

STUDI SASSARESI

Sezione III

1977

Volume XXV

ANNALI DELLA FACOLTÀ DI AGRARIA DELL'UNIVERSITÀ
DI SASSARI

DIRETTORE: O. SERVAZZI

COMITATO DI REDAZIONE: M. DATILO - F. FATICHENTI - L. IDDA - F. MARRAS
A. MILELLA - P. PICCAROLO - A. PIETRACAPRINA - R. PROTA - G. RIVOIRA
R. SATTA - C. TESTINI - G. TORRE - A. VODRET



ORGANO UFFICIALE
DELLA SOCIETÀ SASSARESE DI SCIENZE MEDICHE E NATURALI

GALLIZZI - SASSARI - 1978

St. Sass. III Agr.

Istituto di Patologia vegetale dell'Università di Sassari
(Direttore: Prof. F. MARRAS)

**Presenza di un «Potyvirus» sul Carciofo (*Cynara scolymus* L.)
in Sardegna ***

A. FODDAI - F. MARRAS - G. IDINI

È noto da tempo che le coltivazioni di Carciofo (*Cynara scolymus* L.) di numerosi Paesi ospitano diversi virus latenti, ora filamentosi, ora isometrici o bacilliformi. Il primo reperto, infatti, risale al 1959, in California (COSTA *et al.*, 1959); fanno seguito quelli in Francia e Tunisia (MARROU e MEHANI, 1964; WELVAERT e ZITOUNI, 1973), in Brasile (CHAGAS, FLORES e CANER, 1969), in Spagna (PEÑA IGLESIAS e AYUSO GONZALEZ, 1972; PEÑA IGLESIAS, RUBIO HUERTOS e MORENO SAN MARTIN, 1972) e in Marocco (FISCHER e LOCKHART, 1974).

Per quanto riguarda più da vicino l'Italia, MAJORANA e RANA (1970a e 1970b) isolano in Puglia due virus latenti: l'uno isometrico, l'altro filamentoso ascritto al gruppo del «Potato virus S». Più di recente, sempre in Puglia, RUSSO, MARTELLI e RANA (1975), in piante di Carciofo «Castellamare» manifestanti rachitismo e maculature fogliari giallastre, accertano la presenza concomitante di un «rhabdovirus» e di altri due a particelle rispettivamente filamentose («potyvirus») ed isometriche, senza specificare peraltro quale sia il ruolo di ciascuno di questi nei riguardi del quadro sintomatologico dell'affezione. Comunque, della presenza di un «potyvirus» latente sul Carciofo in Puglia si fa menzione nella «Relazione sull'attività

* Lavoro eseguito con un contributo finanziario del Consiglio Nazionale delle Ricerche, nell'ambito del programma del «Gruppo Virus e Virosi delle Piante». Hanno collaborato alle ricerche il Sig. F. Russo, tecnico di questo Istituto e la Sig.na S. Migheli, tecnico del C.N.R.

svolta nel 1975 » dall'Unità di Ricerca di Bari del « Gruppo Virus e Virosi delle Piante » del C.N.R. (MARTELLI, 1976).

Anche in Sardegna — nell'ambito delle indagini sistematiche svolte da questo Istituto allo scopo di individuare ed accertare sperimentalmente i virus che albergano sul Carciofo — abbiamo avuto modo di constatare che tutte le piante delle cvv « Spinoso sardo » e « Masedu » prese in esame, ancorché apparentemente sane, si rivelavano, a seguito di trasmissione meccanica su indicatrici erbacee, infette da un'entità virale latente. In questa nota riferiamo per l'appunto sui risultati delle nostre ricerche.

MATERIALI E METODI

Le prove di trasmissione meccanica sono state effettuate mediante estrazione del succo da foglie di Carciofo triturate in mortaio, in presenza ($p:v = 1:1$) di tampone fosfato 0,1 M pH 7,2 addizionato dell'1% di Na-ascorbato, e successiva inoculazione, con l'ausilio di polvere di Carborundum (500 mesh), su piante indicatrici tenute a temperatura media di 20-22 °C in cella climatizzata.

Le proprietà fisiche *in vitro* sono state determinate partendo da succo grezzo di Carciofo e utilizzando come pianta da saggio la *Gomphrena globosa* L., ad una temperatura di 20-22 °C e fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

Per la purificazione del virus si è proceduto alla omogeneizzazione a freddo di foglie di Carciofo, in presenza ($p:v = 1:3$) di tampone fosfato 0,3 M pH 7,6 contenente lo 0,2% di ac. tioglicolico, filtrazione attraverso garza, chiarificazione del filtrato mediante agitazione a freddo per 2 h in presenza di butanolo al 9%, e successiva centrifugazione differenziale (ultra-centrifuga « Beckman L5-50), secondo lo schema seguente:

10.000 r.p.m. per 15' (Rotore tipo 19)

29.000 r.p.m. per 120' (Rotore tipo 30) - « Pellet » ridisciolti in tampone fosfato 0,02 M pH 7,2

10.000 r.p.m. per 15'

39.000 r.p.m. per 60' (Rotore tipo 40.1)

Il « pellet » finale è stato risospeso in poco tampone fosfato (come il precedente) e passato in gradiente di saccarosio (10-40%) a 24.000 r.p.m. per 150' (Rotore tipo SW 25.1).

La sospensione virale purificata in gradiente di saccarosio è stata controllata allo spettrofotometro (Hitachi Perkin-Elmer).

Le osservazioni al microscopio elettronico (Elmiskop IA Siemens) sono state effettuate su:

- preparati parzialmente purificati da Carciofo, colorati negativamente con K-fosfotungstato secondo un metodo adottato da HITCHBORN e HILLS (1965);
- sezioni ultrasottili ottenute come appresso. Frammenti di foglie di *Nicotiana benthamiana* Domin. inocolata artificialmente sono stati prefissati per 2 h in una soluzione al 2,5% di glutaraldeide in tampone fosfato 0,1 M pH 7,2. I campioni sono stati successivamente sottoposti ad una serie di lavaggi nello stesso tampone per 3 h, postfissati in OsO₄ all'1% per 1,5 h sempre nello stesso tampone e disidratati in una serie graduale di soluzioni di acetone. Dopo due passaggi finali in acetone anidro i frammenti sono stati inclusi in Araldite. Tutte le operazioni sono state effettuate a temperatura ambiente e sotto vuoto. Le sezioni ultrasottili, ottenute con coltelli di vetro montati su un ultramicrotomo LKB Ultratome III, sono state colorate con acetato di uranile e citrato di piombo (¹).

L'antisiero specifico è stato ottenuto da conigli immunizzati con purificati in gradiente di saccarosio (riconcentrati a 39.000 r.p.m. per 2 h) inoculati con 3 iniezioni, a distanza di 7 giorni una dall'altra, di cui le prime 2 sottocute e intramuscolo con « Freund's incomplete adjuvant », la terza endovena.

Per la titolazione dell'antisiero è stato adottato il metodo della precipitazione in provette (« tube test ») mantenute in bagnomaria a 38 °C per 2-3 h.

Sempre con lo stesso metodo sono state eseguite numerose prove sierologiche facendo reagire una sospensione parzialmente purificata del virus in esame sia con l'antisiero da noi ottenuto sia con un anti-ALV (« Artichoke latent virus ») fornitoci dall'Unità di Ricerca di Bari del « Gruppo Virus e Virosi delle Piante » del C.N.R. Nel contempo, presso l'Unità di Ricerca di Bari, i due antisieri sono stati messi a confronto con alcuni preparati da Carciofo « Spinoso sardo » con la tecnica della « decorazione » mediante immunoelettromicroscopia (²).

(¹) Le operazioni relative all'allestimento dei campioni e le osservazioni al microscopio elettronico sono state eseguite presso l'Istituto di Anatomia umana normale dell'Università di Sassari dal Dr. Vittorio Leoni, al quale vanno i nostri più vivi ringraziamenti.

(²) Ringraziamo vivamente l'Unità di Ricerca di Bari, ed in particolare il Dr. G. L. Rana, per la preziosa collaborazione fornita.

RISULTATI

TRASMISSIONE MECCANICA - Hanno reagito positivamente le piante indicatrici elencate nella tabellina appresso.

Piante indicatrici	Sintomi	
	locali	sistemici
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste et Reyn.	+	-
<i>Chenopodium album</i> L.	+	-
<i>Chenopodium murale</i> L.	+	-
<i>Gomphrena globosa</i> L.	+	-
<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin.	-	+
<i>Nicotiana clevelandii</i> Gray	-	+
<i>Zinnia elegans</i> Jacq.	-	L

+ = reazione positiva

- = reazione negativa

L = infezione latente accertata mediante reinoculazione

Riteniamo utile illustrare, qui di seguito, le reazioni sintomatologiche più caratteristiche:

- su *Chenopodium amaranticolor* e *Ch. album* si ossevano, tra l'8° e il 10° giorno dall'inoculazione, lesioni locali clorotiche rotondeggianti, da puntiformi sino al diametro di 2 mm.
- su *Gomphrena globosa* compaiono, a distanza di 5-6 giorni dall'inoculazione, maculature localizzate di color cuoio circondate da un alone periferico rossastro, di forma rotondeggiate, misuranti circa 3-4 mm di diametro.

Non hanno invece reagito all'inoculazione: *Cucumis sativus* L. (cv « Cubit »), *Cucurbita pepo* L. (cv « Zucchini genovese »), *Datura metel* L., *Datura stramonium* L., *Helianthus annuus* L., *Nicandra physaloides* (L.) Gaert., *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana rustica* L., *Nicotiana tabacum* (cv « White Burley » e « Samsun »), *Ocimum basilicum* L. (cv « Foglia di lat-

tuga »), *Petunia hybrida* Vilm., *Phaseolus vulgaris* L. (cvv « Top Crop » e « Vittoria »), *Physalis floridana* Rydb. e *Physalis peruviana* L.

PROPRIETÀ FISICHE « IN VITRO »

Longevità: 20-30 ore

Punto di diluizione finale: 10^{-3} - 10^{-4}

Grado di inattivazione termica: 55-60 °C

I dati riportati rappresentano i limiti entro i quali il virus perde l'infettività.

SPETTROFOTOMETRIA - Le sospensioni virali hanno mostrato una curva di assorbimento della luce U.V. tipica delle nucleoproteine con $E_{max} = 260$ - 262 nm ed $E_{min} = 246$ nm. Il rapporto E_{280}/E_{260} è risultato di 0,85 equivalente ad un contenuto di RNA intorno al 5,5%.

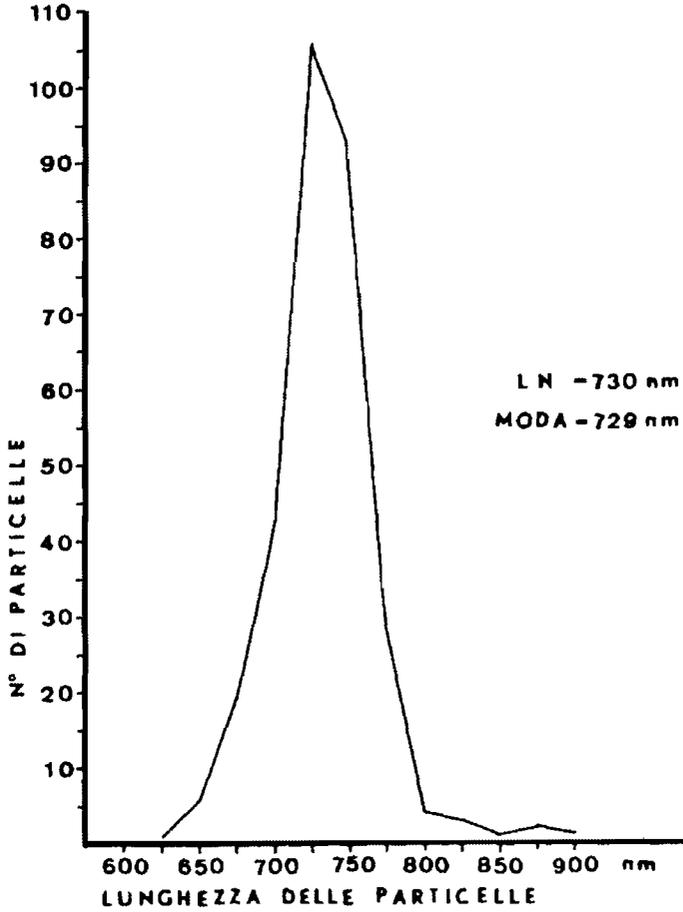
MICROSCOPIA ELETTRONICA - I preparati parzialmente purificati contenevano numerose particelle allungate e filamentose. Le misurazioni effettuate hanno fatto registrare una « lunghezza normale » (LN) di 730 nm ed una moda di 729 nm (diagr. I).

Nelle sezioni ultrasottili si osservano inclusioni citoplasmatiche del tipo « pinwheel » (EDWARDSON *et al.*, 1968).

SIEROLOGIA

« *Tube test* » - Sia l'antisiero da noi ottenuto (titolo 1:1.024) sia l'anti-ALV « barese » hanno sempre reagito positivamente con tutti gli « isolati » da Carciofo « Spinoso sardo ». Viceversa, non è stata mai osservata alcuna precipitazione quando i medesimi venivano messi a confronto con succo di piante sane.

Immunolettromicroscopia - Mentre con il nostro antisiero tutte le particelle si mostravano costantemente « decorate », a conferma dei risultati del test sierologico precedente, con l'anti-ALV « barese » alcune particelle apparivano, in qualche caso, non « decorate ».



Diagr. I - Distribuzione delle lunghezze di particelle filamentose in preparati parzialmente purificati del « potyvirus » latente del Carciofo.

- *Length distribution of filamentous particles in partially purified preparations of the artichoke latent potyvirus.*

DISCUSSIONE DEI RISULTATI - CONCLUSIONI

Il Carciofo coltivato in Sardegna ospita un virus latente filamentoso.

Ora, se è vero che la stragrande maggioranza dei virus latenti sinora segnalati sul Carciofo sono filamentosi, è altrettanto vero che, fra tutti i virus che infettano la Composita, i meno conosciuti sono proprio questi. Tanto che oggi è più che mai attuale quanto già da tempo avevano rilevato in proposito MARTELLI e RANA (1973), e cioè che le descrizioni fornite dai diversi AA. sono il più delle volte talmente insufficienti, se non addirittura contraddittorie, che è difficile avere le idee chiare sull'argomento. Ciononostante, sulla scorta delle notizie di cui oggi disponiamo, potremmo collocare i virus latenti filamentosi sinora isolati da Carciofo nei differenti Paesi — eccezion fatta per quello brasiliano (CHAGAS, FLORES e CANER, *l.c.*) di cui sono ignote le dimensioni — in due gruppi distinti *sensu* HARRISON *et al.* (1971):

— *Carlavirus* (620-690 nm)

California (COSTA *et al.*, *l.c.*)⁽¹⁾

Italia (MAJORANA e RANA, 1970b)

Spagna (PEÑA IGLESIAS e AYUSO GONZALEZ, *l.c.*)⁽²⁾

Marocco (FISCHER e LOCKHART, *l.c.*)

— *Potyvirus* (720-800 nm)

Francia e Tunisia (MARROU e MEHANI, *l.c.*; WELVAERT e ZITOUNI, *l.c.*)⁽³⁾

Italia (MARTELLI, *l.c.*)

Ma ciò che soprattutto rende complesso il problema è il fatto che in alcune zone — ad esempio, come abbiám visto, in Puglia, ma verosimilmente anche altrove — è ben nota l'elevata diffusione sul Carciofo di virus appartenenti ad entrambi i gruppi, per cui non è eccessivamente azzardato presumere che essi possano coesistere su una stessa pianta.

(¹) Sebbene non vengano riportate le dimensioni del virus, BRANDES (1964) lo colloca nel gruppo dei « *Carlavirus* ».

(²) Neanche questi AA. forniscono dati relativi alla lunghezza del virus; tuttavia gli attribuiscono la capacità di aggregarsi in fasci intracellulari di particelle, caratteristica di numerosi « *Carlavirus* ».

(³) WELVAERT e ZITOUNI (*l.c.*) suppongono che anche un virus segnalato in Spagna (PEÑA IGLESIAS e AYUSO GONZALEZ, *l.c.*) quale agente della degenerazione del Carciofo (ADV = « *Artichoke degeneration virus* ») sia da identificare, per la presenza nel citoplasma di corpi in inclusione del tipo « *pinwheel* », con un « *Potyvirus* » latente.

Per quanto riguarda la Sardegna, l'entità isolata dal Carciofo è senz'altro da classificare, in base alla lunghezza delle sue particelle (730 nm) ed alla presenza di « pinwheels », nel gruppo dei « Potyvirus ». Tuttavia, per le considerazioni dianzi esposte, non ci sentiamo di escludere a priori che sulla Composita possa albergare, sia pure in misura meno elevata, anche un « Carlavirus »; e non è neppure detto che questo eventuale « Carlavirus » debba essere necessariamente identico a quelli presenti altrove. Del resto, qualche ipotesi in tal senso sembrerebbe suggerirla proprio il fatto che l'anti-ALV « barese » si sia talvolta dimostrato incapace di « decorare » alcune particelle virali in preparati da « Spinoso sardo ». Ed infatti, se si ammette che detto antisiero possa essere polivalente — cosa abbastanza verosimile stante, come si è detto, la notevole diffusione e di un « Carlavirus » e di un « Potyvirus » sul Carciofo in Puglia — si potrebbe presumere che le particelle che non si decorano possano appartenere ad un « Carlavirus » sierologicamente diverso da quello presente in Puglia.

Comunque stiano le cose, è evidente che non si potrà pervenire alla soluzione del problema se non attraverso ulteriori e più approfondite ricerche di base, soprattutto a livello sierologico. Siamo infatti convinti che solamente allorquando si potrà disporre di antisieri specifici per ciascun tipo di virus, che consentano di effettuare un rigoroso studio comparativo tra gli isolati delle diverse zone, sarà possibile fare piena luce su tutto l'argomento.

RIASSUNTO

Il Carciofo (*Cynara scolymus* L.) coltivato in Sardegna alberga un virus latente.

Esso causa lesioni locali caratteristiche su *Gomphrena globosa* L. e *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn. e sintomi sistemici su *Nicotiana benthamiana* Domin. e *N. clevelandii* Gray.

In succo grezzo di Carciofo il virus ha una longevità *in vitro* di 20-30 ore, un punto di diluizione limite di 10^{-3} - 10^{-4} ed un grado di inattivazione termica di 55-60 °C.

Il virus è stato purificato da Carciofo con 2 cicli di centrifugazione differenziale e successiva centrifugazione in gradiente di saccarosio. Le sospensioni virali ottenute, esaminate allo spettrofotometro, hanno dato luogo ad uno spettro di assorbimento in luce ultravioletta (UV) tipico delle nucleoproteine, con $E_{max} = 260-262$ nm; $E_{min} = 246$ nm; $E_{280}/E_{260} = 0,85$ pari ad un contenuto di RNA del 5,5%.

Al microscopio elettronico le sospensioni virali parzialmente purificate sono risultate composte da numerose particelle filamentose con una lunghezza normale (LN) di 730 nm ed una moda di 729 nm; in sezioni ultrasottili di

foglie di *Nicotiana benthamiana* infettata artificialmente si osserva la presenza di inclusioni citoplasmatiche « a girandola ».

In saggi sierologici eseguiti con il metodo della « precipitazione in provetta » il virus ha sempre reagito sia con l'antisiero omologo (titolo 1 : 1.024) sia con un anti-ALV (« Artichoke Latent Virus ») di provenienza « barese ». Risultati sostanzialmente simili sono stati forniti anche da prove sierologiche effettuate con il metodo della « decorazione » mediante immunoelettromicroscopia.

È evidente che sul Carciofo coltivato in Sardegna è presente un « potyvirus » latente. Non è però da escludere che la Composita possa ospitare anche un « carlavirus » latente.

SUMMARY

A latent potyvirus of artichoke (*Cynara scolymus* L.) in Sardinia

by

A. FODDAI, F. MARRAS and G. IDINI

A latent virus of artichoke has been isolated in Sardinia (Italy).

The virus causes characteristic local lesions on *Gomphrena globosa* L. and *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn., and systemic symptoms on *Nicotiana benthamiana* Domin. and *N. clevelandii* Gray.

In artichoke crude sap the virus has a longevity *in vitro* of 20-30 hours, a dilution-end point between 10^{-3} and 10^{-4} , and a thermal inactivation point between 55 and 60 °C.

The purification of the virus has been obtained from artichoke with two cycles of differential centrifugation followed by sucrose density gradient centrifugation. The purified suspensions had an ultraviolet light (UV) absorption spectrum typical of the nucleoproteins with $E_{max} = 260-262$ nm; $E_{min} = 246$ nm; and a ratio E_{280}/E_{260} of 0,85 which suggests a RNA content of the virus of about 5,5%.

Electron microscope observation showed that negative stained partially purified virus suspensions are composed of filamentous particles with a normal length (NL) of 730 nm and a mode of the length distributions of 729 nm; moreover, ultrathin sections of tissue fragments from leaves of mechanically inoculated *Nicotiana benthamiana* contained cytoplasmic inclusions of the pinwheel type.

In serological tube tests, partially purified virus suspensions reacted with homologous serum (titre 1 : 1024) and a serum immune to an ALV (Artichoke Latent Virus) from Bari. These results have been substantially confirmed by serological tests with the method of « antibody coating of virus particles » by immune electron microscopy.

It is obvious that a latent potyvirus is widespread in artichoke growing in Sardinia. However, it cannot be excluded the possible occurrence in artichoke plants of a latent carlavirus too.

BIBLIOGRAFIA

- BRANDES J., 1964 — Identifizierung von gestreckten pflanzenpathogenen Viren auf morphologischer Grundlage. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land. u. Forstwirtsch.*, Berlin-Dahlem, 110, 130 pp.
- CHAGAS C.M., FLORES E. e CANER J., 1969 — Uma nova doença de virus da alcachôfra no Estado de São Paulo. *O Biologico*, 35, 11, pp. 271-274.
- COSTA A.S., DUFFUS J.E., MORTON D., YARWOOD C.E., BARDIN R., 1959 — A latent virus of California artichokes. *Phytopathology*, 49, pp. 49-53.
- EDWARDS J.R., PURCIFULL D.E. e CHRISTIE R.G., 1968 — Structure of cytoplasmic inclusions in plants infected with rod-shaped viruses. *Virology*, 34, pp. 250-263.
- FISCHER H.U. e LOCKHART B.E., 1974 — A Moroccan isolate of artichoke latent virus. *Plant Dis. Repr.*, 58, 12, pp. 1123-1126.
- HARRISON B.D., FINCH J.T., GIBBS A.J., HOLLINGS M., SHEPHERD R.J., VALENTA V. e WETTER C., 1971 — Sixteen Groups of Plant Viruses. *Virology*, 45, pp. 356-363.
- HITCHBORN J.H. e HILLS G.J., 1965 — The use of negative staining in the electron microscopic examination of plant viruses in crude extracts. *Virology*, 27, pp. 528-540.
- MAJORANA G. e RANA G.L., 1970a — Un nuovo virus latente isolato da Carciofo in Puglia. *Phytopath. Medit.*, 9, pp. 193-196.
- MAJORANA G. e RANA G.L., 1970b — A latent virus of Artichoke belonging to Potato virus S group. *Phytopath. Medit.*, 9, pp. 200-202.
- MARROU J. e MEHANI S., 1964 — Étude d'un virus parasite de l'artichaut. *C.R. Acad. Agric., Fr.*, pp. 1053-1064.
- MARTELLI G.P., 1976 — Relazione sull'attività svolta nel 1975 nell'ambito del « Gruppo di Ricerca sui virus e le virosi delle piante » del C.N.R. *Unità di Ricerca di Bari*, Istituto di Patologia vegetale dell'Università degli Studi di Bari.
- MARTELLI G.P. e RANA G.L., 1973 — Viruses and virus diseases of globe artichoke and cardoon. *Atti II Congr. Intern. Carciofo*, Bari, pp. 811-830.
- PEÑA IGLESIAS A. e AYUSO GONZALEZ P., 1972 — Degeneration of spanish globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) plants: 1) virus isolation, host range, purification and ultrastructure of infected hosts. *An. I.N.I.A., Ser. Prot. veg.*, 2, pp. 89-122.
- PEÑA IGLESIAS A., RUBIO HUERTOS M. e MORENO SAN MARTIN R., 1972 — Un virus de tipo baciliforme en alcachofa (*Cynara scolymus* L.). *An. I.N.I.A., Ser. Prot. veg.*, 2, pp. 123-137.
- RUSO M., MARTELLI G.P. e RANA G.L., 1975 — A Rhabdovirus of *Cynara* in Italy. *Phytopath. Z.*, 83, pp. 223-231.
- WELVAERT W. e ZITOUNI B., 1973 — Investigations on infectious degeneration of artichokes in Tunisia. *Atti II Congr. Intern. Carciofo*, Bari, pp. 865-875.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA

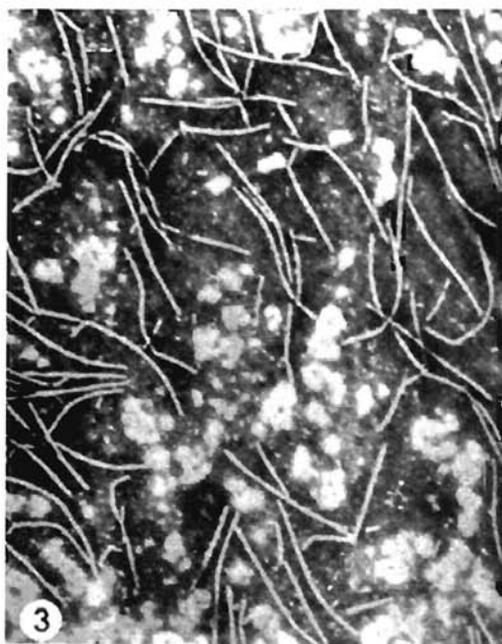
- Figg. 1 e 2 - Lesioni locali su foglie di *Gomphrena globosa* (1) e *Chenopodium amaranticolor* (2) rispettivamente 12 e 15 giorni dopo l'inoculazione con il « potyvirus » latente del Carciofo.
- *Local lesions on leaves of Gomphrena globosa* (1) and *Chenopodium amaranticolor* (2) 12 and 15 days respectively after inoculations with artichoke latent potyvirus.
- Fig. 3 - Particelle filamentose del « potyvirus » latente del Carciofo in un preparato parzialmente purificato da carciofo (colorazione negativa; ingrandimento 30.000 x).
- *Filamentous particles of the artichoke latent potyvirus in a partially purified preparation from artichoke (negative stain; magnification 30.000 x)*:
- Fig. 4 - Inclusioni citoplasmatiche « a girandola » in una cellula del mesofillo di *Nicotiana benthamiana* infettata artificialmente con il « potyvirus » latente del Carciofo (ingrandimento 40.000 x).
- *Cytoplasmic pinwheel inclusions in a mesophyll cell of Nicotiana benthamiana artificially infected with artichoke latent potyvirus (magnification 40.000 x)*.



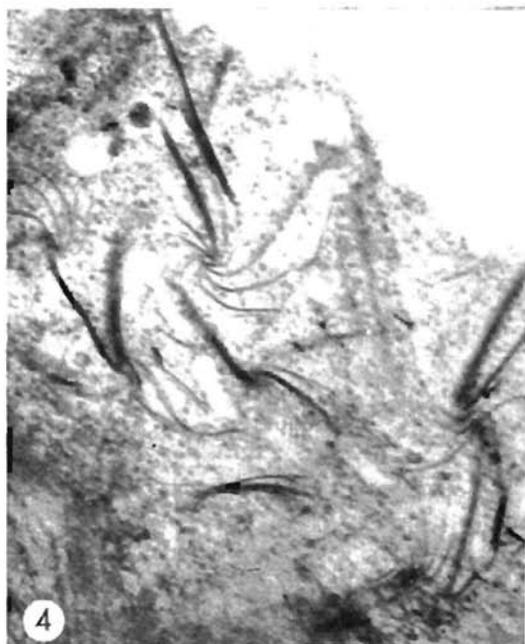
1



2



3



4