

Istituto di Nematologia Agraria, C.N.R., 70126 Bari, Italy

EFFETTO DELL'ACIDO ASCORBICO SULLA FORMAZIONE
DI GALLE IN POMODORO SUSCETTIBILE
A *MELOIDOGYNE INCOGNITA* (1)

di

M. T. MELILLO, G. ZACHEO e T. BLEVE-ZACHEO

Molte ricerche sulle piante superiori hanno messo in evidenza l'importanza del ruolo svolto dal sistema dell'acido ascorbico nel metabolismo cellulare. La sua utilizzazione, nella cellula, avviene attraverso processi enzimatici di ossido-riduzione. La trasformazione dell'acido ascorbico (AA) in acido deidroascorbico e viceversa dipende dall'azione di due enzimi, l'acido ascorbico-ossidasi e la deidroascorbicoriduttasi, mediante trasferimento di due elettroni (Dawson e Magee, 1955).

Un prodotto intermedio, nell'ossidazione dell'AA, è costituito da un radicale libero, l'acido monodeidroascorbico. Questo radicale può essere rapidamente trasformato in acido ascorbico grazie alla presenza, nel compartimento cellulare, dell'enzima monodeidroascorbicoriduttasi, che assicura una più rapida riduzione dei prodotti di ossidazione dell'AA (Yamauchi e Joslyn, 1952; Arrigoni *et al.*, 1981). È noto che l'ossidazione di acido ascorbico, durante la maturazione e la conservazione di frutti e vegetali, induce imbrunimento su patata, melanzana e banana (Ogata *et al.*, 1975; Yamauchi e Ogata, 1978).

Van Lelyveld (1975) ha riscontrato che piante di mango (*Mangifera indica* L.), con alto contenuto di AA, sono più resistenti all'attacco di batteri, risultati questi peraltro già riportati su spinacio attaccato da mosaico del cetriolo (Gerola e Laudi, 1956).

(1) *Effect of ascorbic acid on giant cell formation in tomato plants susceptible to Meloidogyne incognita.*

Più recentemente è stato dimostrato che, in piante di pomodoro resistenti, si verifica un incremento dell'AA, durante l'attacco del nematode galligeno *Meloidogyne incognita* (Kofoid *et* White) Chitw. (Arrigoni *et al.*, 1979) e un incremento di attività monodeidroascorbicoriduttasica in radici di piante di pisello resistente, infestato dal nematode cisticolo *Heterodera goettingiana* Liebscher (Zacheo *et al.*, 1981).

È riportato, inoltre, che l'AA è largamente utilizzato dalla cellula durante i processi di divisione e che un abbassamento di esso, mediante l'aggiunta di licorina, inibitore della sintesi di AA, induce un arresto in G1 delle fasi mitotiche (Edgar, 1970; Liso *et al.*, 1983).

Scopo di questo lavoro è di vedere se la somministrazione « in vivo » di AA su piantine di pomodoro suscettibili a *M. incognita* induce cambiamenti sulla formazione dei sincizi e se influenza lo sviluppo del nematode.

Materiali e metodi

Piantine di pomodoro Roma VF e Marmande, suscettibili a *M. incognita*, sono state trattate, 3 giorni prima dell'inoculo, con una soluzione 15 mM di acido ascorbico, pH 7,2 e con acqua per il controllo. Le piantine, poste in vasetti contenenti sabbia sterile, venivano inoculate con 100 larve di *M. incognita* e allevate in cella termostatica a 27°C, 65% di UR e 3.000 lux. Il trattamento con AA è stato continuato anche dopo l'inoculo.

Dodici giorni dopo l'infestazione, le radici sono state prelevate ed è stata effettuata la conta del numero delle galle allo stereomicroscopio. Le galle sono state sottoposte ad idrolisi con HCl 1N a 60°C per 10 min, lavate con H₂O distillata, colorate con il reagente di Schiff, 30 min a temperatura ambiente, rilavate con H₂O distillata e trattate con una soluzione satura di pectinasi, pH 4, per 30 min (Bird, 1973). Dopo lavaggio in H₂O distillata, i sincizi venivano isolati dal rimanente tessuto con sottili aghi, montati su vetrino in una soluzione 1% di aceto carminio, sottoposti a schiacciamento e osservati e fotografati al microscopio ottico.

Le aree dei sincizi sono state misurate con un Digitizer Hewlett-Packard 9874A, collegato ad un calcolatore 9835A.

Piantine di pomodoro Roma VF, trattate per 3 giorni con soluzione 15 mM di AA o con acqua, sono state inoculate con 100 larve

di *M. incognita* e, dopo 24 ore, sono state accuratamente lavate per allontanare i nematodi, non penetrati nelle radici. Porzioni di radici infestate, così trattate, sono state prelevate 3 giorni dopo l'inoculo, fissate in 3% glutaraldeide, a 4°C, per 6 ore, lavate tutta la notte in tampone cacodilato 0,05M, pH 7,2, e post-fissati per 6 ore in 2% osmio tetrossido, lavate nello stesso tampone e colorate per 12 ore con acetato di uranile 0,5M. I campioni venivano quindi disidratati nella serie di etanolo fino ad alcol etilico assoluto anidro e inclusi in resina Spurr.

Sezioni ultrafini sono state tagliate con un ultramicrotomo LKB IV, colorate con acetato di uranile e citrato di piombo e osservate al microscopio elettronico Philips 400T a 80 kv.

Risultati

Piantine di pomodoro Roma VF, suscettibili a *M. incognita*, trattate con acido ascorbico ed esaminate venti giorni dopo l'inoculo, hanno mostrato un decremento del numero di galle, presenti sulle radici, rispetto al controllo (Fig. 1). Esperimenti successivi, condotti sulle cultivar Roma VF e Marmande, entrambe suscettibili a questo nematode, hanno confermato, dodici giorni dopo l'inoculo, un decremento del numero di nematodi di circa l'80%, dopo trattamento con AA, rispetto al controllo, trattato con acqua (Tab. I). Nella stessa tabella sono riportati i pesi, fresco e secco, sia delle radici che della pianta *in toto*. È stato rilevato che, alla concentrazione 15 mM, l'AA induce una leggera riduzione (dal 20 al 40%) sia sul peso fresco che sul peso secco delle piante infestate. Diminuzione di peso è stata riscontrata anche sulle piante non infestate, trattate con AA, rispetto a quelle trattate con acqua.

Sulla base di questi risultati si è ritenuto opportuno isolare i sincizi da radici di piantine di Roma VF, trattate e non con AA e infestate con *M. incognita*, per verificare se, a 12 giorni dall'inoculo, fossero intervenute o meno differenze di carattere citologico.

Dalla Tabella II risulta una diminuzione del numero di galle per pianta, sulle radici trattate con AA, di circa il 60%. La misura delle aree dei sincizi, isolati dalle galle trattate si mostra inferiore di circa il 30% rispetto a quella dei non trattati. Il numero dei nuclei, per sincizio, però, è rimasto pressappoco costante.

L'esame delle figure mitotiche non ha mostrato rilevanti cambia-

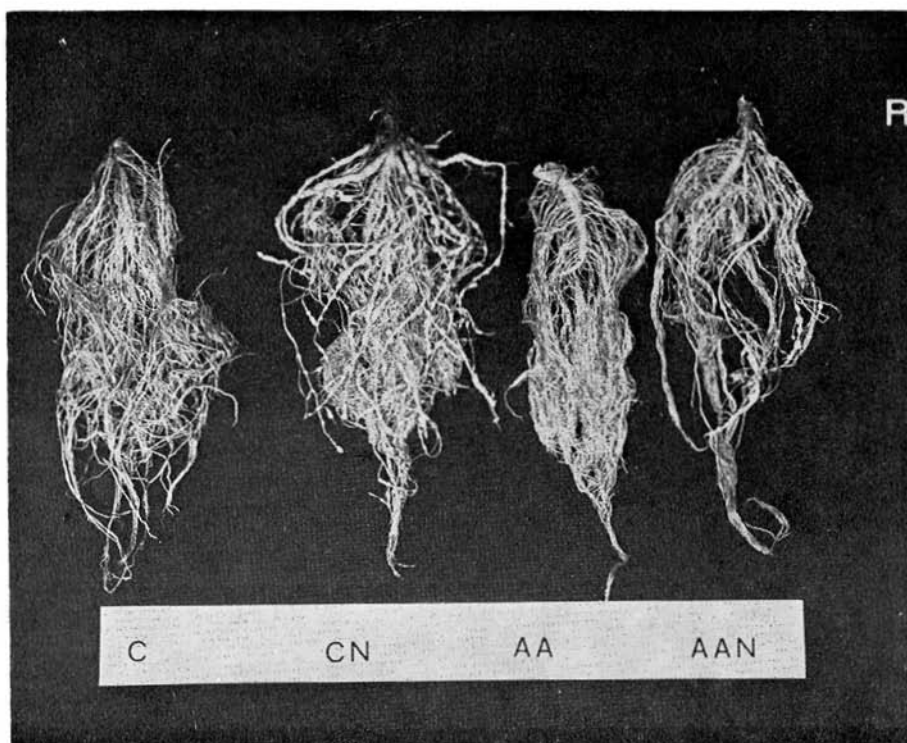


Fig. 1 - Radici di pomodoro Roma VF, sane (c) ed infestate (CN), con 1000 larve di *Meloidogyne incognita*, trattate con acqua; radici sane (AA) ed infestate (AAN) trattate con 15 mM di acido ascorbico. È evidente la riduzione del numero di galle sulle radici trattate con AA.

menti tra i sincizi, isolati dalle galle delle piantine cresciute in acqua e quelle in acido ascorbico. Sembra infatti conservarsi il sincronismo delle mitosi, anche se spesso si è osservata una despiralizzazione dei cromosomi ed un precoce invecchiamento dell'apoplasto nei sincizi trattati con AA (Fig. 2a, 2d, 2b, 2e).

Facendo una serie di prelievi, a intervalli di ventiquattro ore dall'inoculo, è risultato un ritardo nella comparsa delle galle, sulle radici trattate rispetto alle non trattate, durante i primi tre giorni. Infatti, mentre le radici delle piantine cresciute in acqua mostravano formazione di galle, da cui è stato possibile isolare i sincizi (Fig. 2c, 2f), su quelle trattate con AA si osservavano solo rigonfiamenti.

L'esame ultrastrutturale ha confermato, sulle galle trattate con acqua, presenza di cellule polinucleate, intorno al nematode, con av-

Tabella I - *Effetto dell'acido ascorbico sulla crescita di piante di pomodoro e sulla riproduzione di Meloidogyne incognita (N).*

| Cultivar | Trattamenti (*) | Peso fresco radici/g | Peso secco radici/mg | Peso fresco pianta intera/g | Peso secco pianta intera/mg | N. nematodi/g radici |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Roma VF | H ₂ O | 1.473 | 73 | 5.683 | 478 | |
| | AA 15 mM | 1.496 | 98 | 5.050 | 503 | |
| | H ₂ O + N | 1.950 | 137 | 8.253 | 782 | 550 |
| | AA 15 mM + N | 1.345 | 81 | 5.115 | 600 | 94 |
| Marmande | H ₂ O | 2.108 | 170 | 8.976 | 977 | |
| | AA 15 mM | 1.760 | 167 | 7.466 | 825 | |
| | H ₂ O + N | 2.923 | 160 | 8.933 | 1.465 | 680 |
| | AA 15 mM + N | 1.828 | 110 | 7.456 | 660 | 120 |

(*) media di 4 esperimenti.

Tabella II - *Effetto dell'acido ascorbico sullo sviluppo di sincizi indotti da M. incognita in radici di pomodoro Roma VF.*

| Trattamenti (*) | N. galle/pianta | Area sincizio mm ² | N. nuclei/sincizio |
|------------------|-----------------|-------------------------------|--------------------|
| H ₂ O | 21,2 | 3,39 | 45 |
| AA 15 mM | 9,3 | 2,33 | 48 |

(*) media di 4 esperimenti.

viato processo di digitazione sulle pareti cellulari (Fig. 3a). Nel citoplasma di queste cellule erano presenti reticolo endoplasmico rugoso, ricco di materiale di secrezione, apparati del Golgi con accentuata proliferazione di vescicole e numerosi polisomi. Le cellule mononucleate, adiacenti a quelle polinucleate, mostravano nuclei ingrossati (Fig. 3b).

Sulle cellule delle radici trattate con AA, intorno al nematode, invece, non si è riusciti ad individuare processi di poliploidia. I nuclei di queste cellule erano ingrossati e lobati e, talvolta, fortemente ameboidi (Fig. 4a). Il citoplasma, pur presentandosi in attiva sintesi, in alcuni punti si mostrava alquanto disorganizzato (Fig. 4b). Tutte le cellule, intorno al nematode, mostravano processi di falsa plasmolisi (Fig. 4a).

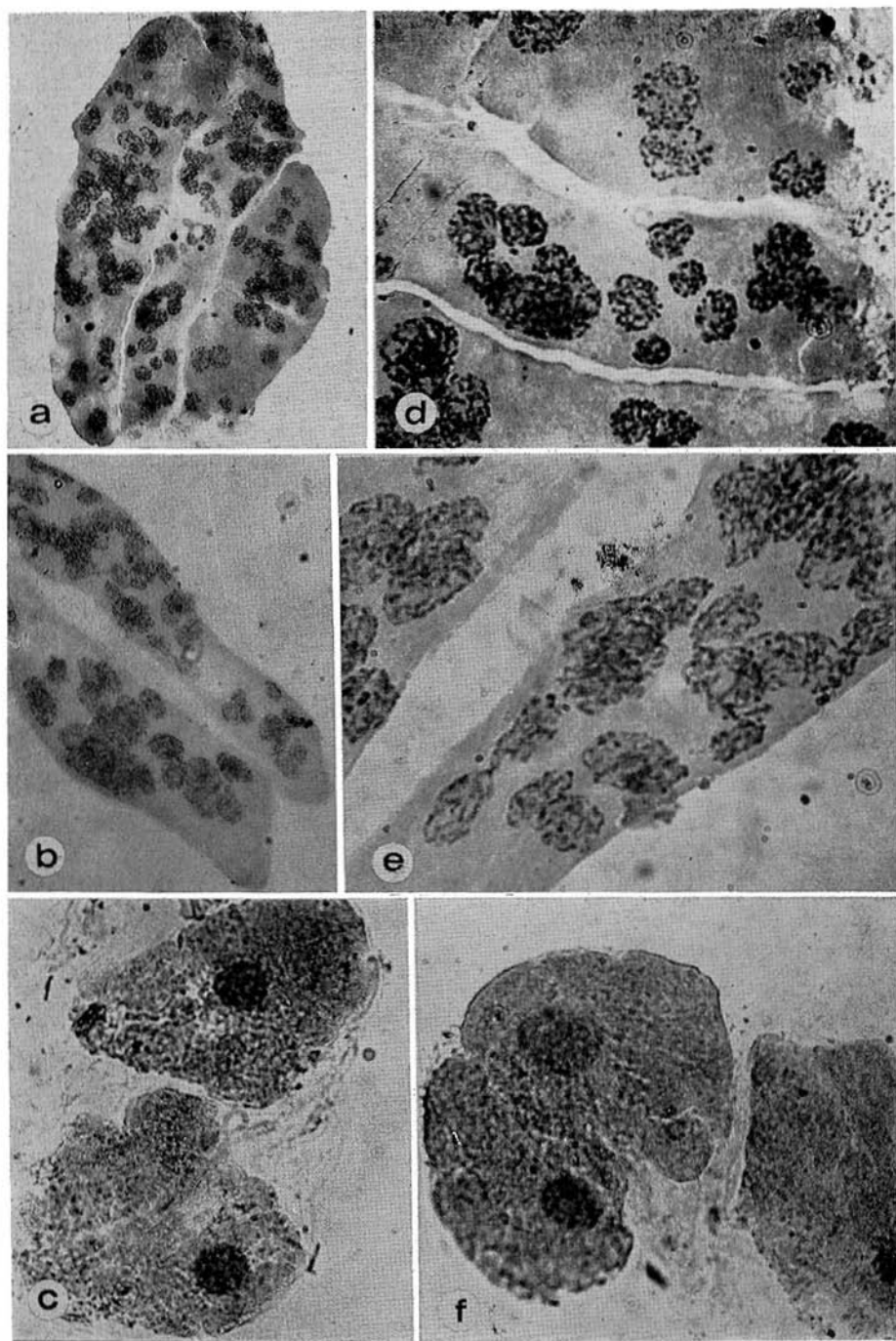


Fig. 2 - Syncizi isolati da galle di piantine di pomodoro Roma VF; dodici giorni dopo l'inoculo: a) ($\times 90$), d) ($\times 250$) trattati con acqua; b) ($\times 90$), e) ($\times 250$) trattati con AA; c, f) syncizi isolati da piantine trattate con acqua, tre giorni dopo l'inoculo ($\times 250$).

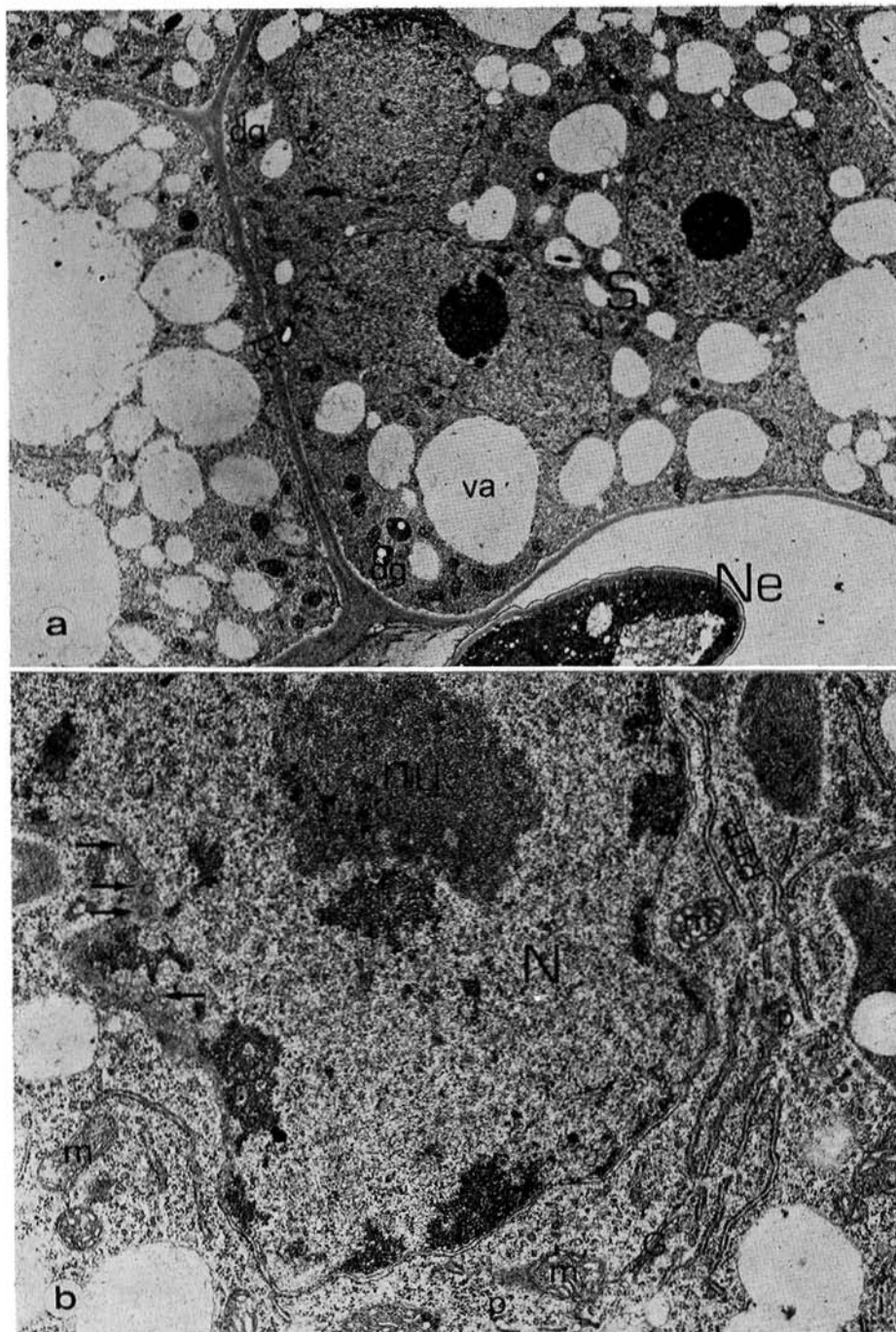


Fig. 3 - Sezioni al microscopio elettronico di una galla di radice trattata con acqua e inclusa tre giorni dopo l'inoculo: a) è in atto il normale sviluppo di un sincizio; si può osservare una cellula multinucleata (S), con numerosi piccoli vacuoli (va), adiacente al nematode (N). Sulle pareti cellulari (pe) è avviato il processo di crescita di parete (dg) ($\times 3,800$); b) cellula adiacente al sincizio: è visibile il nucleo (n) molto ingrossato con nucleolo (nu) e, sulla membrana nucleare, ben evidenti alcuni pori nucleari (freccia); si notano reticolo endoplasmico (RER), apparato del Golgi (G) e polisomi (p) in attiva sintesi e mitocondrio (m) ($\times 16,000$).

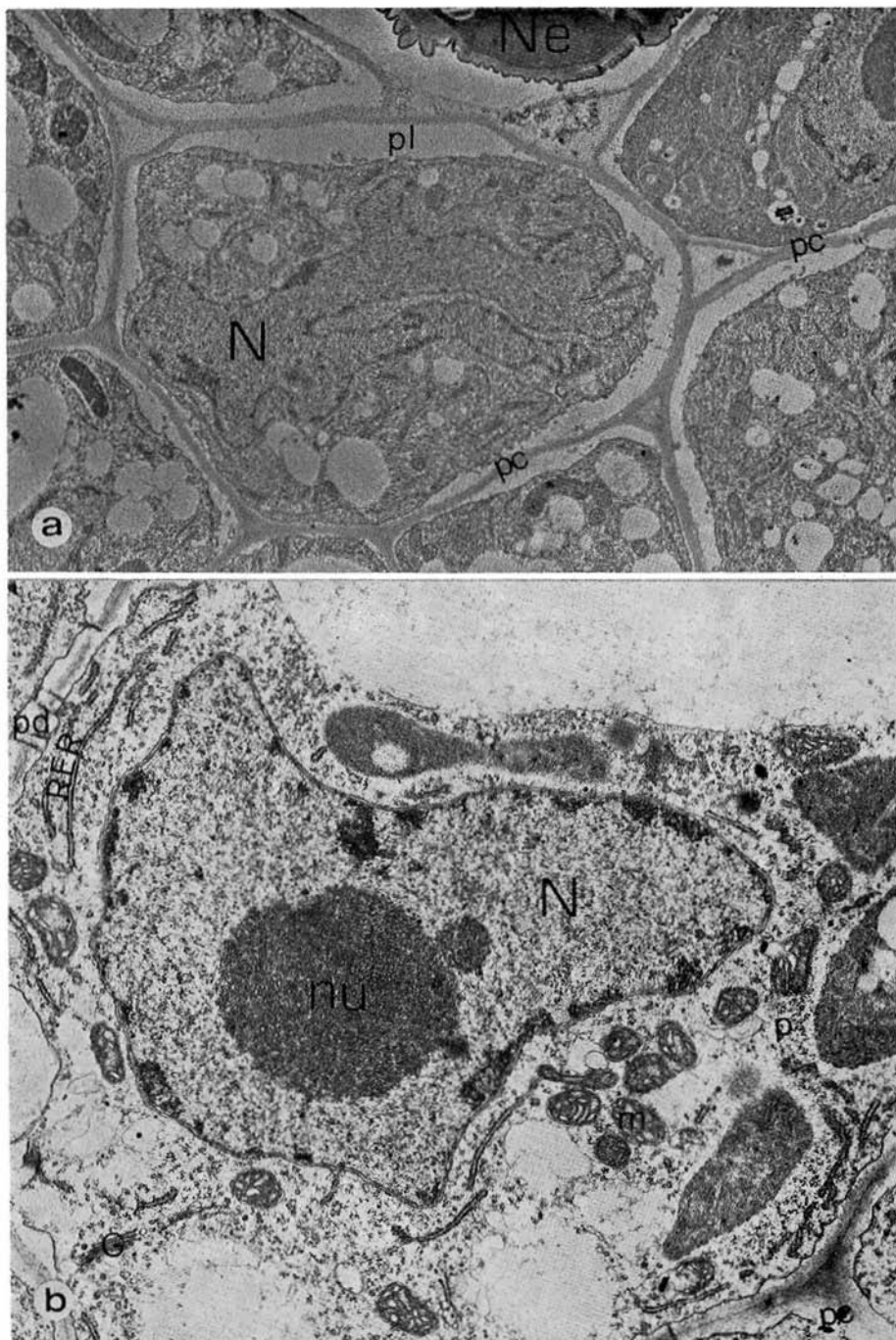


Fig. 4 - Sezioni al microscopio elettronico di radice di pomodoro, trattate con AA e prelevate tre giorni dopo l'inoculo: a) le cellule intorno al nematode mostrano processi di falsa plasmolisi (pl); si osserva una cellula con nucleo ameboide ($\times 6,400$); b) particolare di una cellula in cui è visibile il nucleo rigonfio, con nucleolo e cromatina sparsa. Nel citoplasma è in atto un processo di disorganizzazione; reticolo endoplasmico, apparato del Golgi e polisomi sembrano in attiva sintesi; sulla parete cellulare sono visibili plasmodesmi (pd) ($\times 14,000$).

Discussione

I risultati di questo lavoro indicano che l'acido ascorbico contrasta, in qualche modo, l'azione del nematode, durante le fasi di infestazione.

Questo è in accordo con dati precedentemente riportati, secondo cui la somministrazione, dall'esterno, di AA inibisce la formazione di noduli su radici di *Pisum sativum* (Tonzig e Bracci, 1951) e di lesioni su tabacco infettato con TMW (Farkas *et al.*, 1960). D'altra parte Arrigoni *et al.* (1979) hanno riportato che la somministrazione di questo composto a piante di pomodoro, suscettibili a *M. incognita*, limitava l'invasione, da parte del nematode, mentre un decremento del contenuto endogeno di AA, mediante somministrazione di licorina, su cultivar resistenti, favoriva la penetrazione del nematode stesso.

L'osservazione di numerosi sincizi, isolati da piante trattate con AA, ha messo in evidenza che essi hanno uno sviluppo simile a quelli isolati da piante cresciute in acqua, permettendo così la maturazione del nematode (Bird, 1975). Anche le mitosi, alle concentrazioni di AA usate, sembra mantengano il sincronismo. Tuttavia, il trattamento interferisce, per alcuni aspetti, sullo sviluppo del sincizio; infatti c'è una riduzione del numero di galle, insieme ad una diminuzione della superficie dei sincizi (Bleve-Zacheo e Melillo, 1982). L'azione dell'acido ascorbico si esplica, quindi, in un rallentamento della formazione di cellule poliploidi; infatti tre giorni dopo l'inoculo non si era ancora verificato il processo di formazione dei sincizi, già chiaramente avviato nelle cellule delle piante trattate con acqua.

Sulla base dei risultati, finora acquisiti, è molto difficile da definire a che livello agisca l'acido ascorbico; si può, tuttavia, ipotizzare che almeno due fatti interferiscano con lo sviluppo del sincizio: uno potrebbe essere l'alta concentrazione di AA, da noi somministrata che, interagendo con gli ioni metallici presenti nel terreno, porta alla produzione di radicali capaci o di ritardare la penetrazione del patogeno o addirittura di esplicare un'azione nematocida; l'altro fatto potrebbe essere che l'acido ascorbico venga utilizzato nella idrossilazione della prolina, presente su alcune catene polipeptidiche, che sono coinvolte nella respirazione cianuro-resistente e nei processi di lignificazione accelerata della parete cellulare (Zacheo *et al.*, 1977; Arrigoni *et al.*, 1977; Esquerrè-Tugayé *et al.*, 1979). L'azione dell'acido ascorbico non sembra allora esplicarsi in un'attività diretta ma, piut-

tosto, prendere parte ad un generale meccanismo di difesa, innescato dalla pianta contro il patogeno.

R I A S S U N T O

Piantine di pomodoro suscettibili sono state trattate con acido ascorbico (AA) e inoculate con *Meloidogyne incognita*. Dodici giorni dopo l'inoculo i sincizi sono stati isolati dalle galle e colorati con il reagente di Schiff. Le piantine, trattate con AA, presentavano un numero minore di galle, ed i sincizi risultavano più piccoli, rispetto alle piante controllo, trattate solo con acqua. Non sono state osservate differenze circa il sincronismo delle mitosi. Radici di piantine, esaminate tre giorni dopo l'inoculo, mostravano un normale sviluppo di galle nelle piante controllo, che non si era ancora verificato sulle piante trattate con AA. Questi risultati sono in accordo con dati, precedentemente riportati, secondo cui l'acido ascorbico è coinvolto nel meccanismo di difesa, messo in atto dalla pianta contro il nematode.

S U M M A R Y

Effect of ascorbic acid on giant cell formation in tomato plants susceptible to Meloidogyne incognita.

Seedlings of tomato cultivars susceptible to root-knot nematodes were treated with ascorbic acid (AA) and then inoculated with *Meloidogyne incognita*. Twelve days later syncytia were dissected from the galls and stained in Schiff's reagent. Plants treated with AA had fewer galls and syncytia were smaller than in the control plants, treated only with tap water. No differences were observed with regard to synchrony of mitosis. Roots examined three days after inoculation showed no syncytia in treated plants and normal development of giant cells in the controls. The results support those previously reported, which demonstrated the role of ascorbic acid in the biological defence mechanisms in plants.

L A V O R I C I T A T I

- ARRIGONI O., ARRIGONI-LISO R. e CALABRESE G., 1977 - Ascorbic acid requirement for biosynthesis of hydroxyproline-containing proteins in plants. *FEBS Letters*, 82: 135-138.
- ARRIGONI O., ZACHEO G., ARRIGONI-LISO R., BLEVE-ZACHEO T. e LAMBERTI F., 1979 - Relationship between ascorbic acid and resistance in tomato plants to *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, 69: 579-581.
- ARRIGONI O., DI PIERRO S. e BORRACCINO G., 1981 - Ascorbate free radical reductase, a key enzyme of the ascorbic acid system. *FEBS Letters*, 125: 242-244.
- BIRD A. F., 1973 - Observations on chromosomes and nucleoli in syncytia induced by *Meloidogyne javanica*. *Physiol. Plant Pathol.*, 3: 387-391.
- BIRD A. F., 1975 - Symbiotic relationships between nematodes and plants. Symposium of the Society for Experimental Biology, No. XXIX, University Press, Cambridge, pp. 351-371.
- BLEVE-ZACHEO T. e MELILLO M. T., 1982 - Effect of lycorine and ascorbic acid on giant cells induced in tomato plants by *Meloidogyne incognita*. XVIth Int. Symp. ESN, St. Andrews, Scozia, 30 Agosto - 3 Settembre 1982, p. 83.

- DAWSON C. R. e MAGEE R. J., 1955 - Ascorbic acid oxidase. In: *Methods in Enzymology*. (Colowick S. P. e Kaplan N. O., Eds.), Vol. II, Acad. Press, London, N. Y., San Francisco, pp. 831-835.
- EDGAR J. A., 1970 - Dehydroascorbic acid and cell division. *Nature*, 227: 24-26.
- ESQUERRÉ-TUGAYÉ M. T., LAFITTE C., MAZAU D., TOPPAN A. e TOUZÈ A., 1979 - Cell surfaces in plant-microorganism interactions. *Plant Physiol.*, 64: 320-326.
- FARKAS G. L., KYRALY Z. e SOLYMOSY F., 1960 - Role of oxidative metabolism in the localization of plant viruses. *Virology*, 12: 408-421.
- GEROLA F. M. e LANDI G., 1956 - Ricerche sulla fisiologia delle piante virosate. I. Contenuto in acido ascorbico nelle foglie di *Spinacia oleracea* affette da mosaico del cetriolo. *Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Sc. Fis. Sez. VIII*, 20: 89-94.
- LISO R., CALABRESE G., BITONTI M. B. e ARRIGONI O., 1983 - Relationship between ascorbic acid and cell division. *Exp. Cell. Res.*, In corso di stampa.
- OGATA K., YAMAUCHI N. e MINAMIDE T., 1975 - Physiological and chemical studies on ascorbic acid of fruits and vegetables. I. Changes of ascorbic acid content during maturation and storage period in Okuras. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.*, 44: 192-196.
- TONZIG S. e BRACCI L., 1951 - Ricerche sulla fisiologia dell'acido ascorbico. VI. Attività tubercoligena del *Rhizobium leguminosarum* e acido ascorbico. *N. Giorn. Bot. Ital.*, 58: 258-270.
- VAN LELYVELD L. J., 1975 - Ascorbic acid content and enzyme activities during maturation of the mango fruit and their association with bacterial black spot. *Agroplanta*, 7: 51-54.
- YAMAUCHI M. e JOSLYN M. A., 1952 - Purification and properties of dehydroascorbic acid reductase of peas (*Pisum sativum*). *Acad. Biochim. Biophys.*, 38: 451-465.
- YAMAUCHI M. e OGATA K., 1978 - Physiological and chemical studies on ascorbic acid of fruits and vegetables. III. The characteristics of oxidized ascorbate reductase and changes of the enzyme activity during storage of fruits and vegetables. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.*, 47: 121-127.
- ZACHEO G., LAMBERTI F., ARRIGONI-LISO R. e ARRIGONI O., 1977 - Mitochondrial protein-hydroxyproline content of susceptible and resistant tomatoes infected by *Meloidogyne incognita*. *Nematologica*, 23: 471-476.
- ZACHEO G., ARRIGONI-LISO R., BLEVE-ZACHEO T., LAMBERTI F., PERRINO P. e ARRIGONI O., 1981 - Changes of ascorbate free radical reductase in pea roots infested by *Heterodera goettingiana*. *Nematol. medit.*, 9: 181-187.

Accettato per la pubblicazione il 18 Giugno 1983.