

GIANNI FACCIOLI e CONCEPTION RUBIES-AUTONELL

Istituto di Patologia Vegetale, Università di Bologna

Resistenza all'infezione da TNV indotta dall'acido poliacrilico
in piante di Chenopodium amaranticolor

Introduzione

L'acido poliacrilico (PA) impiegato nei sistemi animali ha, come altri polianionici, un effetto antivirale dovuto alla sua capacità di indurre la formazione di interferone (Merigan e Finkelstein, 1968; De Clercq et al., 1970). Nei vegetali il prodotto ha conferito resistenza verso varie infezioni virali (Gianninazzi e Kassanis, 1974; Kassanis e White, 1975; Cassel e Flynn 1978; Cassel et al. 1978; Antoniow e White, 1980 ecc.) e spiegazioni sul suo meccanismo di azione sono state ricercate sia nella formazione, in foglie PA trattate, delle b proteine che agirebbero in maniera simile all'interferone (Gianninazzi e Kassanis, 1974), che nella variazione di turgore cellulare da esso provocata e responsabile della diminuzione dei "siti infettabili" (Cassel et al., 1978).

Da piante di C. amaranticolor infettate localmente con virus delle necrosi del tabacco (TNV), diventate parzialmente resistenti ad una successiva infezione dello stesso, abbiamo isolato un fattore antivirale(i) (AVF), di cui abbiamo provato la capacità di conferire resistenza alle piante (Faccioli e Capponi, 1983).

Tale fattore(i), aveva caratteristiche in comune con l'interferone quali, la natura chimica (glicoproteina), la aspec-

ficità di azione verso le infezioni virali e il fatto che sia trattamenti con l'attinomicina D (AMD) (ibid.), che con vitamina A (Faccioli e Rubies-Autonell, 1982) ne impedivano la formazione. Ci è sembrato perciò utile determinare se si potesse conferire resistenza alle piante con PA, invece, che con inoculi di TNV e se il polianionico fosse in grado di stimolare la formazione di AVF nel nostro sistema, come era in grado di indurre la produzione di interferone nelle cellule animali.

Materiali e metodi

Per le prove in oggetto è stato impiegato un polimero dello acido poliacrilico di basso peso molecolare (3500 D): Versicolor E₅ (Allied Colloids, Bradford, UK).

Le piante di C. amaranticolor Coste e Reyn. erano allevate in serra condizionata ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e le foglie per gli esperimenti erano prelevate quando le piante erano allo stadio di 8-10 foglie sviluppate. Queste ultime venivano suddivise a metà, eliminando la nervatura principale, e metà veniva immersa in soluzioni di PA di diversa concentrazione (0,05, 0,10, 0,50, 1, 5, 10 e 20 mg/ml) tamponate a pH 6.0 con NaOH 1N. Le metà opposte erano immerse in acqua distillata. Dopo infiltrazione sotto vuoto (10 mm di Hg) per 2h, le mezze foglie erano lavate con acqua distillata e poste in camera umida, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e illuminazione artificiale (3000 lux, tubi Fluora 77 R Osram e fotoperiodo di 16 h). A 24, 48 e 72 h dall'infiltrazione lotti diversi di queste venivano inoculate con una sospensione purificata (0,2 mg/ml) di un ceppo di TNV isolato da fragola (Faccioli 1974) e, infine, rimesse in camera umida, fino all'apparizione delle necrosi locali (circa 4 giorni). Il numero di lesioni presenti su ogni mezza foglia era determina-

to con un contacolonia batterico (LMMP Terzano).

Per il calcolo della significatività dei dati si è usato il "t" test di Student (Lison, 1951).

Risultati e Discussione

In generale si può dire che il PA ha ridotto il numero di lesioni locali provocate dall'inoculo di TMV ma, nelle dosi più basse (0,05-0,20 mg/ml), tale differenza, poco marcata, non è mai risultata significativa per tutti i tempi di somministrazione del prodotto. Nelle dosi comprese fra 0,25 e 1 mg/ml, invece, si è verificato un effetto di parziale protezione delle foglie dall'infezione virale (Tab. 1).

La dose di maggior efficacia è risultata essere quella di 1 mg/ml che ha ridotto l'infezione virale di oltre il 30%. Concentrazioni maggiori del prodotto non hanno significativamente protetto le foglie, salvo quella di 5 mg/ml infiltrata 24 h prima dell'inoculo. Ciò fa pensare che, a queste concentrazioni, il PA diventi tossico per le cellule influenzando negativamente i processi metabolici in generale.

Nelle dosi efficaci del prodotto non si sono notate differenze di azione degne di nota, in relazione al tempo di applicazione e ciò sembra indicare che per ottenere l'effetto è sufficiente somministrare il PA 24 h prima della penetrazione del virus. In questo, i nostri risultati si differenziano da quelli trovati da Gianninazzi e Kassanis (1974) che avevano notato effetti decrescenti infiltrando il PA da 72 a 18 h prima dell'inoculo di TMV su tabacco. E anche vero, però, che gli stessi riportano un'inversione del fenomeno fra le 18 e le 0 h.

Verificata l'azione protettiva del PA, per vedere se il

Tab. 1 - Effetto di varie concentrazioni di PA, infiltrate a tempi diversi prima della inoculazione, sul numero di lesioni per mezza foglia provocate da inoculo di TNV su foglie di C. amaranticolor (medie di 44-57 ripetizioni di 5-6 esperimenti).

TIPO DI TRATTAMENTO	ORE DALL' INOCULO											
	- 24				- 48				- 72			
	N° lesioni (M + Em)	"t" calc.	riduz. %	N° lesioni (M + Em)	"t" calc.	riduz. %	N° lesioni (M + Em)	"t" calc.	riduz. %	N° lesioni (M + Em)	"t" calc.	riduz. %
PA (0,25 mg/ml) H ₂ O	66,85 ± 4,00 88,73 ± 6,85	2,76**	24,7	62,07±4,14 74,02±4,83	1,88**	16,2	62,13±3,40 74,91±5,21	2,05*	17,1			
PA (0,50 mg/ml) H ₂ O	70,65 ± 4,73 88,32 ± 5,78	2,37*	20,0	76,60±5,49 96,46±6,48	2,34*	20,7	58,76±3,66 68,77±3,39	2,01*	14,6			
PA (1,0 mg/ml) H ₂ O	66,64 ± 4,79 96,18 ± 7,66	3,27**	30,7	51,58±3,97 75,14±5,16	3,62**	31,4	56,0 ±3,56 82,15±5,97	3,76**	31,8			
PA (5 mg/ml) H ₂ O	49,06 ± 4,59 64,15 ± 5,24	2,17*	23,5	38,49±5,33 45,07±6,39	0,79	14,6	37,13±3,91 45,56±4,16	1,48	18,5			

*significativo per P = 0,05 , **significativo per P = 0.01

Tab. 2 - Numero di lesioni locali causate da inoculo di TMV su foglie di *C. amaranticolor* che hanno previamente assorbito estratti crudi di foglie infiltrate con PA, foglie infiltrate con acqua e tampone (Esp. A, medie di 6 ripetizioni) e infettività delle suddette foglie determinata per reinoculo su mezze foglie dello stesso tipo di pianta (Esp. B, medie di 10 ripetizioni).

Tipo di Esp.	Prodotto assorbito da foglie inoculate (Esp. A) e fonte di reinoculo (Esp B)	N° di lesioni (M ± Em)	"t" calc.	riduz. %
A ₁	Crudo foglie Pa-infiltrate: 1 Crudo foglie H ₂ O-infiltrate: 2	188,50±5,30 310,33±9,45	12,90**	39,3
A ₂	Crudo foglie PA-infiltrate: 1 Tampone : 3	188,50±5,30 409,50±7,26	24,59**	54,0
A ₃	Crudo foglie H ₂ O-infiltrate: 2 Tampone : 3	310,33±9,45 409,50±7,26	8,32**	24,2
B ₁	Foglie trattate con 1 " " con 2	104,20±3,50 163,80±5,47	9,18**	36,4
B ₂	Foglie trattate con 1 " " con 3	117,30±5,43 240,80±10,22	10,67**	51,3
B ₃	Foglie trattate con 2 " " con 3	153,50±7,07 220,30±11,36	4,99**	30,4

** = significativo per P = 0,01

meccanismo di azione dello stesso si esplicasse per la sua capacità di indurre la formazione di AVF, foglie di C. amaranticolor sono state infiltrate per 12 h con una soluzione del prodotto (1 mg/ml), lasciate per 2 giorni in camera umida a illuminazione artificiale e, dalle stesse, è stato poi estratto l'AVF crudo con calcio fosfato idrato (HCP; Fulton, 1959), come già da noi descritto (Faccioli e Capponi, 1983). Una estrazione simile è stata fatta anche da foglie infiltrate con acqua (crudo di controllo). Sospensioni dei due estratti (2 mg/ml) sono state poi fatte assorbire, attraverso i piccioli, a foglie di C. amaranticolor per 8 h. Ad altre foglie è stato fatto assorbire semplice tampone come controllo. Dopo inoculo con TNV e ulteriore assorbimento degli estratti per 40 h, all'apparizione delle lesioni locali, mezza foglie venivano conservate per contare le lesioni e le mezza foglie opposte venivano macerate in tampone e ultracentrifugate (150.925 g per 1 h). I sedimenti risospesi in tampone, erano inoculati col metodo della mezza foglia per compararne l'infettività.

I risultati ottenuti dimostravano chiaramente che nelle foglie trattate con PA si era stimolata la produzione di AVF. L'estratto relativo aveva infatti parzialmente protetto le foglie a cui era stato fatto assorbire, conferendogli nei riguardi delle foglie che avevano assorbito estratto di foglie infiltrate con acqua, una parziale resistenza: riduzione del 39% nel numero di lesioni locali e del 36% nella biosintesi virale (Tab. 2, Esp. A₁ e B₁). Paragonando questi dati con quelli ottenuti per foglie che avevano assorbito tampone (Tab. 2, Esp. A₂, B₂ e B₃), si poteva constatare che entrambe gli estratti avevano conferito una parziale resistenza alle foglie, ma quello di foglie trattate con PA aveva una attività quasi doppia: 54 contro il 24% in riduzione del numero di lesioni

locali e 51 verso il 30% in riduzione di biosintesi virale.

Questo fenomeno, già da noi osservato per foglie TNV-infette e inoculate con tampone (Faccioli e Capponi, 1983), fa pensare che anche nelle piante sane esista un meccanismo di formazione di sostanze antivirali. In piante infette e PA trattate o tale meccanismo è stimolato, o potrebbe subentrarne uno de novo che presieda alla formazione dell'AVF specifico già da noi descritto (ibid.). Il parallelismo di azione fra inoculo virale e PA ci sembra evidente e ci fa ricordare che un fenomeno simile avviene anche nei sistemi animali con la formazione di interferone (Merigan e Filkenstein, 1968). L'acquisizione di resistenza, da parte di piante diverse trattate con PA, è stata riportata per vari virus: TMV (Stein e Lobenstein, 1972; Gianninazzi e Kassanis, 1974; Kassanis e White, 1975, Cassel e Flynn, 1978; Cassel et al., 1978; Antoniw e White 1980), mosaico del trifoglio rosso (RCMV; Kluge e Marcinka, 1979), mosaico del cetriolo (CMV), maculatura anulare del tabacco (TRSV) e foglia riccia del Pelargonio (PLCV) (Cassel e Flynn, 1978), TNV (Gianninazzi e Kassanis, 1974 ; Coutts e Wagih, 1983), PVX (Gianninazzi e Kassanis, 1974), ecc. Le ipotesi avanzate sul suo meccanismo di azione sono state sostanzialmente due. Quella di Gianninazzi e Kassanis (1974) che, osservando in foglie resistenti di piante trattate con PA la formazione di b-proteine, ritrovabili anche in foglie resistenti di piante virus inoculate, attribuivano alla loro presenza l'acquisizione di resistenza.

Quella di Cassel et al. (1978) che, constatando una diminuzione di turgore cellulare in foglie PA trattate e diventate resistenti e stabilendo che un antitraspirante aboliva tale resistenza, proponevano tale diminuzione di turgore come causa di riduzione dei "siti infettabili", accessibili al virus. Cosa, quest'ultima, già del resto constatata in precedenti

za (Panzer, 1957; Kimmings e Litz, 1967).

Il ruolo delle b-proteine (o pathogenesis related proteins=PR: Antoniwi e White, 1980), nell'acquisizione di resistenza è stato fortemente posto in dubbio perchè, oltre al fatto che la loro azione non è mai stata dimostrata, esse sono state ritrovate in piante sane all'epoca della fioritura (Fraser, 1981) e in piante virus inoculate diventate più suscettibili all'infezione virale (Fraser, 1982) e non sono state trovate, invece, in foglie diventate resistenti a seguito di trattamenti chimici (Fraser, 1982) o inoculazione virale (Coutts e Wagih, 1983). Nel nostro caso siamo stati in grado di dimostrare che il polianionico conferisce resistenza, stimolando la formazione di AVF, ma ciò non esclude l'ipotesi che esso riduca anche il numero di siti infettabili ed agisca, quindi, in maniera complessa.

Il recente isolamento di altri AVF da varie coppie di virus-pianta ospite da noi effettuato (Capponi et al., 1984) fa pensare che il fenomeno sia diffuso e che in casi prima citati di acquisizione di resistenza da PA almeno parte di questa possa essere dovuta alla formazione di AVFs. Ciò fa intravedere la possibilità pratica di stimolare chimicamente le piante, per indurre la formazione di questi ultimi, o addirittura di "trattarle" con AVFs estratti in laboratorio, onde conferirgli una resistenza alle infezioni virali.

Riassunto

Infiltrando foglie di C. amaranticolor con acido poliacrilico (PA di 3500 D: 1 mg/ml) 72,48 e 24 ore prima dell'inoculazione di TNV, si è constatata l'acquisizione da parte

delle foglie di una parziale resistenza all'infezione virale: riduzione del numero di lesioni locali del 30-32% rispetto al controllo (foglie infiltrate con acqua). Estrahendo dai 2 tipi di foglie gli eventuali fattori antivirali presenti (AVFs: Faccioli e Capponi 1983), facendoli assorbire da altre foglie e inoculando queste ultime, si è osservato che l'estratto di foglie trattate con PA causava, rispetto all'altro estratto, una riduzione di infezione virale del 39% (n. di les. locali) e una riduzione di biosintesi virale (infettività) del 36%. Sembra logico perciò supporre che la resistenza conferita dal PA sia dovuta, almeno in parte, alla sua capacità di indurre la formazione di AVF. In questo senso il polianionico sembra agire come nei sistemi animali, a cui conferisce resistenza alle infezioni virali inducendo la formazione di interferone.

Summary

Resistance towards TNV infection induced by polyacrylic acid in *Chenopodium amaranticolor* plants

When leaves of *C. amaranticolor* were infiltrated with polyacrylic acid (PA of 3500 D: 1 mg/ml) 72, 48 and 24 h before TNV inoculation, a partial resistance of such leaves towards the virus infection was experienced: 30-32% reduction of local lesion number, with respect to the control (water-infiltrated leaves).

If the possibly present antiviral factors (AVFs) extracted from the two types of leaves (Faccioli e Capponi, 1983) were absorbed by other *C. amaranticolor* leaves, and this last were TNV inoculated, it resulted that the extract of PA infiltrated leaves reduced by 39% the virus infection, (nr. of lo-

cal lesions) and by 36% TNV biosynthesis (infectivity), with respect to the control extract (water infiltrated leaves).

It seems therefore logical, to hypothesize that PA conferred resistance was due to its capability of inducing AVF production. From this point of view, the polyanionic seems to behave as in animal systems, to which confers virus resistance through interferon formation.

Bibliografia

ANTONIW J.F., WHITE R.F. (1980). The effects of aspirin and polyacrylic acid on soluble leaf proteins and resistance to virus infection in five cultivars of tobacco. *Phytopath. Z.* 98, 331-341.

CAPPONI R., FACCIOLI G., MONTANARI A. (1984). Produzione di fattori antivirali (AVFs) in piante virus infette. *Atti Giornate Fitopatologiche.*

CASSEL A.C., FLYNN T. (1978). Studies on poly(acrylic acid) induced resistance to viral and non-viral plant pathogens. *Pestic. Sci.* 9, 365-371.

CASSEL A.C., BARNETT A., BARLASS M. (1978). The effect of polyacrylic acid treatment on the susceptibility of Nicotiana tabacum cv. Xanthi-nc to tobacco mosaic. *Physiol. plant Path.* 13, 13-21.

COUTTS R.H.A., E.E. WAGIH (1983). Induced resistance to viral infection and soluble protein alterations in cucumber and cowpea plants. *Phytopath. Z.* 107, 57-69.

DE CLERQ E., ECKSTEIN F., MERIGAN T.C. (1970). Structural requirements for synthetic polyanions to act as interferon inducers. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 173, 444-461.

FACCIOLI G. (1974). Identificazione e caratteristiche fisico-chimiche di un ceppo di virus della necrosi del tabacco isolato da fragola (*Fragaria vesca* L.) e della sua variante instabile. *Phytopath. medit.* 8, 162-170.

FACCIOLI G., RUBIES-AUTONELL C. (1982). Action of vitamin A on biosynthesis of tobacco necrosis virus (TNV) in locally-infected leaves of *Chenopodium amaranticolor*. *Phytopath. medit.* 21, 1-4.

FACCIOLI G., CAPPONI R. (1983). An antiviral factor present in locally infected by Tobacco necrosis virus: 1. Extraction, partial purification, biological and chemical properties. *Phytopath. Z.* 106, 289-301.

GIANNINAZZI S., KASSANIS B. (1974). Virus resistance induced by polyacrilic acid. *J. gen. Virol.* 23, 1-9.

KASSANIS B., WHITE R.F. (1975). Effect of polyacrilic acid and b proteins on TMV multiplication in tobacco protoplasts. *Phytoph. Z.* 91, 268-272.

KIMMINGS W.C., LITZ R.E. (1967). The effect of water balance

on susceptibility of French bean leaves to tobacco necrosis virus. Can J. Bot. 45, 2115-2118.

KLUGE S., MARCINKA K. (1979). The affect of polyacrylic acid and virazole on the replication and component formation of Red clover mottle virus. Acta virol. 23, 148-152.

LISON L. (1961). Statistica applicata alla biologia sperimentale, pp. 381. Ambrosiana publ. Co., Milano.

MERIGAN T.C., FINKELSTEIN M.S. (1968). Interferon-stimulating and in vivo antiviral effects of various synthetic anions polymers. Virology 35, 363-374.

PANZER J.D. (1957). Osmotic pressure and plant virus local lesions. Phytopathology 47, 337-341.

STEIN A., LOEBENSTEIN G. (1972). Induced interference by synthetic polyanions with the infection of Tobacco mosaic virus. Phytopathology 62, 1461-1466.