

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA BASILICATA**  
**FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN.**



**CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE**

**TESI DI LAUREA**

Studio su base molecolare delle interazioni  
ospite-parassita con particolare riferimento al sistema  
*“Fragaria vesca - Rhizoctonia fragariae”*

RELATORE

Prof. MARTELLI Giuseppe

CANDIDATO

SOFO Adriano  
Matr. 21236

*“Radici e foglie appena sono queste,  
Profumi recati a uomini e donne dai boschi selvaggi, dal margine degli stagni  
Acetosella del cuore e garofani d’amore, dita che avvincono più strettamente  
che rampicanti,  
Gorgheggi da gole d’uccelli nascosti tra gli alberi, quando il sole ascende,  
Soffi di terra e d’amore trasmessi da rive di vita su mari di vita, sino a voi,  
marinai!  
Bacche addolcite dal gelo, virgulti di marzo offerti freschi a giovani che per i  
campi vågano, quando l’inverno si scioglie,  
Germogli d’amore messivi innanzi, immessi in voi, ovunque voi siate,  
Germogli che si schiuderanno secondo i modi d’un tempo,  
Se a loro recate il calore del sole si schiuderanno offrendovi forma, colore,  
profumo,  
Se voi divenite alimento e umore, essi saranno fiori, frutti, alti rami e alberi.”*

Walt Whitman (da *“Foglie d’erba”*)

## **Ringraziamenti**

Ringrazio innanzitutto il Prof. Giuseppe Martelli per avermi incoraggiato, consigliato e rassicurato durante gli studi, dandomi la possibilità di portare a termine ciò che fino a pochi anni fa era solo un desiderio.

Ringrazio sentitamente il Prof. Cristos Xiloyannis e tutto il suo gruppo di ricerca per la continua fiducia e pazienza nei miei confronti e per avermi dato la possibilità di intraprendere la difficile ma stimolante avventura universitaria.

Un ringraziamento particolare alla Prof.ssa Brigida Lioi per la sua gentilezza e disponibilità.

Desidero infine ringraziare i Dottori Danilo Saluzzi, Mauro Lapelosa e Luigi Milella per la loro amicizia.

## INDICE

<b>Introduzione</b> .....	6
---------------------------	---

### **Meccanismi genetici coinvolti nelle interazioni pianta-organismo patogeno**

<i>Le diverse tipologie di resistenza ai patogeni</i> .....	7
<i>L'importanza dei fattori ambientali nell'interazione pianta-patogeno</i> .....	13
<i>Geni di avirulenza ed elicitori specifici nel patogeno</i> .....	13
<i>Geni di resistenza nelle piante</i> .....	14
<i>Parallelismi tra meccanismi di difesa nelle piante e negli animali</i> .....	14
<i>La reazione di ipersensibilità (HR)</i> .....	15
<i>Trasduzione del segnale</i> .....	16
<i>Il sistema di resistenza acquisita (SAR) e la risposta della pianta alle ferite (WR)</i> ....	17
<i>Prospettive future</i> .....	19

### **Meccanismi genetici specifici coinvolti nelle interazioni pianta-fungo patogeno**

<i>Analisi molecolare e bioinformatica dei genomi e dei trascrittomi</i> .....	20
<i>Espressione genica nei parassiti vegetali</i> .....	21
<i>Composti antimicrobici e patogeni fungini</i> .....	23
<i>Geni funzionali e geni strutturali</i> .....	24
<i>Le proteine correlate alla patogenesi nelle piante (PR)</i> .....	25
<i>Regolazione negativa della resistenza ai funghi</i> .....	26
<i>Suscettibilità mediante fattori di virulenza fungini</i> .....	27

### **L'oggetto dello studio: interazione *Fragaria vesca*-*Rhizoctonia fragariae***

<i>Morfologia, ecologia e tecniche colturali della fragola</i> .....	27
<i>Avversità della fragola</i> .....	29
<i>Rhizoctonia fragariae</i> .....	33
<i>Tecniche colturali per la gestione integrata dei parassiti della fragola</i> .....	35
<i>Misure per contrastare <i>Rhizoctonia fragariae</i></i> .....	36

## **Metodiche di indagine molecolare per lo studio delle interazioni pianta-fungo patogeno**

<i>Obiettivi</i> .....	37
<i>Polymerase chain reaction (PCR)</i> .....	38
<i>Librerie di DNA</i> .....	39
<i>Trasformazione</i> .....	40
<i>Marcatori molecolari</i> .....	43
<i>Clonaggio</i> .....	46
<i>Mutagenesi</i> .....	47
<i>Individuazione dei cloni</i> .....	48
<i>Individuazione del gene di interesse e del suo prodotto</i> .....	49
<i>Studio della regolazione dei geni coinvolti nella patogenesi</i> .....	50
<i>Analisi dell'espressione genica</i> .....	51

## **Schema sperimentale adottato per lo studio dell'interazione *Fragaria vesca-Rhizoctonia fragariae***

<i>Materiale vegetale e disegno sperimentale</i> .....	54
<i>Analisi del trascrittoma e differential display</i> .....	54
<b>Conclusioni</b> .....	60
<b>Bibliografia</b> .....	61

## INTRODUZIONE

Le interazioni tra organismi patogeni e piante ospiti sono regolate dal grado di variabilità genetica presente nelle loro popolazioni. Ciò implica che un ospite con un certo grado di resistenza ai genotipi più diffusi del patogeno ha una *fitness* più alta rispetto ad un ospite non resistente, presenta una maggiore adattabilità rispetto ai genotipi suscettibili e il suo genotipo può così aumentare in frequenza nella popolazione dell'ospite. D'altra parte, tra i patogeni che non sono in grado di parassitare un genotipo resistente dell'ospite, può talora comparire un mutante ad alta patogenicità, il quale, favorito rispetto agli altri genotipi dei patogeni, prende il sopravvento su di essi. A questo punto, gli ospiti si trovano ad affrontare questo nuovo evento che ha cambiato le condizioni iniziali e causa una nuova pressione adattativa nella popolazione dell'ospite. E' facile comprendere che questo processo, in cui gli eventi rari sono avvantaggiati in termini di adattabilità, non ha fine e determina la graduale evoluzione delle due popolazioni, in un continuo equilibrio dinamico.

Sono ormai passati più di 50 anni dai primi modelli pianta-patogeno postulati da Flor e che hanno guidato le ricerche di patologia vegetale fino ai nostri giorni. Basandosi su analisi genetiche delle interazioni tra il lino e l'agente eziologico della ruggine del lino (*Melanospora lini*, un fungo biotrofico obbligato), Flor ipotizzò che per ogni gene che determinava la reazione dell'ospite alla patologia corrispondeva uno specifico gene che determinava la patogenicità nel parassita. Egli scoprì inoltre che la resistenza dell'ospite ad uno specifico ceppo del patogeno era un tratto dominante o semidominante, mentre l'avirulenza nel patogeno era sempre dominante sulla virulenza, e dimostrò che entrambe le caratteristiche erano ad eredità monogenica.

Dopo decenni di ricerche, i meccanismi genetici delle interazioni pianta-patogeno appaiono ai ricercatori molto più sfumati e complessi di quelli ipotizzati da Flor, i cui principi di base continuano comunque ad essere validi. Sembra infatti che le risposte di difesa delle piante nei confronti dei parassiti e quelle che si verificano nel sistema immunitario degli animali, una volta considerate molto diverse, siano molto più simili di quanto appaiano a prima vista, e ci sono sempre maggiori indizi sul fatto che entrambe derivino da una difesa ancestrale di tipo

umorale presente in progenitori eucarioti comuni vissuti prima della separazione dei due regni.

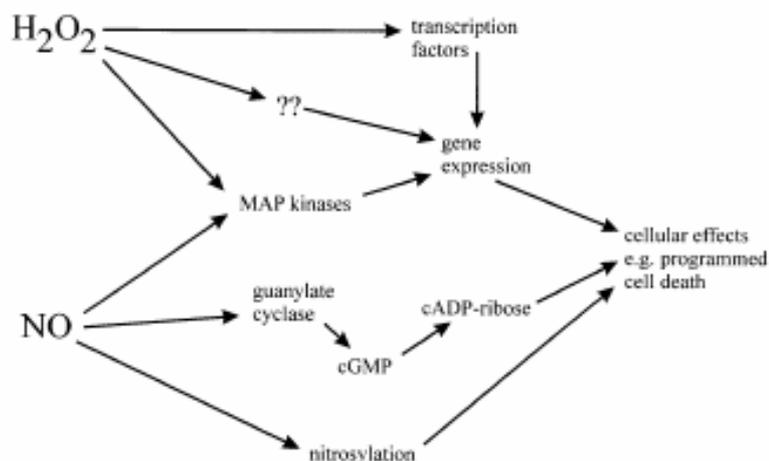
Da un punto di vista pratico, infine, la selezione di piante resistenti ai patogeni è una delle maggiori sfide della ricerca nei prossimi decenni per far fronte all'aumento della domanda di cibo causato dalla crescita della popolazione mondiale e dalla diminuzione della fertilità e disponibilità dei suoli coltivabili.

## **MECCANISMI GENETICI COINVOLTI NELLE INTERAZIONI PIANTA-ORGANISMO PATOGENO**

### *Le diverse tipologie di resistenza ai patogeni*

Le piante hanno evoluto meccanismi di riconoscimento per la protezione nei confronti di organismi invasori differenti da quelli del sistema immunitario degli animali. Il riconoscimento di un organismo patogeno da parte di una cellula vegetale comprende una vasta gamma di risposte di difesa quali la produzione di composti antimicrobici e di specie attivate dall'ossigeno ("activated oxygen species", AOS), nonché la morte cellulare programmata (Bonas e Van den Ackerveken, 1999), che impediscono l'ingresso del patogeno. In particolare, le AOS, come il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e le specie attivate dall'azoto (NOS), quali l'ossido nitrico (NO), sono prodotte dalle piante in risposta ad una varietà di stress biotici ed abiotici, tra cui l'attacco dei patogeni. Tali molecole potrebbero essere coinvolte nei meccanismi di difesa diretti, quali il cross-linking dei carboidrati della parete cellulare, o funzionare come agenti antimicrobici altamente ossidanti. Inoltre è ormai chiaro che le cellule producono tali specie reattive come molecole-segnale che consentono di trasdurre il segnale dell'attacco da parte del patogeno (Hancock *et al.*, 2002). Le risposte mediate da AOS e NO includono l'attivazione di proteine chinasi attivate dall'azoto, la sovra- e sotto-regolazione dell'espressione genica e spesso anche alla morte cellulare programmata localizzata, caratteristica della HR (Hancock *et al.*, 2002). Analisi al microarray hanno evidenziato che l'esposizione a  $H_2O_2$  attiva la trascrizione di circa 100 geni e inibisce quella di circa 60, tra cui molti fattori di trascrizione, e il 25% di quelli attivati è coinvolto nei meccanismi di difesa delle piante (Desikan *et al.*, 2001). Di

conseguenza, AOS e NO sono molecole chiave che potrebbero orchestrare gli eventi che seguono l'attacco del patogeno (Fig. 1).



**Figura 1.** Diagramma schematico dei possibili meccanismi di traduzione del segnale modulati da AOS e NO nelle piante (da Hancock et al., 2002).

E' importante distinguere diversi tipi di resistenza delle piante nei confronti dei patogeni. Molte piante sono resistenti alla maggior parte dei patogeni, per cui l'occorrenza dell'infezione è un'eccezione. Le piante che non possono essere attaccate da uno specifico patogeno sono chiamate "piante non-ospiti" e si dice quindi che esse presentano una "resistenza di tipo non-ospite" (non-host resistance). Alcune cultivar di piante, al contrario, possono essere infettate da uno specifico patogeno. In questo caso, il patogeno è in grado di infettare la specie ospite, ma possono essere presenti delle varianti genetiche (ad es. cultivar con diversi genotipi) che risultano resistenti. Parliamo quindi di "resistenza di tipo ospite" (host resistance), anche chiamata "vera resistenza".

La host resistance può ulteriormente essere divisa in due tipi: resistenza orizzontale e resistenza verticale. Nella resistenza orizzontale (anche chiamata resistenza poligenica o di campo) molti geni (geni multipli) contribuiscono alla manifestazione della resistenza nella pianta. Per questo motivo, la resistenza orizzontale è molto simile alla resistenza di tipo non-ospite. Nella resistenza verticale, invece, sono singoli geni, solitamente dominanti, che conferiscono la resistenza. Questo tipo di resistenza è spesso ricercata dai breeders al fine di sviluppare cultivar che esprimono tale caratteristica trasferendo i geni di resistenza

in altre specie. Allo stesso modo, all'interno della popolazione del patogeno ci sono varianti genetiche che differiscono nella loro capacità di attaccare con successo una potenziale pianta ospite. La malattia è quindi il modo in cui descriviamo il risultato di un'interazione genica compatibile tra ospite e patogeno in cui il patogeno è definito come "virulento" e l'ospite come "suscettibile", cioè non possiede nessun gene di resistenza contro il patogeno. Una mancata infezione è invece il risultato di una interazione genica incompatibile tra ospite e patogeno in cui il patogeno è "avirulento" e l'ospite "resistente". Si può ipotizzare quindi che le piante sono portatrici di geni di resistenza e i patogeni di geni di avirulenza.

Nel classico modello genetico di Flor (1955), la resistenza verticale è controllata da un singolo gene, solitamente dominante, chiamato "gene R" (di resistenza), mentre il gene corrispondente nel patogeno è chiamato "gene *avr*" (di avirulenza). I geni *avr* determinano l'incapacità di uno specifico patogeno di infettare una pianta portatrice del corrispondente gene R (Fig. 2).

Per quanto riguarda i patogeni batterici, più di 30 geni *avr* sono stati identificati in varie patovar di *Pseudomonas syringae* e *Xanthomonas* spp. Essi sono localizzati a livello cromosomico o plasmidico, non mostrano una marcata omologia di sequenza (ad eccezione della famiglia *avrBs3*), codificano per proteine idrofiliche che non contengono un peptide segnale classico e sono localizzati in regioni che fiancheggiano cluster di altri geni coinvolti nella patogenicità (geni coinvolti nella "hypersensitive reaction and pathogenicity", *hrp*). Il riconoscimento dei patogeni nelle piante è spesso determinato da singoli geni *R*, i quali possono codificare chinasi o più spesso per proteine citoplasmatiche con ripetizioni ricche di residui di leucina (leucine rich repeats, LRR) (Bonas e Van den Ackerveken, 1999).

Il riconoscimento in un saggio di resistenza o di suscettibilità di un patogeno portatore del gene *avr* da parte di una pianta con il corrispondente gene *R* determina una reazione incompatibile di avirulenza. Da un punto di vista biochimico, i geni *R* codificano probabilmente per proteine in grado di riconoscere prodotti diretti o indiretti (chiamati generalmente "elicitori") di un gene *avr* nel patogeno. Si suppone che i geni *R* codifichino per proteine-recettore, ma questo può essere vero solo in alcuni casi. I geni *R*, infatti, possono codificare anche per proteine "di guardia". Sorprendentemente, l'analisi delle sequenze di diverse proteine R ha rivelato l'esistenza di motivi condivisi che si ricombinano in maniera differente, tra cui ricordiamo domini di interazione/riconoscimento proteico quali LRR, moduli-

segnale quali domini con attività chinasica, domini avvolti a spirale (coiled-coil, CC), un sito in grado di legare nucleotidi chiamato NB e un domino denominato TIR a causa dell'omologia con domini simili presenti nella proteina Toll di *Drosophila* e nel recettore per l'interleuchina-1 dei mammiferi (Toyoda *et al.*, 2002)

Il riconoscimento mediato dal gene *R* di un patogeno portatore di un gene *avr* appropriato innesca una cascata di reazioni (trasduzione del segnale) che attiva la risposta di difesa nella pianta. Se il patogeno è portatore di un gene *avr* il cui prodotto non può essere riconosciuto dalla pianta, o se la pianta non ha il gene *R* corretto, allora la presenza del patogeno sarà rilevata troppo tardi per una risposta efficace e si verificherà l'infezione e la conseguente manifestazione della malattia.

		Genotipo della pianta	
		<i>Rlm1</i> resistente	<i>rlm1</i> sensibile
<i>AvrLm1</i> avirulento	R		
<i>avrLm1</i> virulento	S		

**Figura 2.** Un esempio di interazione “gene per gene” in cotiledoni di colza attaccati da *Leptosphaeria maculans*.

E' possibile classificare i batteri ed i funghi patogeni in base al tipo di interazione gene *R* - gene *avr*. Le specie batteriche che infettano le piante sono divise in sottogruppi chiamati patovar (pv.), cioè ceppi della stessa specie batterica che differiscono solo nella specie vegetale in grado di infettare. La classificazione dei patogeni fungini è invece più complessa. Le *formae speciales* (f. sp.) all'interno di una specie fungina sono degli isolati patogeni solo per un genere particolare di ospite ma non per un altro. Questi isolati possono essere morfologicamente identici ma in grado di infettare ospiti differenti. All'interno di ciascuna *forma specialis*, gli isolati patogenici per una cultivar ospite particolare o per un genotipo possono essere raggruppati in “razze” che hanno gli stessi geni di avirulenza coinvolti nell'interazione con le cultivar ospiti. Per alcuni patogeni biotrofici (es. funghi della ruggine), è possibile identificare centinaia di razze diverse.

I genotipi della pianta e del patogeno controllano l'esito dell'infezione (resistenza o suscettibilità), evidenziando una reazione gene per gene. La maggior parte dei funghi biotrofici patogeni sono stati definiti razze e possono essere identificate mediante test di patogenicità su cultivar ospiti e/o incroci genetici di differenti isolati, studiando i risultanti rapporti di segregazione e i fenotipi per comprendere il numero di geni coinvolti e la loro dominanza/recessività. E' comunque sempre importante notare che le infezioni dei patogeni non causano sempre una risposta netta nella pianta, ma spesso determinano reazioni intermedie chiamate "tipi di infezione" (pianta immune, altamente resistente, moderatamente resistente, moderatamente suscettibile, completamente suscettibile).

L'interazione "gene per gene" è basata sulla specificità dell'interazione stessa e, in assenza di riconoscimento (assenza di gene *R* o *avr*), si manifesta quindi la malattia. Affinché si verifichino resistenza o immunità, la pianta deve essere portatrice del gene *R* dominante e il patogeno deve essere portatore del gene *avr* dominante. La resistenza delle piante ai patogeni è quindi spesso determinata da singoli geni presenti in entrambi gli organismi interagenti. In questa interazione "gene per gene", la resistenza si verifica solo se il gene *R* della pianta interagisce con il corrispondente gene *avr* del patogeno (Bonas e Van den Ackerveken, 1999).

Un'ipotesi antitetica a quella classica, elaborata per la prima volta da Innes (1995), si basa invece su evidenze sperimentali in cui un singolo prodotto genico della pianta può mediare il riconoscimento di segnali multipli del patogeno o in cui geni multipli della pianta sono necessari per il riconoscimento e la risposta ad un singolo segnale del patogeno. Un genoma vegetale tipo, come quello di *Arabidopsis*, lungo circa 100 Mb e codificante 20.000 geni, non può contenere informazione sufficiente per tutti i geni *R* necessari in un'interazione "gene per gene". Anche considerano che il 10% dei geni di *Arabidopsis* (quindi circa 2000 geni) siano deputati alla difesa verso i patogeni, questi non sarebbero sufficienti per far fronte alla grande diversità genetica dei patogeni. Il prodotto di un gene *R*, quindi potrebbe essere una proteina recettore citoplasmatica ricca di residui di leucina (LRR, coinvolti nelle interazioni proteina-proteina) che può legare ligandi multipli, oppure potrebbe funzionare come parte dei meccanismi di trasduzione del segnale tra recettori e risposte, oppure ancora essere un recettore la cui specificità di ligando è modificata dall'interazione di differenti chinasi (Innes, 1995). I geni *avr* del patogeno, inoltre, non agiscono da soli, ma sono spesso abbinati a delle proteine

soppressore che inibiscono l'attività dei prodotti o la trascrizione del gene e probabilmente sono coinvolti molti altri geni del patogeno (Ellingboe, 2001).

Sebbene il prodotto del gene *avr* sia spesso chiamato "elicitore" perché provoca una risposta di difesa, ci sono molti altri elicitori non codificati da classici geni *avr*, come ad esempio prodotti del metabolismo batterico, frammenti di parete dei funghi, sotto-prodotti dei danni o delle risposte delle cellule vegetali, o ancora trattamenti chimici o stress, che imitano l'impatto degli elicitori *Avr* sulle cellule vegetali (ad es. ozono o UV-C). Mediante l'utilizzo di tecniche quali analisi di legame *in vitro* e di immunoprecipitazione, nonché di tecniche genetiche, è stato chiarito che le interazioni proteina-proteina sono una componente chiave dello scambio tra piante e patogeni che infine determina il successo per la pianta (resistenza) o per il patogeno (malattia), anche se in moltissimi casi non è prevista un'interazione diretta tra i prodotti di *R* e *avr* ma un coinvolgimento di proteine aggiuntive che formano veri e propri complessi proteici (Bogdanove, 2002). Le future ricerche quindi puntano su associazioni multiple e interdipendenti di proteine coinvolte nel riconoscimento dei patogeni.

Da un punto di vista evolutivo, è fondamentale capire perché i geni *avr* sono conservati nei patogeni se la presenza di questi geni permette al patogeno di essere riconosciuto e bloccato durante l'infezione. È comune osservare una perdita di avirulenza, con conseguente insorgenza di virulenza per una particolare razza di patogeno su una specifica cultivar ospite che perde così la sua resistenza. Questo non spiega però perché tutti i geni *avr* non scompaiano dalla popolazione del patogeno. Probabilmente alcuni geni *avr* sono essenziali per la normale crescita e sviluppo del patogeno o per il suo adattamento ambientale ed il riconoscimento del prodotto genico da parte dell'ospite è semplicemente uno sfortunato incidente per il patogeno. Per questo motivo, i patogeni non possono permettersi di perdere i geni *avr* per superare la resistenza dell'ospite, in quanto ciò causerebbe danni maggiori del beneficio della perdita del gene in questione. Altri geni *avr* hanno un ruolo chiave nel processo di patogenesi (overlapping e/o complementarietà incrociata con altri fattori di virulenza) e quindi la loro presenza è necessaria per l'attacco del patogeno alla pianta. In questo modo, alcuni geni *avr* potrebbero codificare fattori di virulenza necessari per l'insorgenza della malattia nell'ospite.

### *L'importanza dei fattori ambientali nell'interazione pianta-patogeno*

Le interazioni tra piante e patogeni possono essere spostate in favore della pianta o del patogeno da piccole variazioni ambientali, principalmente temperatura e stato nutrizionale della pianta, e non dipendono solo dai genomi dei due organismi coinvolti. Inoltre, lo stadio di sviluppo di una pianta può influenzare la resistenza o la suscettibilità ad un dato patogeno (Ellingboe, 2001). La colonizzazione delle piante da parte dei patogeni dipende dalla disponibilità di nutrienti per l'ospite. Subito dopo l'infezione, infatti, molti geni di batteri e funghi patogeni sono indotti dalla carenza di azoto in quanto i relativi promotori contengono sequenze di legame per fattori di trascrizione AREA prodotti dalla pianta (Snoeijers *et al.*, 2000). I fattori AREA regolano l'espressione di molti geni i cui prodotti sono necessari per l'utilizzo dell'azoto da fonti secondarie o quando l'azoto è scarso. Questo suggerisce che un ambiente povero di azoto potrebbe essere una delle cause dell'insorgenza della malattia.

A testimonianza dell'importanza dei fattori ambientali, altri autori (Sturz *et al.*, 1997) hanno evidenziato che le tecniche di lavorazione del suolo di tipo conservativo (conservation tillage), che prevedono il sovescio e la pacciamatura, causano un aumento del numero di specie microbiche presenti sulla superficie del suolo e quindi un ambiente più competitivo per le specie patogene. Ciò porta alla formazione di suoli in grado di auto-regolare la fauna microbica presente e quindi a migliori condizioni pedologiche per la crescita piante.

### *Geni di avirulenza ed elicitori specifici nel patogeno*

In molti casi, gli elicitori sono peptidi che derivano dai prodotti primari dei geni *avr* oppure enzimi coinvolti nella via biosintetica per la sintesi di elicitori non proteici (Ji *et al.*, 1998). Nei patogeni virali, gli elicitori sono rappresentati dalle proteine del capsido, dalla replicasi o da altre proteine virali. In altri casi, invece, i geni *avr* sono stati identificati ma non sono ancora associati alla produzione di elicitori specifici. In tutti i casi, l'elicitore agisce solo in piante portatrici del gene di resistenza corrispondente. Le proteine di avirulenza possono essere iniettate direttamente nelle cellule vegetali per mezzo di proteine dei geni *hrp* (facenti parte del sistema III di secrezione e con domini "coiled-coil"), le quali subiscono un

taglio proteolitico prima dell'ingresso nella pianta (Purl *et al.*, 1997). Alcune proteine di avirulenza agiscono nel citoplasma, ma altre (ad es. la famiglia *AvrBs3*) agiscono a livello nucleare.

### *Geni di resistenza nelle piante*

Il primo gene di resistenza clonato, *Pto*, codifica una proteina chinasi a serina/treonina e la risposta della pianta è mediata dall'interazione diretta di *Pto* con *Avr* e con l'ausilio di poche altre proteine (Zhou *et al.*, 1997). Tutti i geni identificati successivamente a *Pto* codificano invece per proteine con ripetizioni di leucine (LRR) e sono coinvolti in risposte molto più complesse, che coinvolgono anche le AOS come intermediari. Le proteine LRR hanno domini "P loops" che le rendono capaci di avviare una serie di meccanismi di trasduzione del segnale mediante l'interazione con nucleotidi ciclici (Bent, 1996). Proteine simili alle LRR coinvolte nei meccanismi di difesa delle piante sono state riscontrate anche nella trasduzione del segnale per gli ormoni brassinosteroidi nelle piante e nei recettori di alcuni ormoni negli animali, confermando l'elevata capacità di legame di queste proteine.

I geni coinvolti nei meccanismi di difesa-resistenza sono spesso raggruppati su particolari cromosomi e queste regioni possono essere altamente ricombinanti, come è stato dimostrato nel sistema lino, in cui sono presenti 13 o più alleli alternativi (proteine LRR) per la resistenza contro i geni di avirulenza della ruggine del lino (Ellis *et al.*, 1997). La ricombinazione di diversi alleli può portare, mediante l'evoluzione di nuovi geni di resistenza, al riconoscimento di razze del patogeno a cui prima la pianta risultava essere sensibile.

### *Parallelismi tra meccanismi di difesa nelle piante e negli animali*

Nonostante le reazioni di difesa nei regni vegetale e animale appaiano molto diverse tra loro, ci sono sempre maggiori indizi sul fatto che la HR delle piante ha delle caratteristiche di una difesa ancestrale di tipo umorale (sistema immunitario innato) verso funghi e batteri studiata in *Drosophila*, in cui sono coinvolte proteine-recettore LRR denominate Toll e interleukin-1 receptors (TIR). Nel sistema di difesa vegetale sono state riscontrate anche somiglianze con i fattori nucleari umani

kB coinvolti nei processi infiammatori. Il sistema immunitario innato di insetti e mammiferi è in grado di riconoscere molecole sulla superficie dei microrganismi patogeni, quali i lipopolisaccaridi (LPS) di batteri Gram-negativi e i peptidoglicani (Toyoda *et al.*, 2002). Inoltre, il meccanismo di riconoscimento e presentazione dell'elicatore alle cellule vegetali sembra molto simile a quello che avviene per l'antigene nel complesso maggiore di istocompatibilità dei Vertebrati (Ji *et al.*, 1998). Numerose proteine del sistema di difesa delle piante mostrano delle similarità di sequenza aminoacidica con una classe di recettori presenti nel sistema immunitario innato dei Mammiferi e degli Insetti che regolano i livelli citoplasmatici di  $Ca^{+2}$  e di AOS e attivano reazioni di difesa a cascata mediate dalle proteine chinasi (Nürnberg e Scheel, 2001).

Per questi motivi, lo studio sulla risposta ai patogeni delle piante potrebbe contribuire ad una maggiore comprensione delle difese in Insetti e Vertebrati.

#### *La reazione di ipersensibilità (HR)*

Una risposta efficace e attiva spesso determina nella pianta l'insorgenza di una reazione di ipersensibilità ("hypersensitive response", HR) in cui le cellule vicine al sito di infezione vanno incontro alla morte e bloccano la crescita del patogeno privandolo di sostanze nutritive e creando un ambiente altamente ossidante che danneggia le sue proteine e strutture cellulari. La HR è innescata dall'elicatore, il quale attiva geni per proteine chinasi che attivano a loro volta dei fattori trascrizionali (Ji *et al.*, 1998). I fattori di trascrizione, a loro volta, attivano geni che codificano per proteine di resistenza, le quali agiscono direttamente o indirettamente sullo sviluppo del patogeno nella pianta.

La risposta HR fa parte della maggior parte delle interazioni incompatibili ed è considerata uno dei meccanismi più importanti della resistenza delle piante ai patogeni. I siti di infezione sono le zone principali in cui avviene l'attivazione trascrizionale di una serie di geni di difesa della pianta nelle cellule vicine. La successiva biosintesi di metaboliti secondari protettivi e di proteine inibitorie intorno ai siti di infezione sono considerati importanti per bloccare l'invasione del patogeno (Kombrink e Schmelzer, 2001).

### *Trasduzione del segnale*

L'efficacia dei meccanismi di resistenza può essere fortemente influenzata da un insieme di segnali generati da stress biotici come anche da stress abiotici quali la carenza idrica, la limitazione di nutrienti o lo stress osmotico. La comprensione della natura biochimica di questi segnali e la conoscenza della specificità e della compatibilità dei sistemi di trasduzione del segnale che regolano l'espressione delle risposte riducibili potrebbero migliorare l'utilizzo di queste risposte per la protezione dei raccolti. Durante la risposta della pianta ai patogeni avvengono conflitti e sinergie di segnale, e molti di questi segnali di difesa si basano sull'acido salicilico (SA) e sull'acido jasmonico. Recentemente è stato scoperto in pomodoro un sistema di trasduzione del segnale basato sui livelli endogeni di ceramide, una potente micotossina coinvolta anche nei meccanismi di apoptosi (Bostok *et al.*, 2001). Di sicuro, infine, nel processo di trasduzione del segnale sono coinvolte chinasi e fosfatasi che agiscono su fattori di trascrizione per l'espressione di geni coinvolti nella difesa.

Gli elicitori del patogeno inoltre, in combinazione con altre proteine citosoliche, ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e calmodulina, causano l'attivazione di una NADPH-ossidasi situata nella membrana plasmatica. Quest'ultimo enzima è in grado di produrre anioni superossido, radicali idrossile e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tutti composti con forte potere ossidante, che causano un danno ossidativo e la conseguente induzione della serie di risposte metaboliche coinvolte nella difesa attiva, quali la perossidazione dei lipidi di membrana, la morte cellulare e la produzione di fitoalessine nelle cellule vicine (Doke *et al.*, 1996). Inoltre, gli stessi prodotti della degradazione delle membrane cellulari fungono da messaggeri ed attivano a cascata una serie di fattori di trascrizione.

Segnali non ancora identificati che derivano dalla HR si muovono in tutta la pianta e attivano la resistenza sistemica acquisita ("systemic acquired resistance", SAR), con la quale anche le cellule che non sono venute direttamente in contatto con l'elicitore vanno incontro occasionalmente a morte programmata. L'acido salicilico (SA) è un importante segnale del SAR. Sebbene la sua funzione non sia ancora stata chiarita del tutto, sembra che SA sia prodotto a livello dei piccioli e poi trasportato attraverso il sistema vascolare in tutta la pianta, traslocando in questo

modo il segnale della SAR dalle cellule HR ai tessuti vascolari dove può attivare progressivamente la morte cellulare e impedire così la diffusione del patogeno.

*La resistenza sistemica acquisita (SAR) e la risposta della pianta alle ferite (WR)*

La SAR è innescata dalla necrosi indotta dal patogeno causata da un'interazione incompatibile tra patogeno e ospite (HR) oppure dall'azione del patogeno in una reazione compatibile. In poche ore dalla necrosi localizzata, la pianta comincia ad esprimere una serie di geni correlati alla patogenesi (PR) sia localmente, nel punto di infezione, sia sistemicamente in tutto il resto della pianta, nei tessuti distali. Tra i geni coinvolti nel SAR, ci sono quelli che codificano per proteine responsabili dell'aumento della resistenza dei tessuti secondari non ancora infettati.

Questo tipo di resistenza è generalmente efficace nei confronti di una vasta gamma di patogeni ed è associata all'attivazione trascrizionale di una serie di geni marcatori, molti dei quali codificano per proteine implicate nella patogenesi, quali chitinasi e 1,3- $\beta$ -glucanasi; le lesioni necrotiche in seguito a morte cellulare causata tardivamente dalla colonizzazione della pianta da parte del patogeno, possono inoltre svilupparsi in molti casi, ma non sono necessarie per innescare la SAR (Kombrink e Schmelzer, 2001).

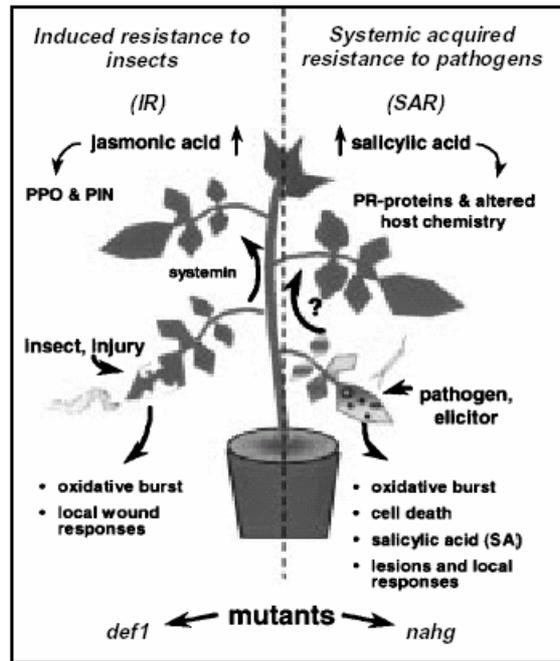
Al contrario, SA è sia necessario che sufficiente per l'induzione della SAR (Lawton *et al.*, 1996). I geni coinvolti nella patogenesi possono essere marcatori molecolari molto utili per identificare l'attivazione del SAR, anche se essi variano anche in modo significativo da specie a specie. In *Arabidopsis*, per esempio, i prodotti dei geni codificanti PR includono sicuramente una glucanasi (*PR-2*) e proteine simili alla traumatina (*PR-5*) e all'eveina (*PR-4*). Quest'ultima è anche attivata dall'etilene e dall'acido jasmonico, mentre altri ancora, come la defensina (*PR-12*) sono indotti da JA ed etilene ma non da SA. Tutte queste differenze possono essere spiegate dai diversi elementi regolatori all'interno dei promotori, i quali contengono spesso elementi che rispondono all'etilene (GCC boxes). Studi su mutanti hanno dimostrato inoltre che differenti geni codificanti PR possono rispondere a differenti combinazioni di segnali (Maleck e Dietrich, 1999).

In aggiunta alla SAR, le piante mettono in atto un efficace meccanismo di difesa nei confronti delle ferite ("wound response", WR) causate dagli insetti che

convogliano nell'induzione di una classe di inibitori delle proteinasi (PIN) (Ryan, 1990). Questi inibitori interferiscono con la digestione nell'intestino degli insetti e scoraggiano gli altri insetti a cibarsi dei tessuti vegetali. In questo caso, il segnale del meccanismo di risposta è mediato da JA ed etilene, che agiscono sinergicamente per indurre i geni implicati nella WR e stimolano reciprocamente la loro biosintesi (O'Donnel *et al.*, 1996). Ulteriori indizi però fanno supporre che la WR potrebbe anche avere un ruolo nella difesa contro specifici funghi patogeni ed essere indotta da elicitori fungini. JA ed etilene sono infine in grado di regolare anche i geni coinvolti nella risposta alla ferita, oltre a quelli della SAR. Sembra quindi che ci siano meccanismi di overlapping tra SAR e WR.

Sebbene la SAR e la WR siano gli esempi più studiati, ci sono anche evidenze di altri tipi di resistenza indotta. Un esempio tra questi è la resistenza sistemica indotta (induced systemic resistance, IR), che prevede l'induzione da parte di rizobatteri non-necrotizzanti o elicitori di questi batteri e non coinvolge i geni codificanti PR indotti durante dalla SAR (Fig. 3). Infine, un altro meccanismo di resistenza, chiamato EDR (enhanced disease resistance), è stato identificato in mutanti di *Arabidopsis* e non coinvolge né SA né i geni codificanti PR.

Tutti i meccanismi di difesa non sono controllati da segnali lineari indipendenti, ma i componenti di un meccanismo possono influenzare la trasduzione del segnale attraverso altre vie. SA esogeno o la sua forma acetilata (aspirina), ad esempio, influenza l'espressione dei geni indotti da ferita nel pomodoro (Doherty *et al.*, 1988), probabilmente inibendo la biosintesi di JA. L'etilene, a sua volta, non inibisce il gene *PR-1* della SAR ma piuttosto diminuisce la soglia di SA richiesto per l'espressione dello stesso gene. E ancora, la sistemina, un segnale mobile richiesto per l'induzione sistemica della WR potrebbe potenziare il danno ossidativo che è uno dei primi eventi della HR nei confronti del patogeno (Stennis *et al.*, 1998). Anche solo da questi tre esempi, si può comprendere che l'interazione tra SAR e WR sembra essere molto più complessa di una inibizione diretta e che probabilmente tra i due sistemi sono coinvolti sia meccanismi di attivazione reciproca che di antagonismo.



**Figura 3.** Comparazione tra resistenza indotta e resistenza sistemica acquisita (da Bostock et al., 2001).

### Prospettive future

Sebbene l'importanza di piccole molecole, quali le AOS, siano implicate nelle risposte HR e nella morte cellulare, resta ancora da dimostrare un nesso causale tra produzione di AOS, morte cellulare dovuta alla HR e resistenza al patogeno indotta sia locale che sistemica. Sembra comunque che la risposta della pianta ad uno specifico patogeno possa essere il risultato di una complessa rete di induzione e integrazione del segnale (Maleck e Dietrich, 1999). Inoltre, non è stata ancora data una risposta soddisfacente a molte domande, quali gli effetti temporali tra infezione e manifestazione della malattia, la presenza di meccanismi di innesco della risposta non influenzati dai patogeni o dalle molecole segnale e i meccanismi di risposta non regolati allo stesso modo in tutte le specie. In futuro, sarà quindi importante determinare se la pianta attiva una difesa stereotipata a tutti gli attacchi dei patogeni o se invece sia capace di riconoscere una moltitudine di componenti dei suoi patogeni naturali per regolare finemente la risposta ad un determinato patogeno, come sembra più evidente.

## **MECCANISMI GENETICI SPECIFICI COINVOLTI NELLE INTERAZIONI PIANTA-FUNGO PATOGENO**

### *Analisi molecolare e bioinformatica dei genomi e dei trascrittomi*

Le informazioni sulle funzioni dei geni nelle interazioni pianta-fungo attraverso l'analisi di sequenze espresse sono fondamentali per comprendere il metabolismo e la biologia alla base del comportamento dell'organismo patogeno. Questi studi permettono di individuare gli eventi chiave coinvolti nei processi di infezione e di colonizzazione della pianta.

Il sequenziamento parziale delle sequenze terminali 3' e 5' dei cloni di DNA complementare (cDNA) per individuare una serie di sequenze espresse (expressed sequence tags; EST) rappresenta una procedura relativamente poco costosa e rapida per trovare geni e ottenere informazioni sulla loro espressione negli organismi meno studiati, come i funghi patogeni per le piante. Determinare tuttavia la precisa funzione dei geni scoperti è spesso difficile ed è necessario avvalersi di altre tecniche molecolari, quali la rottura mirata dei geni (targeted gene disruption) o l'interferenza con RNA (RNA interference), che causano fenotipi con perdita di funzione genica. L'individuazione delle EST è facilitata dall'analisi di similarità a livello di sequenze nucleotidiche o amminoacidiche di geni e proteine correlate in banche dati pubbliche del National Centre for Biotechnology Information (NCBI) o dell'European Bioinformatics Institute (EBI), utilizzando programmi quali il Gapped BLAST, che si basano su algoritmi per cercare una sequenza di DNA contro un database di DNA (Blastn) oppure una sequenza di DNA tradotta in tutte le sei finestre di lettura contro un database di proteine (Blastx). Tuttavia, riuscire ad attribuire una funzione ad un particolare gene mediante lo studio dell'omologia di sequenza dipende da un numero di fattori, tra cui la ridondanza del prodotto genico e la disponibilità dei dati sperimentali già presenti nelle banche dati, che è molto scarsa per i patogeni fungini. Bisogna ricordare che la ridondanza e l'amplificazione sono meccanismi cellulari finalizzati a rifornire la cellula di un corrispettivo di prodotti genici vitali; per ridondanza s'intende l'aumento del numero di copie di un certo gene per cromosoma, mentre l'amplificazione è l'aumento del numero di copie geniche nella cellula (Molinari, 2003). Di sicuro, il sequenziamento completo del genoma del lievito, ha permesso di identificare 6200 open reading frames (ORF) e

ha fornito moltissimi dati funzionali, applicabili anche ad altre specie di funghi evolutivamente vicini. Stime recenti (Skinner *et al.*, 2001) suggeriscono che il genoma di un ascomicete è di circa 36 Mb e contiene da 8000 a 9000 geni.

Naturalmente, il valore delle informazioni che si ottengono dall'analisi delle EST dipende dalla qualità delle librerie di cDNA e delle sequenze di DNA derivate, reperibili presso le principali banche dati (principalmente dbEST del NCBI). I dati delle EST, inoltre, possono essere migliorati per ottenere una serie di sequenze uniche non ridondanti (unisequenze) attraverso l'analisi e l'assemblaggio dei cluster con programmi sviluppati dall'Institute for Genome Research (TIGR) e dall'European Bioinformatics Institute (EBI). Attraverso l'analisi di similarità, la entry che fornisce il migliore match statistico (e-value) è utilizzata come fonte primaria per assegnare una funzione ad una sequenza. La assegnazione senza ambiguità di una funzione ad una sequenza è un compito molto complesso e dipende da un numero di fattori quali la significatività statistica del match e il giudizio da parte di personale esperto con competenze di diverse aree delle scienze biologiche ed agrarie.

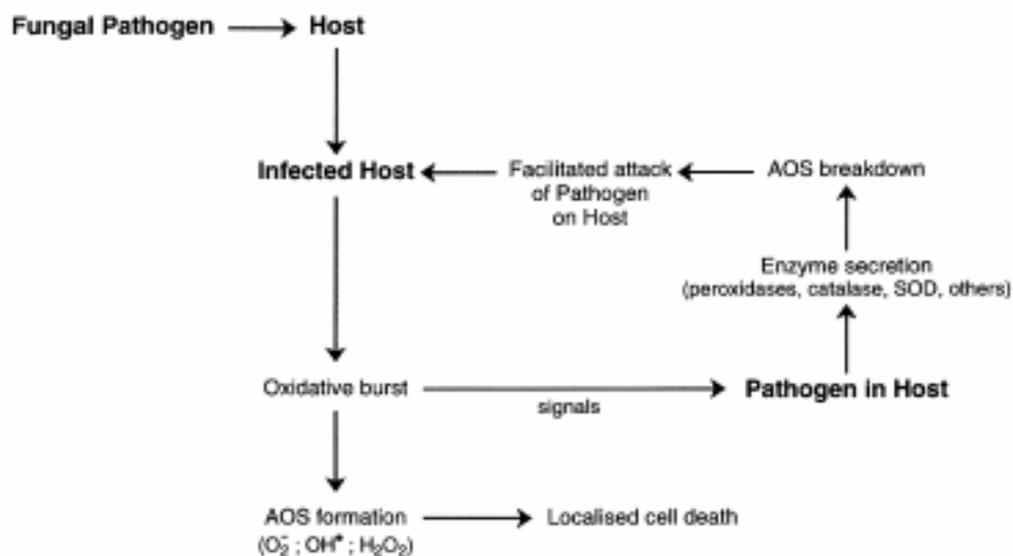
La attuale tendenza a sequenziare interi genomi, tra i quali sono previsti anche quelli di due funghi parassiti (*M. grisea* e *B. graminis*), porterà a risultati molto significativi in un futuro prossimo e permetterà di studiare la struttura genomica e l'evoluzione e le differenze tra questi funghi specializzati. Solo dopo il sequenziamento totale, sarà possibile applicare l'analisi del trascrittoma e del proteoma, al fine di capire come uno specifico prodotto genico interagisce ed influenza le componenti metaboliche e biologiche che determinano le caratteristiche uniche di un patogeno.

#### *Espressione genica nei parassiti vegetali*

E' importante inoltre considerare che tutti gli aspetti metabolici e fisiologici di una cellula agiscono insieme e funzionano sinergicamente (Fig. 4), e che quindi assegnare i geni ad un particolare processo metabolico o cellulare aiuta ad aver una panoramica generale su quali siano i processi importanti in un organismo vivente. Per questo motivo, dividere i geni dei parassiti vegetali in categorie funzionali (come ad esempio è stato fatto nell'Expressed Gene Anatomy Database) ha fornito utili risultati per comprendere il metabolismo di un organismo. E' bene dire che una

gran parte (32%) dei geni con omologhi nel database ha mostrato similarità con proteine senza una funzione ben chiara (proteine ipotetiche) o con proteine a funzione ancora non nota, ma molti altri sono coinvolti in processi fondamentali quali la crescita e la divisione cellulare, la sintesi proteica e la produzione di energia o sono implicati nel metabolismo intermedio, tra cui molti processi anabolici di aminoacidi, basi azotate e vitamine. Altri geni sono coinvolti in processi come l'immagazzinamento e la mobilitazione delle riserve di trealosio e di glicogeno e la sintesi di composti della parete cellulare, come chitina e glucani, oppure hanno una funzione nelle reazioni anaplerotiche, nel metabolismo degli acidi grassi, nei processi fermentativi, nella regolazione osmotica, nel turnover proteico, nella trasduzione del segnale, nella sintesi di tossine e composti allelopatici, nella formazione di strutture di infezione (ad es. appressori) e nelle reazioni ossidative delle AOS in mitocondri, cloroplasti e perossisomi (Skinner *et al.*, 2001).

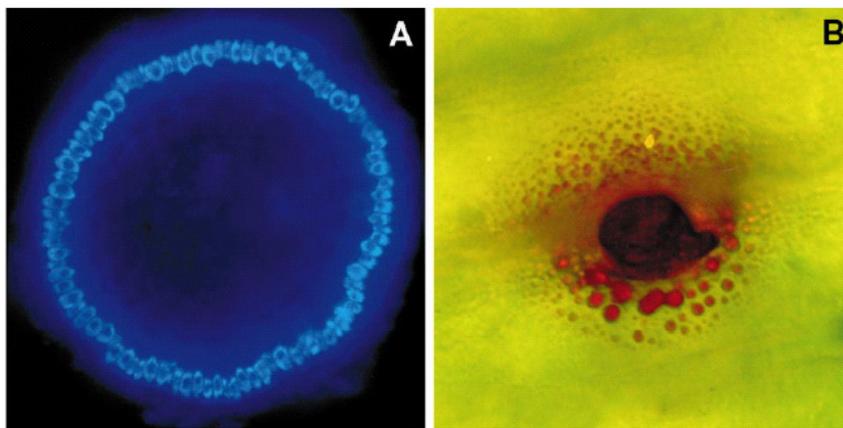
Molto spesso i funghi necrotrofici sono in grado di fronteggiare la risposta HR della pianta per mezzo di una serie di enzimi che permettono loro di vivere in ambiente reso ostile dall'ospite e di rimuovere e inattivare le AOS. Questi enzimi includono superossido dismutasi (SOD), isoforme di perossidasi (APX, GPX), catalasi, laccasi e polifenolo ossidasi (PPO). Anche se il loro preciso compito durante l'invasione dell'ospite e la resistenza al fungo non è ancora compresa, è probabile che le AOS inneschino la risposta dei funghi necrotrofici all'ambiente dell'ospite (Mayer *et al.*, 2001).



**Figura 4.** Rappresentazione schematica delle interazioni tra una pianta ed un fungo necrotrofico patogeno (da Mayer *et al.*, 2001).

*Composti antimicrobici e patogeni fungini*

Molte piante producono metaboliti secondari a basso peso molecolare con azione anti-fungina. Alcuni di essi (composti antimicrobici o fitoanticipine) sono già presenti in piante sane ma, in determinate condizioni, rappresentano una “barriera chimica” contro l’infezione di potenziali patogeni. Altri composti, come le fitoalessine, sono invece sintetizzati in risposta di un attacco patogeno (Fig. 5) (Osbourn, 1999).



**Figura 5.** (A) Un composto antifungino pre-sintetizzato che “anticipa” l’attacco del fungo: avenacina autofluorescente nell’epidermide di una giovane radice di avena; (B) formazione e mobilizzazione di vescicole che producano fitoalessine verso il sito di attacco del fungo in un genotipo di sorgo resistente a *Colletotrichum graminicola*: la struttura nera nel centro è un appressorio del fungo, mentre le fitoalessine appaiono colorate in rosso (da Osbourn et al., 1994).

Tali composti includono una vasta gamma di metaboliti secondari quali fenoli, saponine, glucosidi cianogenici, acidi idrossiamminici ciclici, sesquiterpeni, isoflavonoidi, derivati solforati dell’indolo ed altri ancora. E’ necessario che i composti antifungini siano nel posto giusto ma anche che siano disponibili in quantità sufficiente al momento opportuno.

Se queste molecole hanno un ruolo importante nella resistenza delle piante contro i patogeni, allo stesso tempo fanno in modo che con il tempo il patogeno diventi capace di aggirare o tollerare queste difese mediante degradazione enzimatica o meccanismi non degradativi. Il fungo patogeno può ad esempio rimanere quiescente fino al momento in cui il frutto non manifesta più la sua tossicità, come nel caso del pericarpo del frutto di avocado acerbo contenente una

sostanza tossica per il patogeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Prusky e Keen, 1993) ed in tal caso evitare (“avoidance”) le difese della pianta. Un altro di questi casi si verifica quando i patogeni evitano il riconoscimento da parte del sistema di sorveglianza della pianta ospite, la quale non rilascia così i composti antimicrobici, oppure quando il fungo produce molecole che sopprimono la risposta di difesa della pianta (Shiriashi *et al.*, 1992).

La crescita di un fungo può essere ritardata dai metaboliti antimicrobici prodotti dalla pianta ospite, anche se un organismo patogeno possiede solitamente una grande tolleranza a molti di questi composti, i quali possono anche agire contemporaneamente e/o manifestare un effetto sinergico sul patogeno (Osbourn, 1999). La sintesi di sostanze tensioattive permeabilizzanti come le saponine, infine, potrebbe rendere gli invasori patogeni più accessibili ad altri composti antimicrobici.

Per quanto riguarda invece i meccanismi di tolleranza alle sostanze antimicrobiche, ricordiamo che alcuni funghi possiedono attività enzimatiche degradative verso queste sostanze. Il fungo necrotrofico *Botrytis cinerea*, ad esempio, è capace di degradare fitoalessine, glicoalcaloidi e saponine prodotti da diverse specie vegetali e di conseguenza ha anche un ampio spettro di patogenicità (Osbourn, 1999). Gli enzimi degradativi dei patogeni possono inoltre fornire nutrienti agli stessi dal momento che i metaboliti secondari antimicrobici spesso rappresentano una parte considerevole del peso secco di una pianta (Van Etten *et al.*, 1995). Sono stati identificati anche meccanismi di tolleranza non degradativi che permettono ai funghi anche di invadere piante che producono sostanze antimicrobiche. Tali meccanismi prevedono una resistenza innata a queste sostanze (ad esempio respirazione resistente ai composti cianidrici, membrane ricche di steroli contro le saponine, proteine di trasporto di membrana che espellono gli antimicrobici e sono indotte dalle stesse sostanze) e di conseguenza i funghi sono protetti anche in assenza di altri mezzi di degradazione.

### *Geni funzionali e geni strutturali*

Esistono ancora molte controversie circa la distinzione fra geni funzionali (o regolati) e geni strutturali (o costitutivi). Tra le varie definizioni vi è quella che definisce come geni strutturali quelli che rivelano una cinetica di espressione

costante e geni funzionali quelli per cui l'espressione è regolata. Tuttavia esistono dei meccanismi di regolazione che agiscono su tutti i geni, quali la struttura del promotore, come descritto sopra, la struttura del prodotto di trascrizione (mRNA) e la sequenza di basi associata al segnale di inizio della trascrizione (AUG), dalla quale dipende la velocità della traduzione. La più rispondente alla realtà e la più accreditabile è dunque la definizione secondo cui i geni funzionali presentano un'espressione differenziale, tale per cui il prodotto genico varia quantitativamente. Un gene strutturale invece si esprime in maniera costante e il suo prodotto genico si ritrova nella cellula indipendentemente dalle condizioni di crescita e mantiene una concentrazione costante. Al contrario, l'espressione di un gene funzionale è soggetta a modificazioni dipendenti dagli stimoli esterni. La logica che sottende a tali meccanismi sta nella differente utilità dei prodotti genici: quelli dei geni strutturali sono essenziali per lo sviluppo dell'organismo (RNA ribosomiale, RNA transfer, istoni, ecc.); i geni funzionali invece codificano per prodotti che sono necessari solo in particolari condizioni. Ne consegue che il controllo dell'espressione dei geni funzionali può avvenire a livello di trascrizione, per cui il gene può essere trascritto solo in virtù di certi stimoli, e a livello di traduzione, per cui l'mRNA preventivamente sintetizzato può essere tradotto solo in opportune circostanze.

#### *Le proteine correlate alla patogenesi nelle piante (PR)*

Tra gli enzimi principali implicati nella risposta di difesa della pianta, le  $\beta$ -glucanasi e le chitinasi giocano un ruolo chiave. Le attività di questi enzimi sono correlate con la resistenza della pianta in quanto i loro substrati,  $\beta$ -1,3-glucano e chitina, sono i principali componenti della parete cellulare di molti funghi e degradano le giovani ife fungine durante la loro penetrazione nei tessuti dell'ospite.

Studi su varie specie vegetali hanno mostrato che esistono cinque classi di chitinasi che si differenziano per la loro sequenza aminoacidica e sono incluse in due famiglie di glicosil-idrolasi non correlate tra loro (Park *et al.*, 2002). Una conferma dell'importante ruolo di questi enzimi durante le reazioni di difesa della pianta è stata data anche dall'espressione della loro attività anche in piante transgeniche che mostrano una sovra-espressione costitutiva dei geni corrispondenti (Suarez, 2001; Carstens *et al.*, 2003).

Una forma acidica di  $\beta$ -glucanasi e tre forme di chitinasi sono state anche isolate da foglie di *Cucumis sativus* L. inoculate con il fungo necrotrofico *Colletotrichum lagenarium* (Ji e Kuć, 1996). Proprietà antifungine sono state anche riscontrate in specie arboree quali *Castanea sativa* e sono state attribuite all'effetto di diverse isoforme di chitinasi contro il fungo *Cryphonectria parasitica* (Vannini *et al.*, 1999). Considerando la potente azione delle chitinasi sui legami  $\beta$ -1,4 della chitina, è stato anche proposto di utilizzare microrganismi in grado di sintetizzare questo enzima, come ad esempio *Alcaligenes xylosoxydans*, per inibire la crescita di funghi patogeni (Vaidya *et al.*, 2001). Curiosamente, una chitinasi isolata da *Phaseolus vulgaris*, chiamata faseina A, non presenta solo un'azione antifungina, ma è anche in grado di stimolare l'azione dei macrofagi del sistema immunitario murino e di inibire l'attività di alcune retro-trascrittasi virali, probabilmente a causa della natura polifunzionale di questo enzima (Ye e Ng, 2001)

Oltre a questi enzimi, una funzione importante è rivestita dalle cosiddette proteine che inattivano i ribosomi ("ribosome-inactivating proteins", RIP), le quali entrano nelle cellule fungine grazie alla precedente azione di glucanasi e glucosidasi e bloccano la sintesi proteica nel patogeno. In alcuni casi, sono stati isolati da tessuti vegetali enzimi bifunzionali sia con attività chitinasica che con attività 28S rRNA N-glicosidica tipica delle RIP (Remi Shih *et al.*, 1997). Tutte le proteine della risposta di difesa delle piante finora viste possono essere indotte dall'esposizione a funghi, virus ed etilene, e dalla insorgenza di ferite.

#### *Regolazione negativa della resistenza ai funghi*

Oltre ai fattori di resistenza positivi, le piante codificano fattori di regolazione negativi di resistenza per controllare in modo spaziale e temporale l'intensità delle risposte di difesa, che altrimenti potrebbero essere pericolose per la pianta stessa. La scoperta dei fattori di regolazione negativi è dovuta allo studio di mutanti che manifestano una maggiore resistenza e specificità ai funghi patogeni. Tra i geni più importanti finora identificati e clonati ricordiamo *Mlo* nell'orzo, che codifica un regolatore negativo per la resistenza alla muffa bianca, ed *EDR1* nel pomodoro (Toyoda *et al.*, 2002).

### *Suscettibilità mediante fattori di virulenza fungini*

Per molto tempo si è creduto che l'incompatibilità (resistenza "gene per gene") fosse sovrapposta ad una compatibilità di base tra ospite e parassita, e che in assenza della resistenza "gene per gene", i patogeni non fossero avvertiti dall'ospite. Tuttavia, dati recenti (Toyoda *et al.*, 2002) indicano che molte sostanze derivate dai patogeni e dagli ospiti sono rilasciate durante l'infezione compatibile (ad es. frammenti di parete cellulare, metaboliti secreti, lipidi, proteine, peptidi, enzimi) e sono in grado di indurre risposte di difesa nell'ospite. Inoltre, i patogeni hanno una vasta gamma di strategie per superare queste difese, alcune delle quali sono essenziali per l'instaurazione di un'interazione compatibile e per una crescita ottimale del patogeno. I fattori derivati dai patogeni che neutralizzano le difese dell'ospite sono chiamati collettivamente "fattori di compatibilità" e possono essere suddivisi in tre grandi categorie: a) tossine che distruggono completamente la capacità della cellula ospite di difendersi attivamente, provocandone la morte (ad es. tossine ospite-selettive, HST), b) sostanze che sopprimono le attività specifiche del metabolismo della cellula ospite necessarie per la difesa (ad es. repressori), e c) enzimi che detossificano i composti antimicrobici spesso presenti nell'ospite (ad es. le saponine, che sono dei composti glicosilati prodotti costitutivamente nelle piante sane e quindi rientrano nella classe delle fitoanticipine).

### **L'OGGETTO DELLO STUDIO: INTERAZIONE *Fragaria vesca*-*Rhizoctonia fragariae***

#### *Morfologia, ecologia e tecniche colturali della fragola*

La fragolina di bosco (*Fragaria vesca* L.; Fig. 6) è una specie diploide ( $2n=14$ ) appartenente alla famiglia delle *Rosaceae*, sottofamiglia *Rosoidaeae*, e fu descritta per la prima volta da Linneo nel 1754. La pianta presenta un apparato radicale fascicolato, la cui profondità è di circa 30 cm, mentre il fusto, chiamato anche cespo o corona, si presenta raccorciato e da esso di dipartono le foglie ed i peduncoli fiorali. Le foglie sono lungamente picciolate, pinnate, palmate, suddivise in 3-4 foglioline, con margine seghettato, di colore verde-rossastro e con una elevata densità stomatica (Fig. 7). Le gemme vegetative e riproduttive si formano

all'ascella delle stipole, presenti alla base delle foglie e danno origine ad altri cespi, infiorescenze o stoloni. Questi ultimi, in corrispondenza dei nodi, emettono radici e costituiscono una nuova pianta e possono dare origine in questo modo fino a 100 piante figlie da un'unica pianta originaria.



Figura 6. Tavola sistematica di *Fragaria vesca*..

I fiori, riuniti in corimbi, possono essere sia ermafroditi che unisessuali e presentano un calice con normalmente 5 sepali, una corolla di 5-12 petali bianchi ed ellittici, stami di lunghezza variabile posti su 3 verticilli in numero multiplo di 5 ed inseriti sul ricettacolo, un numero variabile di organi femminili disposti a spirale all'estremità del ricettacolo e di colore giallo, con ovuli da cui si forma un piccolo achenio duro (Fig. 7).

Dalla fecondazione degli ovari si forma uno pseudocarpo proveniente dall'ingrossamento del ricettacolo che costituisce la parte edule (Fig. 7), la cui dimensione è determinata dal numero di ovuli fecondati e dal grado di ingrossamento del ricettacolo, e sul quale sono presenti gli acheni (veri frutti). I sepali possono essere aderenti al frutto, liberi o riflessi, di colore verde o raramente rossastro, e formano un calice che si distacca più o meno facilmente dal frutto. Il frutto dell'asse primario matura per primo e presenta maggiori dimensioni e forma più irregolare rispetto a quelli degli assi di grado inferiore. I frutti possono

presentarsi sferici, subsferici, reniformi, conici, biconici o quasi cilindrici; a volte, a causa di basse temperature e umidità relativa elevata, mancata germinazione del polline, attacchi di parassiti, lunghezza irregolare degli stami, scarsa attività degli insetti pronubi, i frutti acquisiscono una forma irregolare. L'impollinazione può essere anemofila o entomofila ed il polline matura prima dell'antesi, rimanendo vitale per alcuni giorni. Anche i pistilli sono ricettivi per un periodo simile a quello degli stami. La temperatura per l'impollinazione ha un optimum intorno a 20°C ed il frutto matura in circa 30 giorni se la temperatura è maggiore di 15°C. Il fotoperiodismo, infine, ha un ruolo importante nel processo fruttificazione e stolinizzazione ed, in base alle esigenze di luce, si possono distinguere varietà a giorno corto, lungo e neutro.

Il sistema colturale più diffuso per la fragola è la coltura annuale, con un solo ciclo di fruttificazione nella primavera successiva all'impianto estivo, ma ultimamente si sono affiancate altre tecniche di coltivazione più innovative come le colture autunnali, in suolo e fuori suolo, che, sempre con ciclo annuale, realizzano un doppio ciclo di fruttificazione (in autunno subito dopo la piantagione e nella primavera successiva). Oggi si assiste sempre più ad un utilizzo crescente di materiale di moltiplicazione fresco, con conseguente riduzione dell'uso di materiale frigoconservato. La coltura protetta interessa attualmente circa il 45% della superficie investita a fragola e la sua adozione è in costante aumento perché permette la protezione dei fragoletti dalla pioggia durante la maturazione, senza influenzare l'epoca di maturazione, come invece avviene per le protezioni tradizionali (Fig. 8). Un'analogha espansione si è registrata dall'inizio degli anni '90 per i fragoletti fuori suolo su torba e perlite. La coltura fuori suolo è una tecnica che presenta costi elevati ma che consente la produzione di fragole destagionalizzate, ben renumerate dal mercato.

### *Avversità della fragola*

Le specie del genere *Fragaria* sono suscettibili ad un elevato numero di patologie di natura abiotica e biotica. Una delle fisiopatie di natura abiotica che si verifica con maggior frequenza, è l'imbrunimento marginale delle foglie, che si manifesta a temperature superiori a 25°C e sembra essere causata da deficienze di calcio nei giovani tessuti.



**Figura 7.** Particolari di piante di *Fragaria vesca*.

Il danno è più rilevante sulle foglie giovani, dove il sintomo che lo caratterizza è la comparsa di macchie giallo-paglierine, visibili anche in trasparenza. La fisiopatia interessa a volte tutto il margine della foglia e ne provoca successivamente un viraggio di colore verso il bruno e l'arricciamento. Diverse sono invece le fisiopatie di natura biotica che sono determinate da numerosi agenti causali; quali insetti, batteri, virus e funghi. I patogeni trasportati nell'aria, le piante infestanti, gli antonomi delle radici ed i nematodi possono causare cospicue perdite di produzione (LaMondia *et al.*, 2002).

Tra gli insetti, gli afidi sono pericolosi oltre che per i danni diretti anche per la trasmissione di malattie da virus. Le specie di afidi più insidiose sono *Aphis gossypii* Glover e *Chaetosiphon fragaefolii* Cock. Altri insetti che arrecano danni sono le larve di alcuni curculionidi, quali il rinchite (*Coenorhincus germanicus*

Harbst), l'antonomo (*Anthonimus rubi* Harbst), l'oziorrinco (*Otiorrhyncus rugosostriatus* Goeze), che provocano erosioni a livello del colletto e dell'apparato radicale. Gli acari, dei quali il più diffuso è il ragnetto rosso (*Tetranychus urticae* Kock), preferiscono temperature intorno a 20°C e varietà le cui foglie possiedono un elevato contenuto in aminoacidi, mentre quelle con elevato contenuto in carboidrati sembrano meno attaccate. Per i nematodi sono da ricordare: *Aphelenchoides fragariae* Christie e *A. ritzemabosi* Steiner, che attaccano steli e piccioli. Sono segnalati inoltre danni da nottue terricole, limacce e lumache.

Tra i batteri dannosi, sicuramente va menzionato l'agente specifico *Xanthomonas fragariae*, che è l'agente causale della maculatura angolare della foglia e si diffonde attraverso il materiale di propagazione ed i residui colturali. I sintomi che caratterizzano questa patologia sono la comparsa di macchie idropiche angolari dal diametro di 1-2 mm, inizialmente presenti solo sulla pagina inferiore della foglia e successivamente visibili sulla pagina superiore. Con il proseguo della malattia, tali macchie possono estendersi e confluire le une con le altre, fino ad interessare gran parte della lamina fogliare, andando a ridurre drasticamente la superficie fotosintetizzante (Matta A., 1996). Le radici delle piante infette tendono ad avere un accrescimento limitato rispetto al normale ed assumono una colorazione leggermente brunastra.

*Fragaria vesca* è molto reattiva alla presenza dei virus, per cui si usa come pianta "test" per eccellenza. Le virosi più note e frequenti in Italia si diffondono principalmente per mezzo della moltiplicazione agamica, della pianta infetta o, più frequentemente, ad opera di insetti vettori fra i quali si distinguono gli afidi. Nell'arricciamento delle foglie (Strawberry Curling Virus, SCV) il virus è trasmesso da afidi in modo persistente e le manifestazioni della virosi iniziano ad apparire a circa 4 settimane dall'infezione. I danni consistono in una maculatura clorotica del lembo, decolorazione nervale, arricciamento e bollosità della lamina, riduzione del ritmo di sviluppo e nanismo. Un'ulteriore virosi è l'ingiallimento del margine fogliare (Strawberry Mild Yellow Edge Virus, SMYEV), in cui l'agente patogeno è trasmesso per parti di pianta e da afidi in modo persistente. Il sintomo caratteristico è la sostituzione della normale pigmentazione con una giallo-ocra ed maggiormente evidente nel periodo primaverile, per poi attenuarsi con l'arrivo dell'estate. Ricordiamo ancora la maculatura (Soybean Mosaic Virus, SMV), la quale risulta difficile da riconoscere con la semplice individuazione dei caratteri sintomatologici,

vista la grande variabilità di questi nelle diverse cultivar di *fragaria x ananassa* e la loro fugacità. Su *Fragaria vesca*, invece, la virosi si manifesta con la formazione di una maculatura clorotica ben evidente, deformazioni varie del lembo, e riduzione di sviluppo particolarmente accentuata nel primo periodo dell'inoculazione. Per tale motivo viene utilizzata come pianta spia e come ospite differenziale per i numerosi ceppi del virus. Infine vi sono la decolorazione perinervale (Strawberry Vein Banding Virus, SVBV), l'arrotolamento fogliare, (Shallot Latent Virus, SLV), il mosaico dell'arabis (Arabis Mosaic Virus, ArMV), l'avvizzimento bronzeo fogliare, la virescenza (green petal) e gli scopazzi (witches broom), questi ultimi due trasmessi da micoplasmi.

Tra le malattie fungine che producono danni ai frutti, vi è la muffa grigia (*Botrytis cinerea* Pers., *Rhizopus nigricans* Ehrenb.), il marciume bruno (*Phytophthora cactorum* Schroet), *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) Masee, *S. minor* Jagg., *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Aspergillus niger* Thieg. Le foglie, oltre che dal marciume bruno, possono essere colpite dalla maculatura rosso-bruna (*Diplocarpon earliana* Wolf.), dalla maculatura zonata (*Gnomonia fragariae* Fall.), dalla vaiolatura (*Mycosphaerella fragariae* Lda.), dalla necrosi fogliare (*Psomopsis obscuram* Sutton.), del mal bianco (*Sphaerotheca macularsi* Magnus.) e dalla fusariosi (*Fusarium solani* App. et Wr.).

Sulle radici e sul rizoma si possono riscontrare attacchi di *B. cinerea*, di *Rhizoctonia fragariae* (marciume bruno) Husain et Mckeen, avvizzimenti da *Verticillium alboaurum* Reinke et Berth. e *V. dhaliae* Kleb., midollo rosso (*Phytophthora fragariae* Hickman), necrosi della corona (*P. cactorum*) e radice nera (*Idrella lunata* Nel et Wil.).

In particolare, il marciume nero delle radici, una complessa e grave patologia causata da una serie di patogeni, determina la morte delle radici e un danno al parenchima corticale, riducendo così il vigore, la sopravvivenza e la produttività della pianta. *Rhizoctonia fragariae* Husain et Mckeen è un patogeno specifico che attacca principalmente il parenchima radicale ed è uno dei principali agenti eziologici del marciume bruno (Wilhelm *et al.*, 1972). La gravità di questa malattia aumenta in concomitanza con l'infezione e la lesione delle radici da parte del nematode *Pratylenchus penetrans* (LaMondia *et al.*, 2002).



Figura 8. Tecniche colturali adottate nei fragoleti.

### *Rhizoctonia fragariae*

Il principale agente causale della rizottoniosi (black root rot) è *Rhizoctonia fragariae* Husain et Mckeen, un fungo appartenente al phylum *Basidiomycota*, classe *Basidiomycetes*, sottoclasse *Holobasidiomycetidae*, ordine *Ceratobasidiales*, famiglia *Ceratobasidiaceae*. Esso è un patogeno che attacca principalmente la fragola, anche se viene associato spesso a patologie di diverse piante coltivate. La rizottoniosi è però causata anche dall'azione sinergica di altre specie di funghi e nematodi e da fattori abiotici. Tra i patogeni fungini partecipano *Pythium ultimum*, *Idriella lunata* e altre specie di *Rhizoctonia*, mentre il nematode più importante è *Pratylenchus penetrans*. Un ruolo minore è attribuito ad altri funghi, quali *Coniothyrium fuckelii*, *Cylindrocarpon* spp., *Hainesia lythri* e *Pyrenochaeta* sp. La composizione del complesso dei patogeni è influenzata dalla tipologia di suolo e dalle condizioni ambientali, ad esempio il genere *Pythium* predomina nei suoli sabbiosi ed è favorito a basse temperature, mentre *Rhizoctonia* preferisce suoli argillosi. I nematodi sono anch'essi responsabili della patologia in quanto limitano la crescita radicale cibandosi sulle radici e causano ferite che predispongono

l'apparato radicale all'attacco dei funghi patogeni. Inoltre, gli stress fisici, quali compattazione del suolo, water logging, carenza idrica e basse temperature aumentano l'incidenza del rizottoniosi. Contribuiscono alla patologia anche la scarsa rotazione dei suoli, l'utilizzo di suoli troppo compatti e poco strutturati, l'applicazione di erbicidi a dosi eccessive (es. terbacil) e la durata della produzione di fragole nello stesso campo (la patologia è rara su suoli vergini o coltivati a fragola solo da poco tempo).

I sintomi sono un deperimento o collasso generale della pianta, a causa della morte delle radici e radichette (Fig. 9). La penetrazione del fungo nel tessuto della pianta, facilitata dalla produzione di diversi isoenzimi della endo-poligalatturonasi (Cervone *et al.*, 1977), può avvenire per aggregazione di ife sulle radici, causando la decolorazione e la morte delle cellule, con conseguente penetrazione attraverso tale tessuto morto, o per invasione diretta attraverso aperture naturali e ferite. Il fungo sopravvive nel suolo sotto forma di pseudosclerozi o come micelio, restando saprofita su residui vegetali. Il micelio si presenta ialino nell'età giovanile e bruno ed olivaceo in età più avanzata, ed è costituito da ife settate binucleate provviste di un restringimento in corrispondenza dei setti. Questi con il passare del tempo dividono il micelio in corti articoli dilatati, disposti in catena od isolati. Il micelio, raddensandosi, va a costituire i cosiddetti pseudosclerozi che si presentano sottoforma di passerelle brunastre, lanose, irregolari e voluminose, misuranti 5-15 mm di diametro e che possono essere isolate o riunite. La forma sessuata compare molto raramente, ed è rappresentata dal basidiomicete *Ceratobasidium* spp., che consiste in basidi piriformi o clavati di 12-18 x 8-11 micron, con basidiospore ellissoidali.

La germinazione degli sclerozi avviene con temperature tra 8 e 30°C ed è stimolata dagli essudati radicali. Il patogeno è diffuso dall'acqua, residui di piante, terreno infetto e mezzi meccanici. I maggiori danni si hanno con temperature elevate (> 21°C) ma il fungo è capace di notevole adattamento termico e quindi di attività di patogenesi anche a temperature più basse. Le condizioni di umidità ottimali non sono facilmente e univocamente individuabili. Essendo ostacolato dalla scarsa ossigenazione, con l'aumento del contenuto idrico del terreno esso sposta tendenzialmente la propria attività verso strati superficiali: in queste condizioni, i marciumi radicali tendono pertanto a diminuire, mentre quelli del colletto aumentano parallelamente al grado di saturazione del terreno.

Altre specie del genere *Rhizoctonia*, ed in particolare *R. solani* AG1 e AG4, sono gli agenti eziologici della necrosi e bruciatura fogliare nel genere *Eucalyptus* (de Silveira *et al.*, 2000) e provocano patologie nel sistema radicale di *Pinus silvestris* (Sen *et al.*, 1999).



**Figura 9.** Sintomi caratteristici della rizottoniosi.

#### *Tecniche colturali per la gestione integrata dei parassiti della fragola*

La fumigazione del suolo e l'uso di pesticidi chimici ad ampio spettro d'azione sono tuttora largamente usati per il controllo di molte patologie della fragola, tra cui il marciume bruno delle radici. Le erbe infestanti causano pesanti perdite nei fragoleti, a causa della forte competizione con la coltura principale e spesso è molto difficile attuare un diserbo meccanico, per cui gli agricoltori si affidano alla fumigazione ed agli erbicidi, con conseguenti problemi di inquinamento ambientale e danni sulla salute umana (LaMondia *et al.*, 2002).

Per questo motivo sarebbe necessario adottare tecniche colturali più razionali ed eco-compatibili, quali la rotazione con specie che, non essendo ospiti per i parassiti della fragola, possono ridurre la popolazione di patogeni e influenzare l'ecologia del suolo e della coltura mediante la competizione e la produzione di

composti secondati biologicamente attivi. Una coltura tradizionalmente utilizzata per la rotazione con la fragola è *Avena sativa*, ma altre due colture molto promettenti sono *Avena strigosa* e *Sorghum bicolor* x *S. sudanense*, che consentono di contenere le infezioni causate da nematodi e di altri agenti patogeni quali *P. penetrans* e *R. fragariae*, soprattutto se già presenti prima di piantare le piante di fragola. Queste colture possono competere con le erbe infestanti e hanno proprietà allelopatiche, in quanto producono essudati radicali tossici per i funghi presenti suolo, quali *Fusarium*, *Gaumannomyces* e *Rhizoctonia*, ma presentano il problema di competere parzialmente anche con le piante di fragole e di ridurre quindi la crescita e la resa (LaMondia *et al.*, 2002).

Altre ricerche hanno dimostrato che il marciume bruno delle radici può essere combattuto anche con la fertilizzazione con solfato di ammonio, in quanto aumenta i livelli citoplasmatici di azoto e manganese (Elmer e LaMondia, 1999). Le colture di copertura o le colture consociate possono inoltre influenzare lo stato nutrizionale del suolo e quindi anche la patologia perché, agendo sulla microflora della pedosfera, permettono alla pianta un più facile assorbimento di alcuni elementi minerali.

#### *Misure per contrastare Rhizoctonia fragariae*

Le misure per contrastare la rizottoniosi prevedono la fumigazione pre-impianto con bromuro di metile o con prodotti meno tossici ma più costosi, quali 1,3 dicloropropene, cloropicrina e dazomet. La disinfezione del terreno effettuata con fungicidi a base di procimidone, iprodione o tiram è risultata anch'essa molto efficace. E' stato notato però che con gli anni, la fumigazione continua causa la distruzione degli organismi benefici del suolo, determinando così l'aggravamento della patologia. Le pratiche agricole che aumentano l'aerazione del suolo ed il drenaggio permettono alle radici uno sviluppo ottimale e possono quindi ridurre i sintomi della patologia. Lo stesso si può dire per la rotazione delle colture: una rotazione di almeno tre anni (e a volte anche cinque) è infatti raccomandata per ridurre sensibilmente il numero di patogeni, ma è possibile anche utilizzare rotazioni di periodo più breve utilizzando specifiche colture. Le cover crops utili al contenimento dei patogeni sono l'avena, la calendula ed il sorgo. L'aggiunta di compost è un'altra alternativa, anche se meno efficace della fumigazione, in quanto

provoca la stimolazione della crescita degli organismi benefici, i quali limitano i patogeni mediante interazioni di competizione e antibiosi, arricchisce la sostanza organica del suolo e ne migliora la struttura e l'aerazione.

Il controllo biologico dei patogeni prevede l'uso di prodotti quali PlantShield, Mycostop e Primastop o, in alternativa, specie di *Trichoderma*, funghi saprofitici molto diffusi in suoli ricchi di sostanza organica, anche se la loro efficacia dipende molto dalle condizioni ambientali. Lo sviluppo di cultivar resistenti mediante programmi di breeding è invece stato molto rallentato perché sono coinvolti nel complesso d'infezione molte specie di patogeni e perché i genotipi resistenti selezionati in un sito spesso non sono efficaci in altri. Ultimamente sono state anche adoperate applicazioni di acido butirrico a concentrazioni di circa 80 mg/10 g sabbia).

## **METODICHE DI INDAGINE MOLECOLARE PER LO STUDIO DELLE INTERAZIONI PIANTA-FUNGO PATOGENO**

### *Obiettivi*

Gli obiettivi principali dell'uso di tecniche molecolari per lo studio dei meccanismi di risposta delle piante all'attacco dei patogeni sono principalmente quattro:

1. Identificare nuovi geni implicati nella patogenesi e determinarne i prodotti e le funzioni;
2. chiarire il ruolo delle caratteristiche biochimiche tipiche della patogenesi;
3. comprendere in che modo è regolata l'espressione dei geni coinvolti;
4. utilizzare tutte le informazioni raccolte per comprendere la complessa serie di eventi che prendono parte nelle interazioni suscettibili e resistenti e comprendere come gli organismi patogeni si sono evoluti e come insorge la malattia.

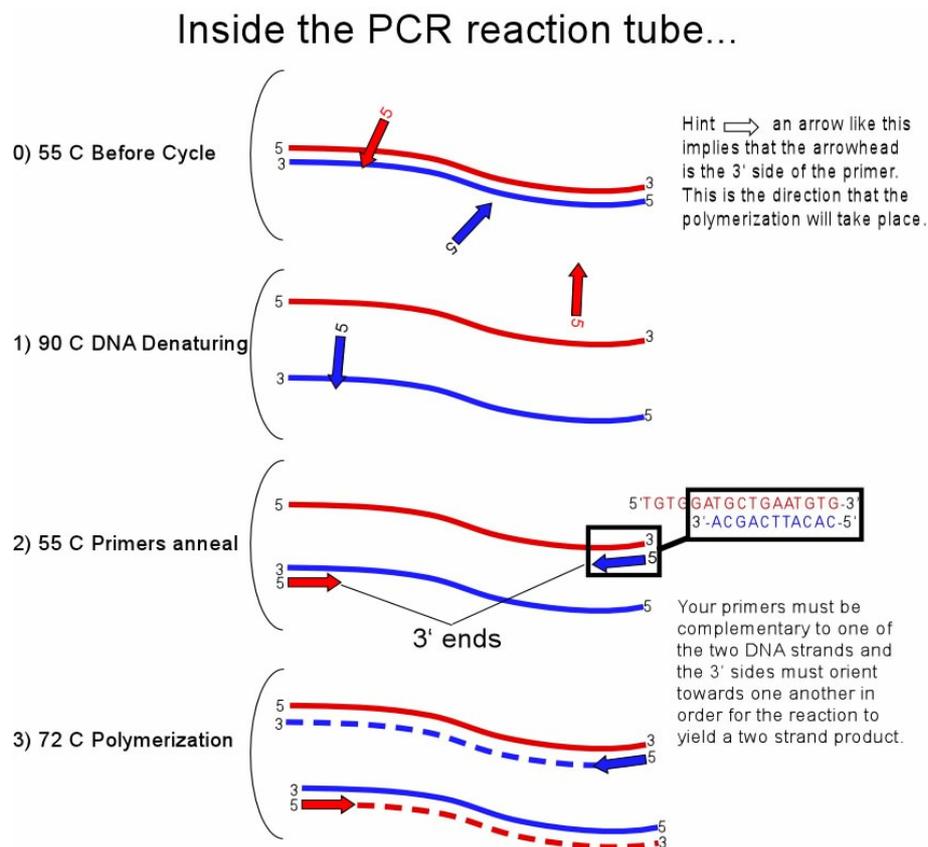
### *Polymerase chain reaction (PCR)*

Poche invenzioni hanno rivoluzionato in maniera così drastica e repentina il corso della biologia molecolare come la PCR, il cui nome è l'abbreviazione di "Polymerase Chain Reaction". Le tecniche basate sulla PCR, nata nella prima metà degli anni Ottanta dalla mente brillante del dottor Kary Mullis, permettono di amplificare milioni di volte un segmento di DNA, mettendo in evidenza variazioni nella sequenza del DNA con estrema specificità e sensibilità. Le tecniche classiche di amplificazione del DNA richiedono l'utilizzo di vettori (plasmidi, virus e cosmidi) per trasferire l'acido nucleico da amplificare in cellule viventi, in cui vengono successivamente clonate. Tutto ciò si traduce in tempi lunghi e costi elevati, mentre la PCR richiede esclusivamente la conoscenza delle sequenze adiacenti al frammento da amplificare e una polimerasi resistente alla temperatura. Attualmente viene impiegata la *Taq* polimerasi, una polimerasi estratta da *Thermus aquaticus*. Mediante sintesi chimica automatizzata vengono prodotti oligonucleotidi, complementari a queste sequenze adiacenti, che vengono utilizzati come innesco (primers) per una serie di reazioni catalizzate dalla DNA polimerasi. Il DNA contenente la sequenza da amplificare viene denaturato al calore (circa 95°C) e quindi fatto ibridare con i primer presenti in eccesso nella miscela di reazione (circa 55°C). Successivamente, viene effettuata con la DNA polimerasi l'estensione della catena a partire dalle terminazioni 3'-OH dei primer (circa 72°C). A questo punto si compie un altro ciclo di denaturazione termica, ibridazione ed estensione degli inneschi (Fig. 10). Questo ciclo viene ripetuto per trenta o più volte, e, poiché la sequenza di DNA compresa tra i due inneschi raddoppia di numero ad ogni ciclo, al termine dei trenta cicli si ottiene un fattore di amplificazione di un miliardo.

Una delle applicazioni più interessanti della PCR è la possibilità di ottenere delle "impronte molecolari" (*molecular fingerprinting*) di un genotipo vegetale, che permettano di distinguerlo da individui strettamente correlati dal punto di vista genetico (tipizzazione). Questo può essere richiesto per almeno tre diversi motivi:

1. per identificare e/o tipizzare un genotipo;
2. per studiare il grado di polimorfismo genetico;
3. per verificarne le variazioni genetiche in diverse condizioni ambientali.

In generale questi metodi possono essere suddivisi in due classi, la prima delle quali comprende quei metodi che prevedono la conoscenza della sequenza di appaiamento dei due primer; la seconda include quelle metodologie che permettono di amplificare uno o più frammenti di DNA anonimi, senza che sia necessaria una previa conoscenza della sequenza bersaglio.



**Figura 10.** Fasi della PCR.

### Librerie di DNA

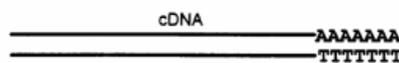
Una libreria di DNA è un pool di cloni che contiene frammenti di DNA ottenuti casualmente da un genoma di un organismo. Le banche di geni consistono di moltissimi cloni singoli. Per assicurare la casualità dei frammenti e rendere le librerie più rappresentative, è bene scegliere un enzima di restrizione in grado di tagliare frequentemente lungo il genoma, quali *Sau3a*, fare una digestione parziale e purificare i frammenti di DNA più lunghi per il clonaggio. Molti sono i tipi di vettori, ma i più utilizzati sono i cosmici e i plasmidi. I cosmidi presentano siti *cos* in modo che il prodotto della legatura può essere impacchettato *in vitro* all'interno

di capsidi del fago  $\lambda$  e poi trasdotti nell'ospite batterico. Il vantaggio delle librerie cosmidiche è che  $\lambda$  può contenere solo DNA estraneo di 48-52 kb e quindi consente di selezionare solo cloni con grandi inserti. Ad esempio, sarebbero necessari circa 1200 cloni cosmidici per rappresentare almeno tre volte tutti i geni di un batterio. Infine, le librerie ottenute con cromosomi batterici artificiali (BAC) possono contenere anche inserti di maggiori dimensioni (> 300 kb).

E' possibile anche creare librerie di cDNA, molto utili perché contenenti il DNA genomico espresso. In questi casi sono molto usati i plasmidi, dal momento che la lunghezza media di un trascritto processato è di 3 Kb (Fig. 11).

### cDNA Library Construction

cDNA is a synthetic DNA molecule with no 'specific' ends to the molecule



How can such molecules be joined (ligated) to vectors for cloning?

[1] If the molecules are accurately blunt or flush ended they can be ligated directly into a restriction site in the vector which produces blunt ends.

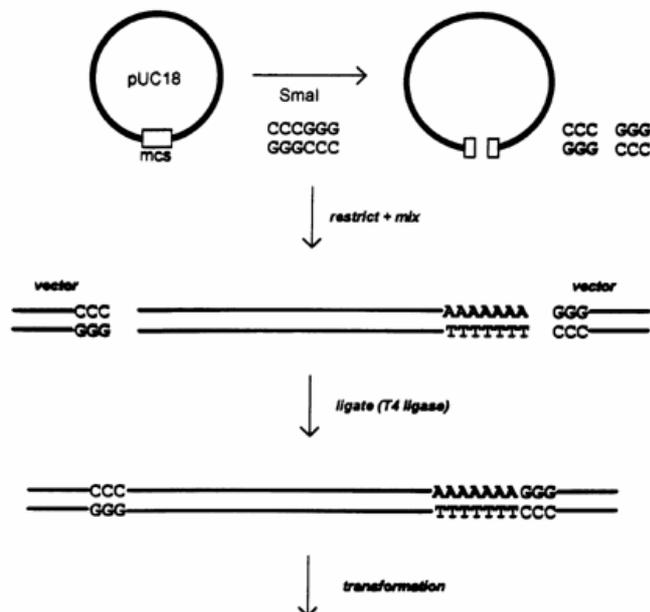


Figura 11. Costruzione di una libreria di cDNA.

### Trasformazione

*Trasformazione indiretta con Agrobacterium* - Il metodo di trasformazione più efficace e più diffuso è quello che utilizza come vettore i batteri del genere

*Agrobacterium tumefaciens* e *rhizogenes*). L'*Agrobacterium tumefaciens* è un batterio fitopatogeno gram-negativo del suolo con capacità di invadere piante suscettibili all'infezione attraverso ferite e determinare la formazione di tumori del colletto in numerose specie vegetali. Durante il processo di infezione, l'*Agrobacterium tumefaciens* trasferisce una porzione del plasmide Ti ("tumor inducing"), denominato T-DNA ("transfer DNA") al nucleo della cellula vegetale integrandolo in maniera stabile nel genoma della pianta. L'integrazione e l'espressione di alcuni geni inclusi in questo frammento (oncogeni) inducono la formazione del tumore nella pianta ospite. L'*Agrobacterium rhizogenes* dispone di un meccanismo di infezione simile, con delle differenze che riguardano gli oncogeni trasferiti; questi provocano, infatti, una sintomatologia diversa dall'*A. tumefaciens* nella pianta infettata, determinando nel punto di infezione una proliferazione di radici avventizie conosciuta come "hair root" in alcune dicotiledoni. Il plasmide specifico di *A. rhizogenes* è detto Ri ("root inducing"), e comprende il frammento di DNA che si trasferisce nel processo di infezione (T-DNA). Generalmente, questi plasmidi (Ti, Ri) sono molto grandi, approssimativamente 100-200 kb dei quali solo 20-23 kb si integrano nel genoma della pianta, apparentemente a caso. Il DNA del plasmide Ti di *Agrobacterium* può essere suddiviso in due regioni: la prima regione, corrispondente al T-DNA, è compresa tra due sequenze ripetute di 24-25 paia di basi che costituiscono gli estremi del T-DNA (RB: right border, LB: left border). Dall'estremità destra inizia il processo di trasferimento, la sua perdita, infatti, inibisce la capacità oncogena che è, invece, attenuata dall'inversione del bordo stesso. Nel bordo sinistro il numero di nucleotidi può variare e questa sequenza sembra portare il solo messaggio di fine trasferimento. La seconda regione del T-DNA comprende varie sub-regioni: a) sequenze geniche codificanti per il metabolismo di opine e citochinine b) sequenze di origine e replicazione del plasmide, e) sequenze con funzioni di coniugazione, d) regione Vir codificante per la virulenza. Le opine sono dei composti, sintetizzati dal tumore del colletto o da quello della radice e utilizzati dal batterio invasore come fonte di carbonio e azoto. In base al tipo di opine che sono sintetizzate dalla pianta trasformata, i plasmidi sono classificati come di tipo octopina o nopalina, identificati rispettivamente come pTiAch5 o pTiC58. Il plasmide Ri induce principalmente la sintesi di agropina.

Nella trasformazione genetica mediata da *Agrobacterium* affinché cellule potenzialmente competenti guadagnino lo stato di competenza si utilizza lo stress meccanico da ferita che provoca una serie di eventi enzimatici che sono alla base dei processi di rigenerazione e proliferazione delle cellule somatiche. Inoltre la ferita provoca la sintesi di composti fenolici che sono importanti nell'interazione pianta-*Agrobacterium*. In considerazione che differenti cellule di una stessa pianta rispondono in maniera diversa allo stress meccanico da ferita, diverse specie rispondono in modo diverso a questo tipo di stress anche in relazione al tessuto utilizzato quale espianto.

Infatti le monocotiledoni, ed in particolare le graminacee, forniscono una risposta biochimica molto rudimentale allo stress meccanico da ferita che potrebbe spiegare il perché queste piante non sembrano interagire con *Agrobacterium*. In base a quanto esposto, la maggioranza delle specie monocotiledoni così come le gimnosperme, sono abbastanza recalcitranti a questo sistema di trasformazione.

*Trasformazione diretta utilizzando protoplasti* - Le cellule prive di parete sono ideali per la trasformazione genetica visto che l'accesso all'interno della cellula è limitato solo dal plasmalemma. Il processo enzimatico di isolamento dei protoplasti a livello cellulare fornisce stimoli simili a quelli della ferita, che si verifica durante il processo di infezione con il batterio. Pertanto, l'eliminazione della parete induce le cellule in stato di potenziale competenza a trasformarsi in competenti per la rigenerazione o trasformazione. Inoltre, poiché si opera con popolazioni cellulari, si aumenta la probabilità che si abbiano degli eventi di trasformazione indipendenti. L'ottenimento di cellule trasformate a partire da protoplasti può essere definita come una tecnica abbastanza semplice, mentre le limitazioni sono legate alle tecniche di rigenerazione *in vitro* a partire da tali espianti difficile per molte specie. Esistono diversi trattamenti fisici e chimici per facilitare l'entrata del DNA nei protoplasti:

1. Trattamento con glicole polietilenico (PEG): questa molecola interagisce con i fosfolipidi della membrana plasmatica rendendola permeabile, facilitando in questo modo l'entrata del DNA esogeno.
2. Elettroporazione: si tratta di un metodo che impiega scariche elettriche di breve durata per creare pori transitori nella membrana plasmatica. Richiede

l'ottimizzazione di due variabili: l'intensità del campo elettrico e la costante del tempo che determina quanto tarda la d.d.p. ad abbassarsi del 37% rispetto al suo valore iniziale.

3. **Sonicazione:** utilizza ultrasuoni per alterare la permeabilità della parete plasmatica facilitando l'entrata degli acidi nucleici sia nei protoplasti che in cellule vegetali con parete.
4. **Trasferimento con liposomi:** il trasferimento del DNA avviene mediante fusione di protoplasti vegetali con liposomi che includono il DNA da trasferire.

*Trasformazione diretta con altri mezzi* – Uno dei più importanti è la microiniezione; questo metodo consiste nell'utilizzazione di un ago avente un diametro sufficiente per il passaggio della molecola di DNA, ma minore del diametro cellulare. E' una tecnica che necessita di un'apparecchiatura sofisticata che introduce il DNA e un numero limitato di cellule.

Ricordiamo anche la trasformazione genetica mediata da vettori fisici (o metodo biobalistico); questa tecnica relativamente semplice consiste nello sparare con appositi apparecchi (particle gun) su tessuti bersaglio. il DNA esogeno che si vuole introdurre o altre particelle biologiche (RNA, virus, batteri). Il DNA viene adeso ad un veicolo solido fisicamente capace di attraversare la parete cellulare. I fori prodotti devono essere sufficientemente piccoli, perché le cellule non subiscano danni irreparabili. Attualmente si utilizzano microparticelle d'oro che si sparano grazie ad un sistema che sfrutta la depressurizzazione brusca di un gas inerte compresso che generalmente è l'elio.

### *Marcatori molecolari*

I marcatori molecolari, a differenza di quelli morfologici e biochimici, permettono una chiara lettura del genoma e dell'informazione genetica che contiene. Essi infatti non sono influenzati dall'ambiente, sono capaci di mostrare un elevato grado di polimorfismo, non presentano effetti di epistasia e pleiotropia e hanno, ad eccezione dei RAPD, un'espressione codominante, permettono cioè di distinguere l'omozigote dominante dall'eterozigote. L'efficacia dei marcatori molecolari nel miglioramento genetico è garantita dall'associazione fra il marcatore e il gene di

interesse, di cui in tal modo è possibile seguirne la segregazione semplicemente testando la presenza del marcatore associato. Per lo studio della variabilità fenotipica pertanto oggi si fa ricorso principalmente agli RFLP, ai RAPD, agli AFLP e ai microsatelliti.

*RFLP* - Gli RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”) sono i marcatori molecolari più usati. Tali marcatori sfruttano la capacità delle endonucleasi di tagliare il DNA in particolari punti chiamati siti di restrizione. L'analisi degli RFLP si basa sui polimorfismi dei frammenti generati dal taglio, a loro volta dovuti a differenze di peso molecolare. Poiché per ogni tipo di DNA esistono siti di restrizione diversi, i frammenti che si ottengono saranno altrettanto differenti tra i genomi che si confrontano. La tecnica RFLP prevede inoltre che i frammenti siano dapprima separati su gel di acrilammide o agarosio, poi trasferiti (blotting) su una membrana di nylon e qui ibridati con sonde specifiche. Le sonde sono sequenze di DNA marcate in diverso modo, che poste a contatto con la membrana si legano a sequenze loro complementari. Per la visualizzazione delle bande ibridate, la membrana viene posta a contatto con una lastra autoradiografica.

*RAPD* - La tecnica RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) si basa sull'amplificazione di segmenti “random” del DNA impiegando un solo primer, abbastanza corto (5-15 mer), con una sequenza nucleotidica arbitraria. L'amplificazione è resa possibile dal fatto che la reazione viene effettuata ad una temperatura di appaiamento del primer molto bassa; in tal modo le molecole del primer possono appaiarsi anche a sequenze di DNA non esattamente complementari alla propria e perciò potranno innescare la reazione di polimerizzazione della polimerasi in più punti del genoma bersaglio. In questo modo alla fine della reazione di amplificazione si otterrà non un singolo frammento amplificato, ma una serie di frammenti il cui numero e la cui lunghezza varierà da specie a specie e/o da ceppo a ceppo. Il grado di differenziazione che si può ottenere con questa tecnica è fortemente influenzato dal tipo di primer impiegato nella reazione.

Uno dei maggiori problemi legati all'impiego di questa tecnica è il basso grado di stabilità del pattern ottenuto, in quanto le bande che si ottengono sono scarsamente riproducibili. Per queste ragioni occorre standardizzare le condizioni di

reazione e la riproducibilità dell'esperimento. D'altro canto, la tecnica RAPD è uno dei più rapidi strumenti per la tipizzazione dei genotipi.

*AFLP* - La tecnica AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphisms") si estrinseca attraverso tre fasi principali. La prima prevede la digestione del DNA con specifici enzimi di restrizione, quindi dal legame degli adattori alle estremità dei frammenti di DNA si originano i campioni da amplificare. La seconda consiste nell'amplificazione dei frammenti prima ottenuti con l'uso di primer complementari agli adattatori, rispetto ai quali portano da uno a tre nucleotidi selettivi in posizione 3'. Nella terza fase i frammenti sono separati su gel, previa marcatura radioattiva, ed evidenziati mediante esposizione, in presenza di una lastra autoradiografica.

*Microsatelliti* - Un altro tipo di approccio, basato sempre sulla tecnica PCR, consiste nell'amplificazione di alcuni frammenti, impiegando oligonucleotidi specifici per semplici sequenze ripetute di DNA, sequenze note come "microsatelliti". I primer (GTC)<sub>5</sub>, (GAC)<sub>5</sub>, (GACA)<sub>4</sub> sono stati ampiamente usati per l'identificazione e la caratterizzazione dei lieviti. Questa tecnica è più riproducibile in confronto ai metodi RAPD, in conseguenza della più alta temperatura di annealing, 55°C invece di 37°C. I microsatelliti o SSR ("Simple Sequence Repeats") sono sequenze ripetitive di DNA, formate da piccole unità (di solito inferiori a 10 bp), disperse nel genoma. Queste sequenze ripetitive sono una delle maggiori componenti del DNA degli organismi superiori; i microsatelliti mostrano un alto grado di polimorfismo tra individui appartenenti alla stessa specie.

Il genoma di *Fragaria vesca* è stato parzialmente mappato nel 1997 (Davis e Yu, 1997) utilizzando marcatori RAPD, per i quali risulta facile la individuazione dei dominanti (presenza-assenza di bande) e dei codominanti (presenza di una banda eteroduplex). È stato trovato che la mappa contiene 80 marcatori distribuiti su sette gruppi di associazione (tante sono le coppie di cromosomi omologhi). Le analisi sono state effettuate attraverso i test "parent-parent" e "parent-progeny", che differiscono per il tipo di DNA usato nella mix di reazione della PCR: nel primo caso si utilizza il DNA proveniente dai parentali (1:1), nel secondo, pur mantenendo lo stesso rapporto 1:1, si utilizza il DNA di uno dei parentali e quello di un individuo F2. Il test parent-progeny è risultato efficace nell'individuazione dei

marcatori codominanti, laddove le bande, a causa di una simile mobilità nella corsa elettroforetica, risultavano poco differenziate (Martelli *et al.*, 1999).

### Clonaggio

Per clonare un gene è necessario utilizzare dei vettori solitamente plasmidici che veicolano il DNA estraneo all'interno delle cellule competenti. Tra i geni maggiormente studiati ricordiamo gli enzimi coinvolti nella biosintesi delle glicoproteine ricche di idrossiprolina, quelli delle vie metaboliche, che portano alla sintesi delle fitoalessine, e quelli coinvolti nella sintesi dei  $\beta$ -glucani e delle proteine PR (Molinari, 2003).

I plasmidi sono molecole di DNA circolare in grado di auto-replicarsi in cellule batteriche o eucariotiche e contengono un marcatore selezionabile (ad esempio una resistenza ad un antibiotico) ed siti unici di siti di sequenze riconosciute da enzimi di restrizione (polylinker) per l'inserzione di DNA estraneo. I plasmidi, inoltre, sono di piccole dimensioni per aumentare la frequenza di trasformazione. Gli enzimi di restrizione digeriscono il DNA estraneo e del vettore, creando estremità sfalsate in grado di appaiarsi spontaneamente; in seguito, la DNA ligasi catalizza la formazione di legami covalenti e forma un plasmide ricombinante. Il plasmide ricombinante è quindi introdotto in una cellula ospite mediante il processo di trasformazione, si replica nella cellula ospite e viene ereditato dalla progenie. I trasformanti sono selezionati sfruttando la antibiotico-resistenza codificata dal vettore plasmidico. Per accertarsi di avere il clone che contiene il frammento di DNA estraneo di interesse è possibile utilizzare l'analisi di restrizione, la PCR o il sequenziamento fisico dell'inserito; oppure è possibile saggiare biochimicamente il prodotto genico desiderato o vagliare la capacità del clone di complementare un mutante corrispondente e di ripristinarne il fenotipo originale.

Molti vettori presentano caratteristiche che li rendono molto utili, quali la capacità di essere mobilizzati in altri batteri mediante coniugazione e la presenza di siti primer speciali per il sequenziamento dell'inserito di DNA. I plasmidi con delle regioni promotore a monte del DNA clonato sono chiamati vettori di espressione e sono utilizzati per sintetizzare i prodotti genici desiderati, permettendo di identificare prodotti che potrebbero solo essere espressi *in planta*. I vettori

promotore-sonda contengono un gene reporter senza promotore; se l'inserito di DNA contiene un promotore orientato correttamente, il prodotto del gene reporter sarà sintetizzato. I vettori promotore-sonda sono molto utili per studiare l'espressione dei geni codificanti PR sia *in vitro* che *in planta*.

### *Mutagenesi*

*Mutagenesi mediante trasposoni* - I trasposoni sono elementi di DNA in grado di muoversi o trasferirsi da una posizione ad un'altra nel genoma. Essi codificano enzimi che li rendono capaci di trasporre e spesso sono portatori di altri geni vantaggiosi, quali la resistenza agli antibiotici. Alcuni trasposoni si inseriscono quasi casualmente in un genoma batterico e nei plasmidi. Quando i trasposoni si inseriscono all'interno di una sequenza genica, essi distruggono il gene stesso e di conseguenza il prodotto proteico è troncato oppure non è sintetizzato. I trasposoni contengono terminatori trascrizionali e causano mutazioni polari che impediscono l'espressione dei geni a valle nello stesso operone.

L'inserzione di un trasposone determina una mutazione ampia e facilmente individuabile che può essere mappata geneticamente o clonata, mediante l'uso di marcatori di resistenza ai farmaci, e può essere mappata fisicamente con enzimi di restrizione. I mutanti trasposonici sono quindi utili per correlare mappe genetiche e fisiche e quindi per localizzare geni sulla mappa di restrizione. I trasposoni Tn5, Tn10 e Tn3 sono i più utilizzati perché si inseriscono abbastanza casualmente: quasi tutti i geni possono essere dei bersagli, ma non esistono "hot spots" per l'inserzione dei trasposoni.

I trasposoni sono veicolati nei batteri utilizzando vettori "suicidi" che non possono replicarsi nel batterio da mutagenizzare. Questi possono essere sia plasmidi difettivi nella replicazione che fagi. La selezione è effettuata mediante marcatori di resistenza ai farmaci presenti sul trasposone. Poiché il vettore non può replicarsi dopo l'ingresso nella cellula, l'unico modo per ottenere colonie resistenti è il salto del trasposone ("transposon hop") in un cromosoma o in un plasmide residente. I trasposoni possono essere introdotti in un microrganismo "wild type" per creare una banca di mutanti che possono essere esaminati per un dato fenotipo, quali la perdita di patogenicità o di ipersensibilità su una pianta ospite. Il DNA clonato può essere mutagenizzato con un trasposone, mappato in *E. coli* e successivamente restituito

all'ospite di origine. Infine, i trasposoni specializzati possono creare fusioni tra geni reporter per lo studio della regolazione genica o introdurre promotori costitutivi, e alcuni trasposoni possono essere usati per sequenziare geni e mappare mutazioni mediante il sequenziamento (Tn5seq, Tn1000).

*Altri metodi per creare mutanti* - Per facilitare lo studio delle interazioni pianta-patogeno, è possibile ottenere organismi mutanti mediante l'uso di sostanze chimiche e radiazioni UV, che causano mutazioni difficili da mappare, o la mutagenesi sito-specifica, usando la PCR per creare variazioni a livello di singola base oppure siti di restrizione adatti per inserire "cassette" al centro dei geni per mezzo della legatura. Quest'ultimo è un buon modo per creare mutazioni non polari i geni precedentemente clonati e sequenziali.

#### *Individuazione dei cloni*

Nel caso in cui il prodotto genico di interesse è noto, è possibile localizzare il clone mediante ibridazione utilizzando come sonde geni clonati da batteri correlati. Se il gene è stato sequenziato in altri batteri, si può costruire una sonda oligonucleotidica ridondante per regioni conservate. Se è nota la sequenza nell'organismo di interesse o in uno strettamente imparentato, è possibile costruire primer per amplificare il gene mediante PCR. Poiché la DNA polimerasi è soggetta ad errore, è necessario usare una polimerasi con in grado di correggere le bozze ("proof-reading") e sperare di verificare la funzione con una prova di complementazione. Dopo aver complementato una mutazione nota in un batterio correlato, è possibile trovare il clone che ripristina la funzione, isolare la proteina e determinarne la sequenza aminoacidica N-terminale, sintetizzare un oligonucleotide ridondante per usarlo come sonda di ibridazione e, se si hanno anticorpi per la proteina clonata e i geni sono stati clonati in un vettore di espressione, sottoporre le colonie a Western blotting per verificare l'espressione della proteina.

Se il prodotto genico non è noto, vi sono molti modi per cercare il clone giusto. Prima di tutto è possibile cercare la complementazione di un mutante usando pool di colonie, isolare cloni da un ceppo complementare oppure controllare di nuovo le singole colonie dal pool. Questa tecnica funziona per i mutanti per

patogenicità. Nel caso di mutanti indotti con Tn5, è possibile clonare frammenti che contengono Tn5 e DNA adiacente creando librerie dal mutante e trasformando l'ospite ricevente per Tn5; successivamente si può verificare di avere il giusto frammento usando i frammenti di DNA adiacenti all'inserzione di Tn5 come sonde di ibridazione per localizzare il clone corrispondente in una libreria di DNA wild-type. Altre tecniche per l'identificazione di geni a prodotti non noti prevedono il sequenziamento delle regioni adiacenti a geni codificanti PR conosciuti e la ricerca di una regolazione genica opportuna. Per quest'ultimo caso, si può procedere inserendo il clone DNA in un vettore promotore-sonda, come ad esempio un plasmide con un gene reporter privo di promotore a valle del sito di clonaggio, e poi osservare l'eventuale attivazione di un regolatore noto, come il fattore sigma HrpL; oppure ancora si può utilizzare la tecnica *IVET* ("In Vivo Expression Technology"), sviluppata per modelli animali, in cui si clona il DNA in un vettore promotore-sonda che crea una fusione *cat-lacZ*, si inocula l'animale con una cultura mutagenizzata e si tratta l'animale con cloramfenicolo, si isola nuovamente il batterio e poi si visualizzano le colonie su una piastra per verificare la debole espressione di Lac, permettendo così di individuare i promotori espressi solo nell'ospite.

#### *Individuazione del gene di interesse e del suo prodotto*

Una volta ottenuto il clone, è possibile trovare il gene sequenziando e creando mutanti, e localizzare i geni cercando i più piccoli subcloni funzionali da una sequenza più grande di DNA e usando i prodotti per complementare un mutante. I subcloni o gli interi cosmici sono saturi di mutazioni Tn e analizzati per la perdita di funzione in test di complementazione con mutanti per delezioni cromosomica o che presentano un Tn cromosomico.

Una tecnica molto elegante è lo scambio di marcatore o omogenotizzazione ("marker-exchange"), usata per creare nuovi mutanti mediante mutagenesi sito-specifica del DNA clonato: le mutazioni sono trasferite all'interno del cromosoma mediante ricombinazione reciproca. Questa tecnica è utile per analizzare i fenotipi o le mutazioni in singola copia o per determinare i fenotipi di geni non noti.

Per trovare correlazioni tra un gene conosciuto ed il suo prodotto, come una tossina o un enzima, e la patogenicità è necessario accertarsi sempre di:

1. ottenere cloni (in *E. coli*) che complementano con mutanti avirulenti;
2. mutare i cloni in modo che non complimentino più con mutanti avirulenti;
3. creare mutanti cromosomici mediante “marker-exchange” e test di patogenicità, verificando il processo con un Southern blot;
4. complementare i mutanti “marker-exchange” con i cloni wild-type originali;
5. provare che il fenotipo non sia dovuto a mutazioni non identificate in altri siti.

### *Studio della regolazione dei geni coinvolti nella patogenesi*

Gli organismi patogeni regolano in maniera molto precisa i geni codificanti PR. Nel caso di fattori di virulenza, essi possono innescare risposte di resistenza nell'ospite non desiderate se schierate troppo presto. I patogeni quindi cercano di esprimere i geni codificanti PR solo al momento giusto e si affidano ad una gerarchia di segnali esterni ed interni per controllare la regolazione genica. La maggior parte della specificità delle interazioni pianta-patogeno si fondano su questo scambio di segnali.

Per misurare l'espressione genica si utilizzano tecniche quali il Western blot per misurare la produzione specifica di proteine, il Northern blot o la RT-PCR per individuare specifici mRNA e i geni reporter. In questo caso, si fonde il promotore di interesse ad una ORF di un gene il cui prodotto è facilmente misurabile *in vitro* o *in planta*. L'espressione di un gene reporter, come la  $\beta$ -galattosidasi, è utilizzata come una facile misura dell'attività del gene bersaglio. Ciò è importante quando il prodotto genico è sconosciuto e difficile da quantificare. La stessa analisi può essere effettuata usando trasposoni o vettori promotore-sonda. Sono stati costruiti speciali trasposoni per creare fusioni geniche trascrizionali e tradizionali tra il promotore del gene bersaglio e un gene reporter. Il gene reporter senza promotore è situato proprio all'interno della sequenza invertita di una estremità del trasposone. Se il trasposone è inserito nel gene nel giusto orientamento, allora la trascrizione dal promotore dei geni bersaglio procede nel gene reporter. I geni reporter più comuni sono la  $\beta$ -galattosidasi di *lacZ*, misurabile facilmente con un saggio colorimetrico, ma funzionante solo nel citoplasma; *uidA*  $\beta$ -glucosidasi (GUS), con un substrato molto più costoso, ma misurabile *in planta*; *phoA* (fosfatasi alcalina batterica), che

funziona solo nella membrana, nel periplasma o all'esterno della cellula ed è utile per proteine di secrezione; GFP (green fluorescent protein dalle meduse), visualizzabile con luce UV per mezzo di un microscopia ad epifluorescenza, a microscopia laser confocale e a fluorimetria; lux (luciferasi da *Vibrio*), misurabile mediante luminometria e autoradiografia perché le colonie sono luminose al buio; *ina* (ice nucleation gene), la cui espressione può essere misurata nei batteri per mezzo di una prova di congelamento ed è utile per le prove *in planta*.

#### *Analisi dell'espressione genica*

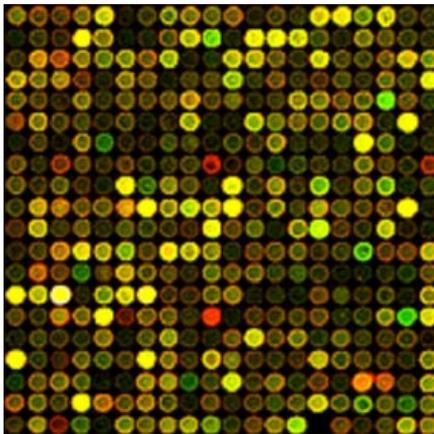
*Nucleasi S1* - Per questa tecnica occorrono mRNA isolati da cellule differenziate ed è necessario conoscere la sequenza nucleotidica dell'estremità 5' del gene. Quest'ultimo viene isolato da una libreria di cDNA e ibridato con uno degli mRNA. Grazie all'attività enzimatica della RNAasi si realizza l'eliminazione delle regioni di DNA ed RNA a singolo filamento, in modo da lasciare intatta la porzione del filamento di DNA che forma l'ibrido con l'estremità 5' dell'mRNA. La lunghezza dell'ibrido corrisponde alla distanza che intercorre tra il punto di inizio della trascrizione e il sito di restrizione (Moyano, 1998).

*Ibridazione in situ* - La metodica si estrinseca attraverso varie fasi, la prima delle quali è la denaturazione del DNA in una soluzione alcalina su un vetrino dove viene aggiunto il DNA marcato (sonda). In condizioni idonee alla rinaturazione, il DNA sonda si lega alla porzione complementare e, mediante l'autoradiografia, è possibile visualizzare la regione ibridata, che appare come una macchia scura. Per evitare i lunghi tempi di esposizione e la bassa risoluzione, è stata sperimentata una variante al metodo classico nota come FISH (ibridazione *in situ* in fluorescenza). La FISH consiste nell'uso di nucleotidi marcati con fluorocromi, per cui l'ibrido è chiaramente visibile ad un microscopio per fluorescenza.

*Northern blotting* - Questa tecnica prevede: la separazione dell'RNA su gel mediante corsa elettroforetica; il blotting su membrana di nitrocellulosa o nylon (migrazione delle bande dal gel alla membrana), dove le bande conservano fedelmente la posizione originaria; l'ibridazione con sonde marcate

radioattivamente. La visualizzazione delle bande ibridate è resa possibile mediante esposizione a lastra autoradiografica.

*Microarray* - E' una tecnica che permette l'analisi di espressione di migliaia di geni in maniera simultanea e in un singolo esperimento. L'analisi viene solitamente effettuata facendo ibridare una sonda fluorescente, preparata dall'RNA del campione, al DNA che è stato immobilizzato su un supporto solido di silicio (chip a DNA) (Fig. 12). Il DNA di supporto può essere cDNA, DNA genomico e oligonucleotidi. Il metodo più comune per preparare una sonda consiste nell'incorporare il colorante fluorescente durante la sintesi di reazione del primo filamento di cDNA. Una volta preparata, la sonda viene fatta ibridare all'array secondo una procedura del tutto simile a quella standard per il Northern. L'array viene analizzato con un apposito scanner, un'apparecchiatura capace di eccitare i fluorocromi, e di misurare la luce da loro emessa. Viene così determinata l'intensità relativa dei due colori luminosi per ogni spot, che è proporzionale alla quantità dello specifico trascritto.



**Figura 12.** Ingrandimento di un chip a DNA.

*cDNA-AFLP* - Il protocollo utilizzato per questo tipo di analisi prevede: a) estrazione di RNA, b) sintesi di cDNA a partire da un oligo(dT) primer per il primo filamento; c) la digestione dei cDNA con enzimi di restrizione; d) il legame degli adattatori alle estremità dei frammenti di restrizione; e) la preamplificazione con primer complementari agli adattatori; f) l'amplificazione con primer selettivi (allungati di una o più basi selettive), uno dei quali viene marcato radioattivamente; g) la separazione dei frammenti su gel di poliacrilammide e autoradiografia. L'amplificazione selettiva rispetto alla preamplificazione viene condotta in

condizioni di temperatura di annealing e di numero di cicli più basso (Bachem *et al.*, 1996). Altri parametri entrano in gioco nella procedura, fra cui la concentrazione del cloruro di magnesio durante la sintesi del cDNA, nonché gli effetti del numero di cicli di amplificazione sui frammenti di restrizione.

*Differential display* - Il principale vantaggio di questa tecnica consiste nella rapidità e relativa semplicità di analisi ed è utilizzata negli studi di mRNA differenzialmente espressi estratti da tessuti diversi o da tessuti simili, ma a diverso stadio fisiologico (Roux *et al.*, 1998). D'altro canto il differential display presenta un grosso limite che è quello dei falsi positivi. Per eliminare o quanto meno contenere il problema esistono delle modifiche rispetto al metodo classico, fra cui l'aggiunta di dieci basi all'estremità 5' dei primer e temperature di annealing fino a 60°C oppure l'uso di due diverse trascrittasi inverse. La procedura si articola nelle seguenti tappe: a) estrazione di RNA, b) sintesi del cDNA con la trascrittasi inversa, c) amplificazione del cDNA mediante PCR con random primers, d) corsa elettroforetica dei prodotti di amplificazione, e) isolamento dei frammenti dal gel, f) amplificazione e sequenziamento dei frammenti estratti.

*Sequenziamento di EST* - Il termine EST sta per "expressed sequence tags", si tratta di cloni di cDNA corrispondenti a specifici mRNA, che si ottengono sequenziando l'inserito di cDNA, per mezzo di un primer basato sulla sequenza del vettore. Il sequenziamento è un potente strumento di analisi reso possibile dai moderni mezzi tecnologici, che consente non solo di stimare il livello di espressione genica, ma anche la scoperta di nuovi geni. I cloni di cDNA, prima di essere sequenziati, devono essere clonati in opportuni vettori capaci di amplificarli. Una delle tecniche di sequenziamento, sviluppata da Sanger, si basa sull'uso di dideossinucleotidi. Il dideossinucleotide è molecola artificiale priva di un gruppo ossidrilico sugli atomi di carbonio 2' e 3'. Per il sequenziamento vero e proprio si prepara una reazione contenente il DNA da sequenziare, la DNA polimerasi e i dideossinucleotidi. Praticamente vengono preparate diverse reazioni di amplificazione, ciascuna contenente uno solo dei quattro tipi di dideossinucleotidi, che si incorporano nel DNA in maniera casuale, così da formare frammenti di lunghezza differente. Successivamente i frammenti vengono separati su gel. Attraverso la marcatura con il radioattivo e la successiva rilevazione con l'ausilio di una lastra autoradiografica è

possibile ricavare le sequenze attraverso la lettura che procedeva dal basso verso l'alto. Il metodo più diffuso attualmente è tuttavia il sequenziamento automatico, che prevede l'uso di nucleotidi colorati (diversi fluorocromi), piuttosto che di sostanze radioattive. Esistono quindi degli appositi programmi, che permettono di trasformare le informazioni visive, in termini di intensità ottica, in informazioni genetiche: il computer permette di ottenere direttamente la sequenza dal gel, senza la necessità di un operatore che la interpreti.

## **SCHEMA SPERIMENTALE E METODOLOGIE ADOTTATE PER LO STUDIO DELL'INTERAZIONE *Fragaria vesca*-*Rhizoctonia fragariae***

### *Materiale vegetale e disegno sperimentale*

Sono stati utilizzati quattro genotipi di *Fragaria vesca*: due resistenti a stress biotici e due suscettibili. Le piantine, 50 per ogni genotipo, sono state allevate per due mesi e poi divise sulla base del vigore e della dimensione dell'apparato fogliare in 9 gruppi da 5 piante ciascuno. Di queste ultime, 25 sono state inoculate e 20 utilizzate come controllo (non inoculate).

L'inoculo del patogeno è stato effettuato cospargendo l'apparato radicale delle piantine, trattato con sabbia di Diatomee, con una miscela omogenea di micelio in polvere di talco. Il micelio del fungo è stato fatto sviluppare in piastra utilizzando PDA ("Potato Dextrose Agar") come substrato. Il campionamento delle piante è stato effettuato in cinque date, a partire da 15 giorni fino a 75 giorni dopo l'inoculazione. Per ogni pianta esaminata sono stati prelevati separatamente l'apparato radicale, il colletto e le foglie. I tessuti sono stati posti in azoto liquido e conservati a -80°C.

### *Analisi del trascrittoma e differential display*

In seguito è stato estratto il DNA genomico dal fungo e dalla pianta e l'RNA totale dalla pianta mediante il metodo descritto da Molinari (2003). La conferma dell'avvenuta estrazione è stata ottenuta mediante corsa elettroforetica in gel d'agarosio all'1,2%, utilizzando come tampone di corsa TBE concentrato allo 0,5%,

voltaggio pari a 80V ed etidio bromuro (1  $\mu$ L per 100 g di gel). La concentrazione dell'RNA estratto è stata valutata mediante lettura spettrofotometrica, previa una prima diluizione 1:50 con acqua distillata in un volume finale di 100  $\mu$ L e una successiva diluizione 1:20 sempre in acqua distillata. Questo ha permesso di prelevare volumi maggiori, contenenti l'aliquota di 1,8 ng di RNA richiesta per la buona riuscita delle procedure successive.

Il cDNA è il DNA ottenuto a partire da una frazione dell'RNA totale estratto (mRNA) (Fig. 13). Quest'ultimo funge da stampo e quindi il cDNA è complementare ad esso. Il vantaggio del cDNA è che consente di lavorare soltanto con la frazione di DNA genomico effettivamente trascritto. La sintesi di cDNA richiede i seguenti reagenti: oligo dT, RT buffer, inibitore di ribonucleasi (per evitare la degradazione del DNA), trascrittasi inversa, cDNA buffer (350 mM Tris HCl, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30 mM DTT), DNA polimerasi, ribonucleasi H, mix di dNTP (10 mM). I singoli passaggi della sintesi del cDNA sono riassunti in dettaglio nella figura X. La ribonucleasi H ha l'importante compito di degradare parzialmente il filamento di RNA dell'ibrido RNA/cDNA e di fornire in questo modo i punti di innesco per la DNA polimerasi I, che sintetizza l'altro filamento di cDNA e degrada l'RNA restante appaiato al cDNA. La mix di reazione è stata lasciata a 16°C per 2 h, tempo necessario per fare avvenire tutte le reazioni, e in seguito i campioni sono stati conservati a -20°C.

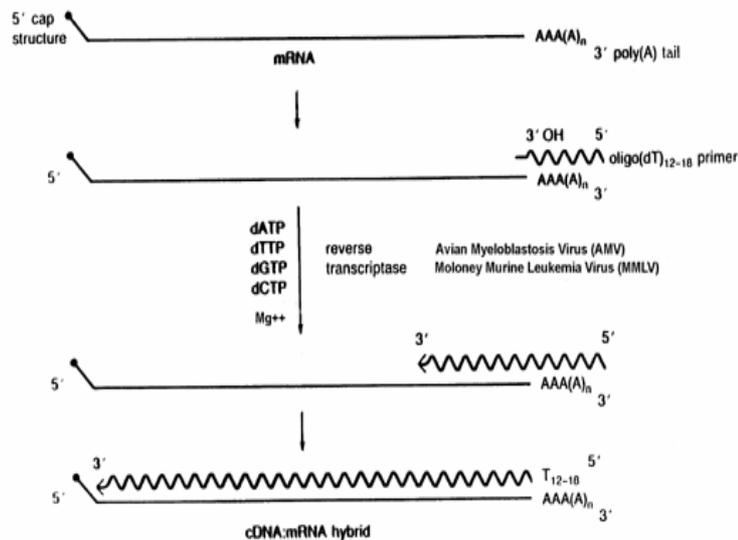
L'amplificazione delle sequenze di cDNA così ottenute è stata effettuata mediante PCR (con un termocicizzatore *iCycler* Biorad), seguendo le seguenti fasi:

1. 95°C per 7' (denaturazione iniziale)
2. 94°C per 1' (denaturazione)
3. 52°C per 1' (annealing)
4. 72°C per 1' (allungamento)
5. 72°C per 10' (allungamento finale)
6. 4°C (conservazione)

I punti 2, 3 e 4 costituiscono un intero ciclo, che è stato ripetuto per circa 40 volte durante una singola amplificazione. Per evitare inconvenienti legati all'appaiamento dei primer a regioni non perfettamente complementari (falsi positivi), sono state effettuate numerose prove finalizzate all'ottimizzazione delle

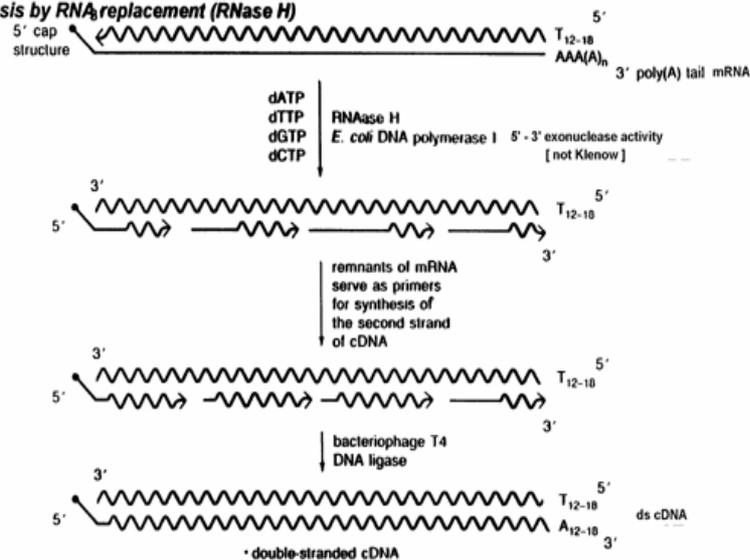
procedure sperimentali. Sono stati utilizzati in un primo tempo primer random di diversa lunghezza ed in seguito primer relativi a specifiche vie biosintetiche, effettuando una ricerca in banche dati sulle sequenze note relative alla resistenza ai patogeni e allineandole tra loro mediante il software bioinformatico *Bioedit*, al fine di trovare le regioni maggiormente conservate nelle diverse specie vegetali e di costruire così i primer adatti.

**Traditional cDNA synthesis**



Synthesis of the first strand of cDNA using an oligo(dT) primer and reverse transcriptase.

**cDNA synthesis by RNA<sub>1</sub> replacement (RNase H)**



Replacement synthesis of double-stranded cDNA.

**Figure 13.** Sintesi di cDNA mediante l'utilizzo di ribonucleasi H.

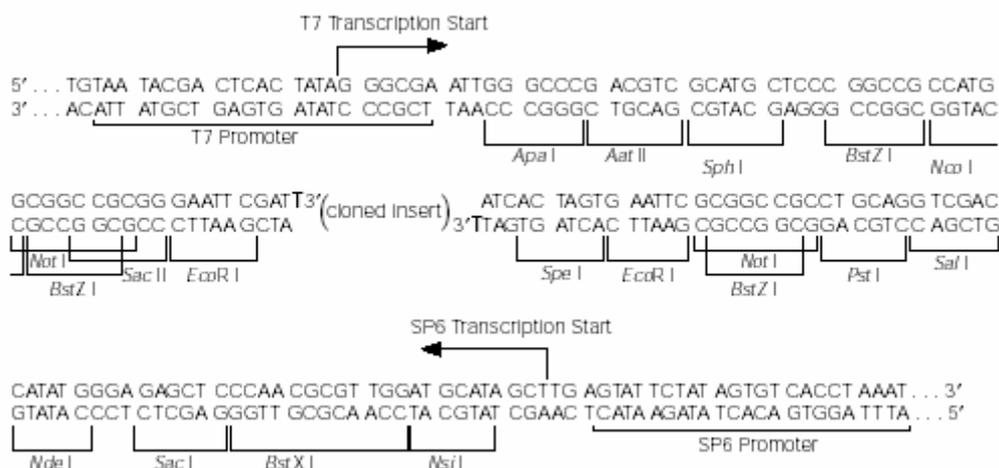
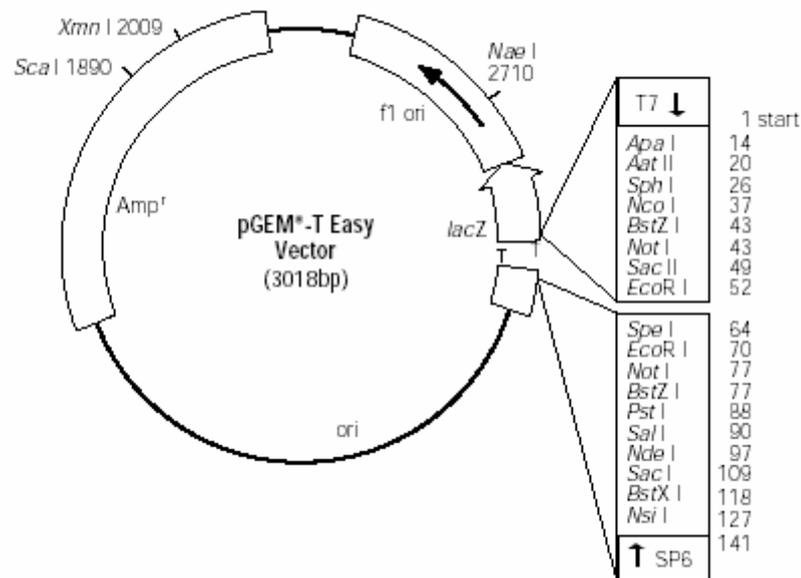
I prodotti della PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1,2%, utilizzando tampone TBE e un voltaggio di 80 V per circa 3 h (Fig. 15). L'etidio bromuro, utilizzato per visualizzare le bande di acidi nucleici, è stato incorporato nel gel per avere la possibilità di interrompere la corsa in un determinato momento e poi poterla eventualmente riavviarla in caso di necessità.

Le bande più nette sono state estratte dal gel manualmente mediante un bisturi ed i campioni sono stati posti in eppendorf da 1,5 mL. E' molto importante non recuperare campioni del gel contenenti frammenti di DNA maggiori di 5 Kb per non diminuire la resa. Particolare attenzione va anche posta al grado di purezza del gel e la quantità iniziale di cDNA caricata sul gel. Per l'eluizione è stato usato il kit *Quantum Prep Freeze 'N Sequence DNA Gel Extraction Spin Columns* (Biorad). Le bande sono state estratte dal gel, poste a -20°C per 5' e centrifugate a 13000 rpm per 15' a 4°C, ottenendo così la separazione del cDNA dall'agarosio. Alla soluzione di cDNA è stato aggiunto 1/10 del volume totale di 3M sodio acetato, pH 5,7, e 3 volumi di etanolo assoluto. Il tutto è stato posto a -20°C per 12 h e , dopo aver centrifugato a 13000 rpm per 15' a 4°C, il surnatante è stato allontanato dal pellet. Si è proceduto poi ad un secondo lavaggio in etanolo al 75%, il quale è stato in seguito allontanato per evaporazione (a 4°C per 3 h), e all'aggiunta di 12 µL di acqua sterile. Alla fine dell'eluizione, le bande sono state conservate a -20°C.

I frammenti provenienti dall'eluizione sono stati clonati utilizzando il vettore plasmidico *pGEM®-T Easy Vector* (Promega) di circa 3000 pb (Fig. 14). Il protocollo utilizzato ha previsto i seguenti passaggi:

1. Preparare la reazione di ligation (5 µL 2x ligation buffer, 1 µL pGEM®-T Easy Vector, x µL prodotto PCR, 1 µL T4 DNA ligasi, portare a 10 µL con acqua sterile).
2. Miscelare la reazione mediante pipettaggio. Incubare per 1 h a temperatura ambiente.
3. Aggiungere 50 µL di cellule competenti (JM 109) a 2 µL della miscela di reazione della ligasi.
4. Lasciare la mix in ghiaccio per 20'.
5. Provocare uno shock termico per 50'' a 42°C.
6. Immergere i tubi in ghiaccio per 2'.
7. Aggiungere 950 µL di SOC medium.

8. Incubare i tubi per 1,5 h a 37°C con agitazione di 150 rpm.
9. Piastrare 100 µL della soluzione su piastre LB/ampicillina/IPTG/X-Gal preparate precedentemente.
10. Incubare le piastre per 16-24 h a 37°C.

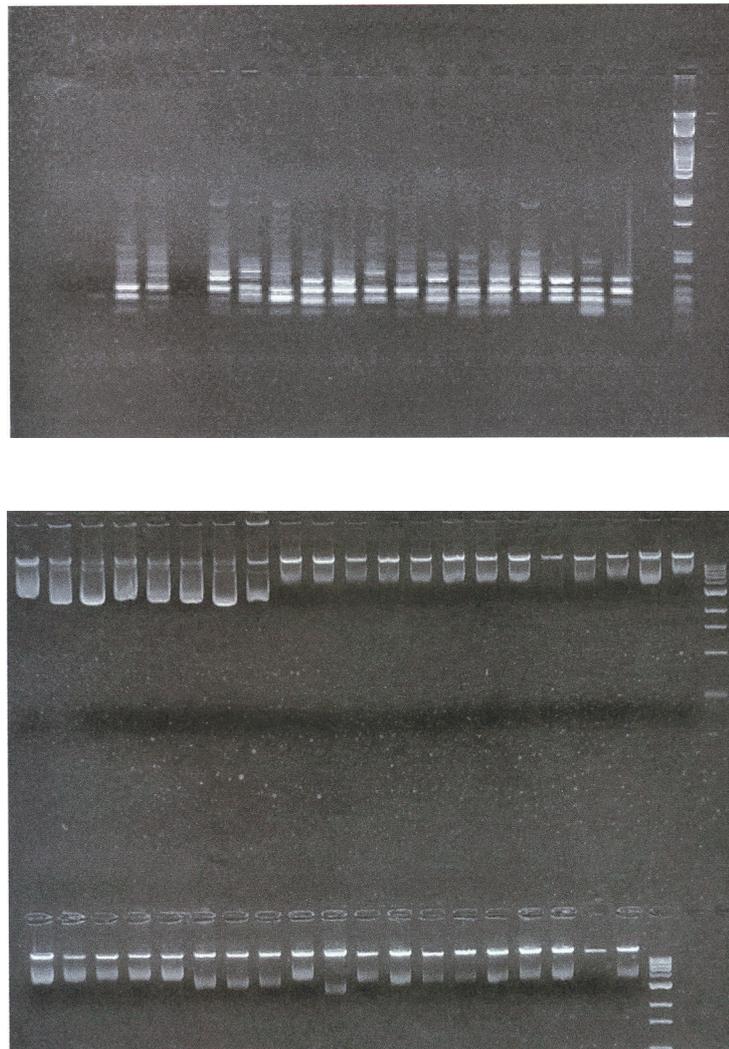


**Figura 14.** pGEM®-T Easy Vector: mappa circolare di (in alto); promotore e sito multiplo di clonaggio (in basso).

Alla fine dell'incubazione, le colonie contenenti l'inserto sono state trasferite su nuove piastre e contemporaneamente, al fine di controllare l'avvenuta trasformazione, in brodo di coltura per la loro moltiplicazione. Le singole colonie

trasferite in brodo sono state tenute a 37°C in agitazione per 16 h. Da queste sono stati estratti i plasmidi (mini-prep), i quali sono stati verificati su gel (Fig. 15).

Infine, i campioni per i quali è stata verificata con l'elettroforesi l'avvenuta estrazione dei plasmidi contenenti l'inserto, sono stati sequenziati. Le sequenze ottenute, dedotte dagli elettroferogrammi, sono state comparate in FASTA con sequenze depositate in banche dati bioinformatiche. Per alcune di queste sequenze sono state rilevate alte percentuali di omologia con sequenze note presenti nelle banche dati.



**Figura 15.** Gel d'agarosio in cui si evidenziano frammenti differenzialmente espressi (in alto); gel d'agarosio in cui si visualizza l'avvenuta trasformazione (in basso).

## CONCLUSIONI

L'articolazione della ricerca oggetto del tirocinio ha permesso di comprendere nuovi aspetti molecolari dell'interazione *Fragaria vesca-Rhizoctonia fragariae*. L'approccio interdisciplinare applicato durante le singole fasi della ricerca ha inoltre costituito il punto di forza dell'impianto sperimentale realizzato. Inoltre, il rigore scientifico adottato in fase di progettazione in laboratorio è stato certamente fondamentale per affrontare una problematica così complessa e articolata.

I risultati ottenuti e l'esperienza maturata dal gruppo di ricerca del Prof. Giuseppe Martelli hanno già permesso di costruire una libreria di cDNA di geni del fungo e della pianta mediante lo schema sperimentale descritto in questa tesi e quindi confermano l'efficacia delle tecniche utilizzate. Tali risultati hanno dimostrato che i genotipi di fragola resistenti al fungo esprimono geni che presentano un'elevata omologia con geni codificanti proteine a funzione nota ( $\beta$ -galattosidasi, chitinasi e glucanasi) e non nota, implicate nelle risposte di difesa della pianta all'attacco parassitario.

Le metodologie sperimentate e ottimizzate in questa tesi costituiscono quindi il presupposto per il lavoro futuro del gruppo di ricerca, volto all'analisi di altri geni differenzialmente espressi in genotipi di fragola resistenti e suscettibili al fungo e alla definizione della loro funzione. Tale lavoro potrà essere supportato da metodologie atte ad investigare il trascrittoma e il proteoma delle due specie e potrà portare alla caratterizzazione e selezione di genotipi di fragola resistenti non solo in laboratorio ma anche in campo.

**BIBLIOGRAFIA**

- Backem CW, Van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vregdenhil D, Zabeau M, Visser RG (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal* 9: 745-753
- Bent AF (1996) Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell* 8: 1757-1771
- Bogdanove AJ (2002) Protein-protein interactions in pathogen recognition by plants. *Plant Molecular Biology* 50: 981-989
- Bonas U, Van den Ackerveken G (1999) Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify plant disease resistance. *Current Opinion in Microbiology* 2: 94-98
- Bostock RM, Karban R, Thaler JS, Weyman PD, Gilchrist D (2001) Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. *European Journal of Plant Pathology* 107: 103-111
- Carstens M, Vivier MA, Pretorius IS (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the *CTS1-2* gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. *Transgenic Research* 12: 497-508
- Cervone F, Scala A, Foresti M, Cacace MG, Novello C (1977) Endopolygalacturonase from *Rhizoctonia fragariae*. Purification and characterization of two isoenzymes. *Biochemical and Biophysical Acta* 482 (2): 379-85.
- Davis TM, Yu H (1997) A linkage map of the diploid strawberry, *Fragaria vesca*. *Journal of Heredity* 88: 215-221
- da Silveira SF, Couto Alfenas A, Ferreira FA, Sutton JC (2000) Characterization of *Rhizoctonia* species associated with foliar necrosis and leaf scorch of clonally-propagated Eucalyptus in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 106: 27-36
- Desikan R, Mackerness SAH, Hancock JT, Neill SJ (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology* 127: 159-172
- Doherty HM, Selevendran RR, Bowles DJ (1988) The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxy-benzoic acids. *Physiology Molecular Plant Pathology* 33: 377-384
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack; mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence- a review. *Gene* 179: 45-51
- Ellingboe AH (2001) Plant-pathogen interactions: genetic and comparative analyses. *European Journal of Plant Pathology* 107: 79-84
- Ellis J, Lawrence G, Ayliffe M, Anderson P, Collins N, Finnegan J, Frost D, Luck J, Pryor T (1997) Advances in the molecular genetic analysis of the flax-flax rust interaction. *Annual Review of Phytopathology* 35: 271-291
- Flor HH (1955) Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685
- Hancock JT, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Neill SJ (2002) Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. *Plant Physiol. Biochemistry* 40: 611-617
- Innes RW (1995) Plant-parasite interactions: has the gene-for-gene model become outdated? *Trends in microbiology* 3 (12): 483-485
- Ji C, Kuć J (1996) Antifungal activity of cucumber b-1,3-glucanase and chitinase. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49: 257-265

- Ji C, Smith-Becker J, Keen NT (1998) Genetics of plant-pathogen interactions in soybean plants carrying the matching disease-resistance. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 202-207
- Kombrink E, Schmelzer E (2001) The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology* 107: 69-78
- LaMondia JA, Elmer WH, Mervosh TL, Cowles RS (2002) Integrated management of strawberry pests by rotation and intercropping. *Crop Protection* 21: 837-846
- Lawton K. *et al.* (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal* 10: 71-82
- Maleck K, Dietrich RA (1999) Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends in Plant Science* 4 (6): 215-219
- Martelli G, Sunseri F, Greco I, Sabina MR, Porreca P, Levi A (1999) Strawberry cultivars genetic relationship using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Advances in Horticultural Sciences* 13: 99-104
- Matta A (1996) *Fondamenti di patologia vegetale*. Patron Editore
- Mayer AM, Staples RC, Gil-ad NL (2001) Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry* 58: 33-41
- Molinari G (2003) Isolamento e caratterizzazione di frazioni geniche differenzialmente espresso nell'interazione *Fragaria vesca-Rhizoctonia fragariae*. Tesi di laurea A.A. 2002/2003. Relatore Prof. Giuseppe Martelli - Università degli Studi della Basilicata
- Moyano A, Portero-Robles, Medina-Esconar, Valpuesta, Munoz-Blanco, Caballero (1998) A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process. *Plant Physiology* 117: 711-716
- Nürnberg T, Scheel D (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends in Plant Science* 6 (8): 372-379
- O'Donnell PJ *et al.* (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274: 1914-1917
- Osborn AE (1999) Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. *Fungal Genetics and Biology* 26: 163-168
- Park SM, Kim DH, Truong NH, Itoh Y (2002) Heterologous expression and characterization of class III chitinases from rice (*Oryza sativa* L.). *Enzyme and Microbial Technology* 30: 697-702
- Prusky D, Keen NT (1993) Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. *Plant Disease* 77: 114-119
- Purl N, Jenner C, Bennett M, Steward R, Mansfield J, Lyons N, Taylor J (1997) Expression of *avrPphB*, an avirulence gene from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and the delivery of signals causing the hypersensitive reaction in bean. *Molecular Plant Microbe Interaction* 10: 247-256
- Remi Shih N, McDonald KA, Jackman AP, Girbés T, Iglesias R (1997) Bifunctional plant defence enzymes with chitinase and ribosome inactivating activities from *Trichosanthes kirilowii* cell cultures. *Plant Science* 130: 145-150
- Roux A, Bilang G (1998). Identification of new early auxin markers in tobacco by mRNA differential display. *Plant Molecular Biology* 38: 385-389
- Ryan C (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28: 425-449
- Sen R, Hietala AM, Zelmer CD (1999) Common anastomosis and internal transcribed spacer RFLP groupings in binucleate *Rhizoctonia* isolates representing root endophytes of *Pinus sylvestris*, *Ceratophyllum* spp. from orchid mycorrhizas and a phytopathogenic anastomosis group. *New Phytologist* 144: 331-341

- Shiriashi T, Saitoh K, Kim HM, Kato T, Tahara M, Oku H, Yamada T, Ichinose Y (1992) Two suppressors, suppressins A and B, secreted by a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiology* 33: 663-667
- Skinner W, Keon J, Hargreaves J (2001) Gene information for fungal plant pathogens from expressed sequences. *Current Opinion in Microbiology* 4: 381-386
- Snoeijs SS, Pérez-García A, Joosten MHAJ, De Wit PJGM (2000) The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 106: 493-506
- Stennis MJ *et al.* (1998) Systemin potentiates the oxidative burst in cultured tomato cells. *Plant Physiology* 117: 1031-1036
- Sturz AV, Carter MR, Johnson HW (1997) A review of plant disease, pathogen interactions and microbial antagonism under conservation tillage in temperate humid agriculture. *Soil & Tillage Research* 41: 169-189
- Suarez V, Staehelin C, Arango R, Holtorf H, Hofstenge J, Meins F (2001) Substrate specificity and antifungal activity of recombinant tobacco class I chitinases. *Plant Molecular Biology* 45: 609-618
- Toyoda K, Collins NC, Takahashi A, Shirasu K (2002) Resistance and susceptibility of plants to fungal pathogens. *Transgenic Research* 11: 567-582
- Vaidya RJ, Shah IM, Vyas PR, Chhatpar HS (2001) Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xyloxydans*: potential in antifungal biocontrol. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17: 691-696.
- Van Etten HD, Matthews DE, Smith DA (1982) Metabolism of phytoalexins. In *Phytoalexins* (J. A. Bailey and J. W. Mansfield, Eds.) pp. 181-217. Blackie, Glasgow/London.
- Vannini A, Caruso C, Leonardi L, Rugini E, Chiarot E, Caporale C, Buonocore V (1999) Antifungal properties of chitinases from *Castanea sativa* against hypovirulent and virulent strains of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 29-35
- Wilhelm S, Nelson PE, Thomas HE, Johnson H (1972) Pathology of strawberry root rot caused by *Ceratobasidium* species. *Phytopathology* 62: 700-705
- Ye XY, Ng TB (2002) A new antifungal protein and a chitinase with prominent macrophage-stimulating activity from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. *Pinto*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290: 813-819
- Zhou J, Tang X, Martin GB (1997) The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *EMBO Journal* 16: 3207-3218