by SEM are also illustrated.

LAVORI CITATI

- JATALA P. e H. J. JENSEN, 1976 - Histopathology of *Beta vulgaris* to individual and concomitant infections by *Meloidogyne hapla* and *Heterodera schachtii*. *J. Nematol.*, 8: 336-341.
- MANKAU R. e M. B. LINFORD, 1960 - Host-parasite relationships of clover cyst nematode, *Heterodera trifolii* Goffart. *Ill. Agric. Ext. Stn Bull.*, 667: 1-50.

Accettato per la pubblicazione il 4 maggio 1978.