

BELLARDI M.G., CANOVA A., TACCONI R.^{*}, GELLI C.

Istituto di Patologia vegetale - Università degli Studi - BOLOGNA

*Osservatorio per le Malattie delle piante - Regione Emilia-Romagna - BOLOGNA

ROTTURA DI COLORE DEL FIORE DI GLADIOLO ASSOCIATA AL VIRUS DELLA MACULATURA ANULARE LATENTE DELLA FRAGOLA (SLRV).

La "rottura" di colore dei petali nel fiore di gladiolo (Gladiolus spp.) è una manifestazione patologica piuttosto frequente negli svariati areali di coltivazione della specie da fiore, attribuibile a virus o ad agenti virus-simili diversi. L'infezione del virus del mosaico del cetriolo (CMV), del virus del mosaico giallo del fagiolo (BYMV), del virus della maculatura anulare del tabacco (TRSV) e di quello della maculatura anulare del pomodoro (ToRSV), sono state più volte notificate (vedi tra gli altri Hull, 1965; Rana, 1976), indurre l'alterazione cromatica nei petali.

Indipendentemente dalla contestuale presenza di alterazioni morfologiche e strutturali dei medesimi elementi del verticillo fiorale, e/o di altre parti del fiore, la "rottura" di colore incide negativamente sulle caratteristiche estetiche e di altro genere del fiore stesso, deprezzandone il valore merceologico. L'alterazione cromatica in parola è stata da noi riscontrata in piante di gladiolo, provenienti dall'assortimento commerciale, portanti fiori i cui petali manifestavano striature chiare, quasi bianche, ben evidenti sul fondo color rosa-salmone, e foglie interessate da leggera mosaicatura della lamina.

MATERIALI E METODI

Inoculi preliminari sono stati eseguiti macerando in mortaio pezzetti di foglie e petali di gladiolo in presenza di tampone fosfatico 0,1M, pH 7, ed inoculando il succo ottenuto su foglie di Chenopodium amaranticolor Coste et Lavoro eseguito con un contributo del CNR nell'ambito del P.F. I.P.R.A. - Sottoprogetto 1. Pubblicazione N. 92.

Reyn e C. quinoa Willd. precedentemente cosparse di carborundum da 600 mesh. Entrambe le specie sono state utilizzate per ulteriori prove sperimentali.

Le proprietà fisiche del virus in vitro: grado d'inattivazione termica, punto di diluizione limite e durata di conservazione in vitro, sono state determinate secondo le usuali tecniche del caso.

Le prove di trasmissione dell'entità virale alle comuni specie differenziali di saggio sono state effettuate mediante inoculazione meccanica con succo infetto di C. amaranticolor. Le piante di saggio erano allevate in serra condizionata ed ombreggiata alla temperatura di circa 24-25°C.

La purificazione del virus è stata eseguita con successo seguendo il metodo adottato da Credi R. et al. (1981) e completata mediante centrifugazione in gradienti di densità di saccarosio (10-40%). I tubi di gradiente sono stati analizzati alla luce ultravioletta a 254 nm e le frazioni virali sono state raccolte individualmente con frazionatore ISCO 640. Allo spettrofotometro (Gilford 2400 S) sono stati determinati, inoltre, gli spettri d'assorbimento in UV sia del virus purificato non frazionato, che delle singole frazioni virali calcolandone i rapporti di assorbimento alle lunghezze d'onda caratteristiche: E_{\max} ; E_{\min} ; E_{280}/E_{260} ; E_{260}/E_{280} ; E_{\max}/E_{\min}

Le varie componenti virali, inoltre, sono state inoculate separatamente su piante test per le prove d'infettività, ed in parte colorate negativamente con il 2% di acido fosfotungstico (PTA), tamponato a pH7, per esaminarle al microscopio elettronico (Hitachi HS-75).

Le prove sierologiche d'identificazione sono state eseguite con il metodo della doppia diffusione in piastra di agarose. Per l'ottenimento dell'antisiero specifico il virus purificato ed omogeneizzato con adiuvante completo di Freund's, è stato utilizzato per una serie di iniezioni su coniglio (la 1^a endovena e 3 intramuscolari) ad intervalli di una settimana circa l'una dall'altra. Il titolo dell'antisiero specifico prodotto è stato determinato sempre in gel di agarose.

Una popolazione di Xiphinema diversicaudatum Micql estratta da terreno proveniente dal Piemonte) è stata messa a contatto di radici infette di C. amaranticolor poste all'interno di una scatola Petri contenente acqua di rubinetto.

Dopo 48 ore , durante le quali é stato possibile osservare il nematode portarsi in prossimità di peli radicali e pungerli ripetutamente, le radici stesse sono state rimosse. L'acqua, invece, con gli X.diversicaudatum venivano posti a contatto di radici di C.amaranticolor sani, cresciuti in vaso all'interno di una serra condizionata ed ombreggiata (T min = 22,5°C; T max = 23,5°C). Dopo 4 giorni sono state prelevate alcune foglie dagli stessi Chenopodi per eseguire inoculi meccanici su altri C.amaranticolor sani, allevati in serra. Tale operazione, di prelievo di foglie e di successivi inoculi, é stata eseguita altre 3 volte, ad intervalli di tempo di un mese circa (28/7; 23/8; 20/9/1983).

RISULTATI

I risultati delle prove di trasmissione del virus proveniente da gladio sulle piante di saggio vengono riassunti nella Tabella 1.

Il succo di piante infette di C.amaranticolor ha perso l'infettività alla diluizione compresa tra 10^{-5} e 10^{-6} e dopo 6 giorni di conservazione a temperatura ambiente (22-23°C). Inoltre, conservando foglie della Chenopodiacea in congelatore (-20°C), dopo 35 settimane il virus, inoculato su alcune piante-test, provocava sul 30% di esse la sintomatologia normalmente registrata. Il grado d'inattivazione termica é risultato compreso tra 51 e 55°C.

La sospensione virale parzialmente purificata e centrifugata in gradienti lineari di saccarosio ha dato luogo alla formazione di 4 frazioni sedimentanti a diverse velocità (Fig. 1). La prima di esse (P) era costituita dalle componenti proteiche normali della pianta ospite ancora presenti; le altre frazioni si sono rivelate quelle tipiche dei virus appartenenti al gruppo NEPO:Top (T); Middle (M) e Bottom (B) (Francki e Hatta, 1977). In particolare la frazione (T) mostrava uno spettro di assorbimento analogo a quello di una proteina ($A_{\max} 278, A_{\min} 250$) ed era formata, infatti, quasi esclusivamente da particelle non infettive e totalmente penetrate da PTA. La componente (M) aveva invece rapporti di assorbimento tipici di una nucleoproteina con $A_{\max} 260, A_{\min} 242$; ciò vale anche per l'ultima frazione (B) con $A_{\max} 260, A_{\min} 240$ (Fig. 2). Gli inoculi separatamente eseguiti con queste due ultime frazioni (M) e (B) hanno rivelato la minor capacità infettiva di (M) rispetto a (B), seppure i sintomi

Tabella 1 - Piante ospiti del virus isolato da gladiolo con 'rottura' di colore del fiore

FAMIGLIA E SPECIE	INFEZIONE LOCALE	INFEZIONE SISTEMICA
AIZOACEAE		
<i>Tetragonia expansa</i> (Thunb)	-	-
AMARANTACEAE		
<i>Gomphrena globosa</i> L. "Flore pieno"	lesioni necrotiche	-
CARYOPHYLLACEAE		
<i>Dianthus chinensis</i> L. "Géant d. varié"	-	-
<i>D. barbatus</i> L. "Mélange extra"	lesioni necrotiche	-
CHENOPODIACEAE		
<i>Beta vulgaris</i> L.	les. necr.; anelli necr.	-
<i>C. amaranticolor</i> Coste et Reyn.	les. clorotiche	mosaico, accur., malf.
<i>C. murale</i> L.	c.s.	c.s.
<i>C. quinica</i> Willd	c.s.	c.s.
<i>Spinacia oleracea</i> L. "Vyro flay"	les. cloro-necrotiche	-
COMPOSITAE		
<i>Lactuca sativa</i> L. "Regina di maggio"	-	-
<i>Zinnia elegans</i> Jacq. "Bougie nain"	infezione latente	infezione latente
CUCURBITACEAE		
<i>Cucumis sativus</i> L. "Delicatezza"	-	-
" " "Marketer"	-	-
" " "Lungo cinese"	-	-
<i>Citrullus vulgaris</i> "Klondike"	-	-
LABIATAE		
<i>Ocimum basilicum</i> L. "Foglia di lattuga"	-	-
LEGUMINOSAE		
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. "Saxa"	lesioni necrotiche	necr. nervale, bol- losità, deform. foglie
<i>Tripholium pratense</i> L.	mosaico, deform. fogliare	-
<i>Vicia faba</i> L.	-	-
<i>Vigna sinensis</i> L. "Black eye"	lesioni necrotiche	crescita stentata, mosaico
SOLANACEAE		
<i>Capsicum annuum</i> L. "Yolo B"	-	-
<i>Datura stramonium</i> L. "Godronii"	anelli necrotici	-
<i>Nicotiana clevelandii</i> Gray	infezione latente	infezione latente
<i>N. glutinosa</i> L.	lesioni necrotiche	-
<i>N. tabacum</i> L. "White Burley"	mosaico e/o anelli clor.	-
" " "Samsun"	-	-
" " "Xanthi"	-	-
<i>Petunia hybrida</i> hort. "Fire chief"	infezione latente	infezione latente
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	-	-
UMBELLIFERAE		
<i>Apium graveolens</i> L.	lesioni necrotiche	-

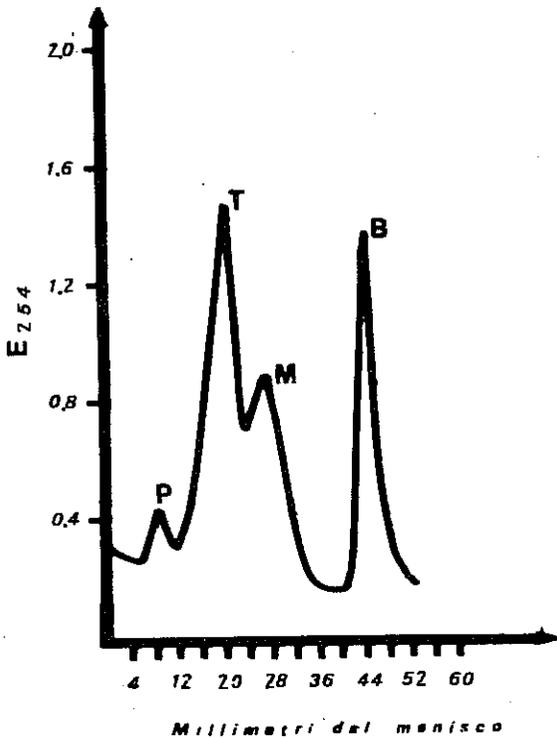


Fig. 1

Diagramma di sedimentazione di SLRV-gladiolo dopo centrifugazione in gradiente di densità di saccarosio:

P = materiale sano;
T, M, B = componenti top, middle e bottom.

provocati su piante-test risultassero identici per entrambe le frazioni virali. Il virus purificato non frazionato ha fornito i seguenti rapporti:

$$A_{\max 260} / A_{\min 244} = 1,16; \quad A_{260} / A_{280} = 1,28; \quad A_{280} / A_{260} = 0,78$$

Al microscopio elettronico esso è apparso costituito da particelle poliedriche penetrate e non da PTA; il diametro (calcolato basandosi su quello medio del "Tobacco mosaic virus" = TMV, di circa 18 nm) è risultato di 28 nm. Facendo reagire in gel di agarose una sospensione del virus purificato non frazionato, nonché il componente (B) da solo e quelli (M) e (T) uniti tra loro, contro l'anti-siero ottenuto per il ceppo SLRV-vite "Sylvaner A" (Vuittenez et al., 1970) e contro l'anti-siero del ceppo 'tipo' di SLRV-fragola "Hampshire" (Lister, 1964) si è prodotta una banda caratteristica, assente nel controllo preparato con il succo estratto da piante di C. quinoa sane.

L'entità virale proveniente da gladiolo non ha invece reagito con l'antisiero ottenuto per i seguenti virus:

ArMV ("Arabis mosaic virus"); GFV ("Grapevine fanleaf virus"); RRV ("Rasber

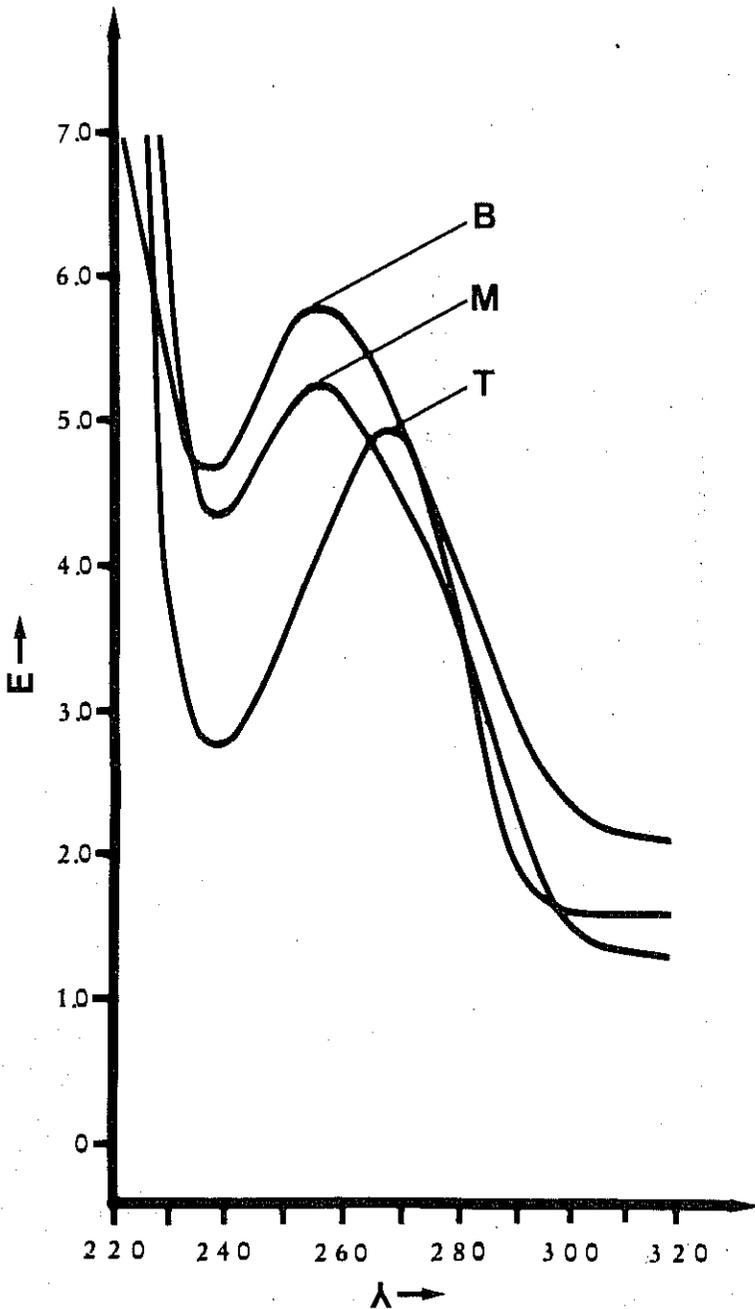


Fig. 2 - Curve di assorbimento in UV dei tre componenti il virus della maculatura anulare latente della fragola (SLRV). I componenti sono contrassegnati come nella Fig. 1.

ry ringspot virus"); TRSV ("Tobacco ringspot virus"); ToRSV ("Tomato ringspot virus"); TBRV ("Tomato blackring virus"); CLRV ("Cherry leafroll virus"); CMV ("Cucumber mosaic virus"); CaRSV ("Carnetion ringspot virus").

Il titolo dell'antisiero omologo da noi prodotto é risultato di 1/256.

Degli inoculi eseguiti su C.amaranticolor sani, utilizzando il succo di alcune foglie di C.amaranticolor che avevano ricevuto gli X.diversicaudatum, solamente quelli relativi all'ultimo prelievo (20/9/83) sono risultati positivi, provocando sulla chenopodiacea i tipici sintomi (vedi Tab. 1). Gli inoculi precedenti hanno dato esito negativo.

DISCUSSIONE

In questi ultimi decenni nelle varie Regioni del mondo, (e particolarmente là ove la coltivazione del gladiolo ha raggiunto una rilevante importanza economica: Olanda, Germania, Giappone, ecc.), sono stati segnalati, sempre più frequentemente, stati patologici della bulbosa attribuibili a uno o più virus o ad entità virus-simili (Tab. 2). In base ai risultati da noi ottenuti é consentito aggiungere all'elenco così formulato anche il virus della maculatura anulare latente della fragola ("Strawberry latent ringspot virus" = SLRV) che, a quanto ci risulta, non era ancora stato segnalato su gladiolo. Abbiamo perciò ritenuto opportuno caratterizzare questo nuovo isolato di SLRV, ed eseguire prove preliminari di reinfezione di chenopodiacee per mezzo del vettore naturale X.diversicaudatum.

Per quanto concerne le caratteristiche fisico-chimiche di tale isolato sottolineiamo la notevole sensibilità al trattamento termico in quanto solamente il 30% delle piante inoculate con succo riscaldato per 10 m. a 50°C risulta infetto. Per contro appare elevata la sua conservabilità alle basse temperature nei tessuti vegetali delle piante ospiti (35 settimane).

Da un punto di vista sintomatologico SLRV-gladiolo rivela una maggiore capacità infettiva rispetto ad altri ceppi dello stesso virus isolati in Italia da piante agrarie differenti: SLRV-olivo (Savino, 1979); SLRV-vite (Credi et al., 1981); SLRV-pesco (Corte, 1968); SLRV-lampone (Vegetti, 1979); anche se alcune piante segnalate tipiche da Murrant (1971) per il ceppo 'tipo' quali: C.sativus, T.expansa, V.faba, ed alcune cvs di N.tabacum ('Samsun', 'Xanthi') non rientrano nella gamma delle piante infettabili di SLRV-gladiolo.

Per quanto riguarda la trasmissione del virus in parola tramite lo X.diversicaudatum, abbiamo osservato come il nematode sia effettivamente in grado di trasmettere detta entità infettiva da piante erbacee malate a sane (Chenopodiaceae) in tempi alquanto lunghi (8 settimane). Ciò é in accordo con quanto riportano in letteratura alcuni Autori, e, in particolare, Lister nel 1964 (4 settimane per verificare la presenza di SLRV nelle radici di cetrioli e 6 perché si reinfettino delle petunie). I dati da noi rilevati necessitano di una più ampia conferma. Così si richiede un successivo intervento sperimentale per comprovare se il ceppo di SLRV-gladiolo, da noi individuato, sia il fattore della 'rottura' di colore.

Tabella 2 - Virus isolati da gladiolo

V I R U S	SIGLA	DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA
<u>Sferici</u>		
Cucumber mosaic virus	CMV	UBIQUITARIO
Strawberry latent ringspot v.	SLRV	<u>ITALIA</u>
Tobacco necrosis virus	TNV	U.R.S.S.
Tobacco ringspot virus	TRSV	U.S.A., AUSTRALIA, ASIA (Giappone), EUROPA (Scozia, Polonia, Italia)
Tomato ringspot virus	ToRSV	ASIA, EUROPA (Scozia), ASIA (Giappone)
Tomato spotted wild virus	ToSWV	AUSTRALIA
<u>Allungati</u>		
Bean yellow mosaic virus	BYMV	UBIQUITARIO
Pea mosaic virus	PMV	EUROPA (Germania)
Tobacco rattle virus	TRV	EUROPA (Olanda), AFRICA (Egitto)
Tobacco mosaic virus	TMV	ASIA (Giappone)

RIASSUNTO

Viene descritta una malattia del gladiolo (Gladiolus sp.) i cui sintomi dominanti consistono in 'rottura' di colore dei petali e leggera mosaicatura del lembo fogliare. Inoculazioni meccaniche su piante erbacee di succo e-
stratto dai petali di gladiolo, hanno rivelato che alle alterazioni descritte é associata un'entità virale isodiametrica mai in precedenza segnalata su questa specie di bulbosa da fiore. Trattasi del virus della maculatura anulare latente della fragola (SLRV). L'identificazione e la caratterizzazione del virus in parola é stata eseguita tramite:

a) sintomi indotti su di una serie di piante ospiti preferenziali; b) proprietà fisiche in vitro; c) purificazione in gradienti di densità di saccarosio; d) dati di assorbimento in UV delle tre componenti frazionate; e) osservazioni al microscopio elettronico; f) prove sierologiche di doppia diffusione in agar.

Si é proceduto con la produzione dell'antisiero specifico (titolo=1/256). Sono in corso prove di trasmissione di SLRV-gladiolo tramite il vettore naturale Xiphinema diversicaudatum.

SUMMARY

Flower color-break of gladiolus associated with Strawberry latent ringspot virus (SLRV).

A disease of gladiolus (Gladiolus sp.) plants, with colour breaking on the flower, is described. Mechanical inoculation to herbaceous hosts by grinding flowers of gladiolus, revealed that diseased plants were isometric virus infected. The virus has been identified as an isolate of Strawberry latent ringspot virus (SLRV) on the basis of:

a) differential hosts; b) physical properties in vitro; c) purification and analysis of sucrose gradients; d) UV absorption spectra of three fractionated components; e) electron microscopy; f) serological tests of double diffusion in agar. A serum immune to SLRV-gladiolus has been prepared (titre=1/256).

This is the first report of natural infection of gladiolus by SLRV. Virus transmissions by the natural vector Xiphinema diversicaudatum are in progress.

BIBLIOGRAFIA

- BRANDES, J. (1964). Identifizierung von gestreckten pflanzenpathogenen Viren auf morphologischer Grundlage. Mitt.Biol.Bundesanst. Berlin-Dahlem, 130.
- CREDI R., A.R. BABINI, L. BETTI, A.BERTACCINI e C.GELLI (1981). A distinctive isolate of Strawberry latent ringspot virus from grapevine in Italy. Phytopath.medit., 20, 56-63.
- CORTE A. (1968). Soil-borne virus associated with a peach disease occurring in Northern Italy. Tungsbericthe, 97, 187-194.
- DEVERGNE J.C., CARDIN L. (1970). Etude sérologique comparative de plusieurs isolats du virus de la mosaïque du concombre. An.Phytopathol., 2, 639-661.
- FRANCKI R.I.B., HATTA T. (1978). Nepovirus (tobacco ringspot virus) group. In: The Atlas of Insect and Plant Viruses (K.Maramorosch, Ed.) Acad.Press New York, 222-235.
- HULL R. (1965). Virus diseases of Gladioli. Gladiolus A., 60-61.
- LISTER R.M. (1964). Strawberry latent ringspot virus: a new nematode borne virus. Ann.appl.Biol., 54, 167-176.
- MURANT A.F. (1974). Strawberry latent ringspot virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses, 126, 4 pp.
- RANA G.L. (1976). Le virosi del Gladiolo in Puglia. 1° Conv.su la Floricoltura nel Salento, Taviano.
- SAVINO V., BARBA M., GALLITELLI D. e MARTELLI G.P. (1979). Two nepoviruses isolated from olive in Italy. Phytopath.medit., 18, 135-142.
- SCHMELZER K. (1969). Das latente Erdburring flecken-virus aus Evonymus, Robinia und Aesculus. Phytopath.Z., 66, 1-24.
- VEGETTI G., BELLI G., CINQUANTA S., SONCINI C. (1979). Identificazione e prime caratteristiche di un ceppo di SLRV (Strawberry latent ringspot virus) isolato da coltivazione di lampone in Lombardia. Riv.pat.veg. S. IV, 15, 51-63.
- VUITTENEZ A., KUSZALA J., M.RUDEL, H. BRUCKBAUER (1970). Détection et étude sérologique du virus latent des taches annulaires du fraisier (Strawberry latent ringspot) du virus des anneaux noir de la tomate (Tomato black ring) et du virus des taches annulaires du Framboisier (Raspberry ringspot) chez de vignes du Palatinat. Ann.Phytopathol., 2 (2), 279-327.