



DIPARTIMENTO DI PROTEZIONE DELLE PIANTE

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN

PROTEZIONE DELLE PIANTE

XXI CICLO

(AGR/12)

**“Aspetti fisiopatologici dell’interazione
Carciofo – *Sclerotinia sclerotiorum*”**

Dottoranda

Dott.ssa EMANUELA MARCUCCI

Coordinatore del dottorato:

Prof. LEONARDO VARVARO

Tutore:

Prof. PAOLO MAGRO

DEDICA

...ai miei genitori.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Prof. Paolo Magro, tutore di questo Dottorato, per i preziosi consigli, per la sua costante disponibilità e la sua presenza in tutte le fasi del lavoro sperimentale.

Un ringraziamento speciale va a tutto il gruppo di ricerca del laboratorio di Fisiopatologia Vegetale, per il loro supporto tecnico-scientifico nonché per l'incoraggiamento e il sostegno che mi hanno fornito in questi anni: Dott.ssa Maria Pia Aleandri, Dott.ssa Diana Martignoni, Dott. Roberto Reda, Prof. Gabriele Chilosì.

Un'espressione di gratitudine va alla Dott.ssa Marina Barba, alla Dott.ssa Graziella Pasquini e al Dott. Andrea Gentili per avermi messo a disposizione le strutture del laboratorio di virologia del Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma e per avermi seguita ed aiutata nello svolgimento di alcune analisi.

Un grazie ad i miei colleghi dottorandi e a tutti gli amici che mi hanno affiancato e sopportato in questo percorso universitario.

Certamente molto più che un'espressione di particolare gratitudine va ai miei genitori per il loro sostegno morale e materiale a questa mia ulteriore formazione.

Un "GRAZIE" particolare va a Marco che mi ha supportato e sopportato in questo periodo con pazienza e amore.

Ringrazio infine tutti gli amici più cari che mi sono stati vicini e che hanno seguito da fuori il mio percorso di studi mostrandomi sempre grande affetto e fiducia.

Indice

DEDICA _____	pag.	ii
RINGRAZIAMENTI _____	”	iii
INDICE _____	”	iv
ELENCO ABBREVIAZIONI _____	”	vii
 1 INTRODUZIONE _____	”	1
1.1 L’ospite _____	”	1
1.1.1 Origine del carciofo ed importanza agronomica_____	”	1
1.1.2 Sistematica e caratteri botanici_____	”	3
1.1.3 Tecnica colturale e ciclo produttivo_____	”	5
1.1.4 Propagazione_____	”	7
1.1.5 Avversità_____	”	9
1.1.6 Controllo delle infestanti_____	”	11
 1.2 Il patogeno _____	”	13
1.2.1 Notizie generali_____	”	13
1.2.2 I sintomi _____	”	13
1.2.3 Il ciclo infettivo di <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> _____	”	15
1.2.4 Aspetti molecolari della patogenicità_____	”	18
1.2.5 Controllo della malattia_____	”	19
 1.3 Resistenza dell’ospite ed attivazione dei meccanismi di difesa	”	21
 1.4 Proteine di patogenesi (PR) _____	”	25
 1.5 Principali induttori di resistenza_____	”	32
 2 OBIETTIVI DELLA TESI _____	”	34
 3 MATERIALI E METODI _____	”	36
3.1 Attività sperimentali di campo _____	”	36
3.2 Identificazione degli agenti patogeni_____	”	36
3.3 Determinazione degli indici di malattia _____	”	37

3.4 Materiale vegetale	”	38
3.5 Ceppi fungini	”	38
3.6 Trattamenti con induttori chimici di resistenza	”	39
3.6.1 In cella climatica	”	39
3.6.2 In campo	”	40
3.7 Inoculazione con <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	”	40
3.7.1 Inoculazione piante allevate in cella climatica	”	40
3.7.2 Inoculazione di piante in campo	”	41
3.8 Estrazione delle proteine	”	41
3.9 Determinazione della concentrazione delle proteine totali	”	42
3.10 Dosaggio dell’attività perossidasi	”	42
3.11 Dosaggio dell’attività glucanasi	”	42
3.12 Dosaggio dell’attività chitinasi	”	43
3.13 Separazione delle forme isoenzimatiche mediante IEF	”	44
3.13.1 Analisi delle forme isoenzimatiche di perossidasi	”	44
3.13.2 Analisi delle forme isoenzimatiche di glucanasi	”	45
3.13.3 Analisi delle forme isoenzimatiche di chitinasi	”	46
3.14 Elaborazione statistica dei risultati relativi ai saggi quantitativi	”	46
4 RISULTATI	”	47
4.1 Andamento climatico	”	47
4.2 Monitoraggio fitopatologico effettuato in campo su varietà di carciofo tradizionali e di nuova costituzione	”	49
4.2.1 Virosi	”	52
4.2.2 Peronospora	”	53
4.2.3 Marciumi del colletto	”	56
4.3 Trattamenti con induttori chimici di resistenza	”	57
4.3.1 Perossidasi	”	58
4.3.2 Glucanasi	”	62
4.3.3 Chitinasi	”	66
4.4 Indice di malattia in piante di carciofo trattate con induttori di resistenza e successivamente inoculate con <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	”	70

4.5 Espressione di proteine PR in piante di carciofo trattate con induttori di resistenza ed inoculate con <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> —————	”	71
4.6 Induzione di resistenza su piante di carciofo in campo ———	”	82
5 DISCUSSIONE —————	”	90
6 CONCLUSIONI —————	”	95
7 BIBLIOGRAFIA —————	”	97

ELENCO ABBREVIAZIONI

AILV	Artichoke italian latent virus
AMCV	Artichoke mottle crinale virus
ArLV	Artichoke latent virus
Avr	Avirulenza
BABA	Acido β -aminobutirrico
BTH	Acibenzolar-S-methyl (benzol[1,2,3]thiadiazole-7-carbothioic acid-S-methyl ester)
Campagn.	Varietà Campagnano
CTL	Controllo
C3 micro	Varietà C3 micropropagata
C3 card.	Varietà C3 propagata con carducci
DNSA	DiNitro Salicylic Acid (acido dinitrosalicilico)
HR	Hypersensitive response (risposta ipersensibile)
IEF	Isoelectric Focusing (isoelettrofocalizzazione)
IM	Indice di malattia
INA	2,6-dichloroIsoNicotinic Acid (acido 2,6-dicloroisonicotinico)
I	Inoculato
ISR	Induced Systemic Resistance (resistenza sistemica indotta)
ISSR	Inter simple sequence repeats
JA	Jasmonic Acid (acido jasmonico)
LAR	Localized Acquired Resistance (resistenza localizzata acquisita)
NO I	Non inoculato
PDA	Potato Dextrose Agar (agar patata destrosio)
PG	Poligalatturonasi
pH	Potenziale dell'idrogeno
pI	Punto isoelettrico
PME	Pectin metil esterasi
PNL	Pectin liasi
PR	Pathogenesis-Related proteins (proteine correlate alla patogenesi)
PS	Proteina standard
R	Resistenza

RAPD	Random amplified polymorphic DNA (DNA polimorfico amplificato casualmente)
SA	Salicylic Acid (acido salicilico)
SAR	Systemic Acquired Resistance (resistenza sistemica acquisita)
SSR	Simple sequence repeats (microsatelliti)
TMV	Tobacco mosaic virus (virus del mosaico del tabacco)
TEMED	N, N, N', N' – tetrametilenediamina
TRIS	Tris[idrossimetil]-amminometano
TSWV	Tomato spotted wilt virus
U	Unità di attività enzimatica
UI	Unità internazionali
UR	Umidità relativa
UV	Ultra Violet (luce ultravioletta)

1 INTRODUZIONE

1.1 L'OSPITE

1.1.1 ORIGINE DEL CARCIOFO ED IMPORTANZA AGRONOMICA

Noto già agli Egiziani, il carciofo era consumato non solo come ortaggio, ma, nel Medioevo, anche per le sue proprietà medicinali presenti, più che nei capolini, nelle foglie e fusti di sapore amaro, utili per attenuare i disturbi di fegato.

È originario dell'area compresa tra i Paesi che si affacciano sulla costa orientale del Mediterraneo e l'Africa settentrionale fino all'Etiopia, Paese in cui si trovano, ancora oggi, specie spontanee del genere *Cynara*. Citato da scrittori greci, latini ed ebrei, di certo si sa che fu portato da Napoli a Firenze nel 1466 e verso la fine del '400 è segnalato anche a Venezia; in seguito si diffuse in Francia e in Inghilterra e, forse verso la fine del '700, anche negli USA.

Nel 1990 la superficie mondiale coltivata a carciofo era di 127.000 ha, di cui ben 99.000 in Europa. Al di fuori del vecchio continente i maggiori produttori sono l'Argentina, gli USA, l'Egitto, l'Algeria. Nella UE la coltivazione di questo ortaggio è presente nei Paesi del Mediterraneo e, in ordine di importanza, in Italia, Spagna e Francia. L'Italia è il maggior produttore a livello mondiale; infatti, sempre nel 1990, il carciofo era coltivato su una superficie di oltre 47.000 ha e ha fornito una produzione di 487.000 t di capolini. In seguito questi valori sono leggermente diminuiti, tanto che nel 1992 sono scesi rispettivamente a 45.600 ha ed a 482.000 t di capolini. Dati ISTAT del 2007 indicano una superficie coltivata a carciofo pari a 50.120 ha per una produzione totale di 474.283 t di capolini.

Le regioni in cui la coltura è maggiormente diffusa sono Puglia, Sicilia e Sardegna, mentre le maggiori rese unitarie si ottengono nel Lazio e in Campania con oltre 16 t/ha di capolini. Dal Lazio proviene circa il 4% della produzione totale (196.600 q), ricavata dalle coltivazioni nelle province di Viterbo (250 ha), Roma (500 ha), e Latina (280 ha).

Regioni	Superficie %								
	1954	1964	1974	1984	1994	2004	2005	2006	2007
Lazio	25,97	14,80	10,77	5,10	2,70	2,10	2,08	2,04	2,10
Campania	6,19	5,18	5,76	3,70	5,75	3,69	3,38	3,99	4,01
Puglia	5,7	23,99	25,54	35,20	35,37	33,35	33,00	33,18	33,47
Sicilia	24,44	18,91	19,53	26,00	25,08	29,75	30,52	29,73	29,35
Sardegna	17,48	24,31	27,04	22,10	26,25	25,77	25,74	25,76	25,84
Toscana	8,50	6,14	5,76	2,90	1,79	1,41	1,50	1,46	1,13
Altre	11,63	6,67	5,60	5,00	3,06	3,93	3,78	3,84	4,1
Superficie totale Italia (ha)	22.880	54.670	57.550	51.320	51.600	50.070	50.120	50.380	50.120

Tab. 1: Superficie totale destinata a carciofo in Italia e ripartizione percentuale tra le diverse regioni dal 1954 al 2007.

Dal punto di vista nutritivo il carciofo, per il suo abbondante contenuto di sostanze azotate e di carboidrati, è un alimento plastico e molto energetico. Per l'alto contenuto della fibra indigeribile (il 65% di questa è costituita da cellulosa, il 21% da emicellulose e il 14% da lignina) e di acidi organici (tannino) il carciofo può risultare utile per i benefici effetti sul metabolismo glicidico e lipidico. Risulta basso il contenuto di lipidi, vitamina A, B1, B2, C, PP e di zolfo. Tra gli amminoacidi quello maggiormente presente è l'acido aspartico. La cinarina, contenuta nel carciofo in una buona quantità, è una sostanza amara preziosa per la sua funzione epatica/renale, e con un importante ruolo nel controllo del livello del colesterolo. Tale effetto farmacologico è stato dimostrato da numerosi studi scientifici. E' importante ricordare che la cinarina non è presente nella pianta fresca, ma si forma durante l'essiccamento. Le dosi terapeutiche di Cinarina variano da 60 mg a 1,5 g (www.sifit.org).

1.1.2 SISTEMATICA E CARATTERI BOTANICI

Il carciofo *Cynara cardunculus* appartiene all'ordine *ASTERALES*, famiglia *ASTERACEAE* (*COMPOSITAE*), sottofamiglia *ASTEROIDEAE* (*TUBULIFLORAE*). La famiglia conta circa 20.000 specie ed è pertanto una delle più rappresentate tra le angiosperme. Il nome le deriva dal tipo d'infiorescenza (capolino) che, pur raggruppando un cospicuo numero di fiori assai minuti, simula nell'aspetto un singolo fiore. Le foglie sono in genere sparse, prive di stipole, con lamina più o meno incisa fino a composta. L'infiorescenza è tipicamente il capolino, costituito da un ricettacolo allargato, di forma più spesso conica, sul quale sono inseriti numerosi piccoli fiori circondati da un complesso di brattee periferiche simulante un calice. Il tipo florale è solitamente ermafrodito con calice spesso trasformato in organo di volo (pappo) e adatto alla disseminazione ad opera del vento, oppure provvisto di setole uncinatate per favorire la disseminazione da parte degli animali. La corolla è gamopetala a 5 elementi e può presentare simmetria raggiata (corolla attinomorfa) nei cosiddetti fiori tubulosi o unilaterale (corolla zigomorfa) nei fiori ligulati.

La presenza e la distribuzione dei due tipi fiorali sul capolino è importante carattere sistematico ed è alla base della suddivisione interna della famiglia in due grandi sottofamiglie facilmente identificabili: *ASTEROIDEAE* (*TUBULIFLORAE*) e *CICHORIOIDEAE* (*LIGULIFLORAE*).

La sottofamiglia delle *ASTEROIDEAE* (*TUBULIFLORAE*), alla quale appartiene il carciofo, possiede capolini di soli fiori tubulosi o dei due tipi insieme, ma con fiori ligulati (solitamente pistilliferi o sterili) posti in periferia con funzione vessillare (fiori del raggio) e fiori tubulosi (ermafroditi) raccolti al centro (fiori del disco).

Il genere *Cynara* L. comprende otto specie e quattro sottospecie: *C. algarbiensis* Cosson, *C. auranitica* Post, *C. boetica* (Spreng) Pau, incluse le ssp. *baetica* e *maroccana* (prima nota come *C. hystrix*), *C. cardunculus* L., incluse le ssp. *cardunculus* e *flavescens*, *C. cornigera* Lindley, *C. cyrenaica* Maire & Weiler, *C. humilis* L. (prima nel genere *Bourgaea*) e *C. syriaca*. Boiss. Il carciofo coltivato ed il cardo sono entrambi inclusi in *C. cardunculus* L. ssp. *flavescens* (Wiklund, 1992).

Da un punto di vista fitogeografico, il genere *Cynara* è un elemento della Flora Mediterranea.

La sua distribuzione è molto simile a quella dell'olivo (*Olea europea* L.) e del leccio (*Quercus ilex* L.). *C. cardunculus* è tra le specie di *Cynara* la più diffusa. La presenza di *C. cardunculus* fuori dalla regione Mediterranea è quindi il risultato di una naturalizzazione.

L'entità tassonomica largamente più coltivata in tutto il mondo è *Cynara cardunculus ssp. scolymus*.

Cynara cardunculus L ($2n=2x=34$) è una specie allogama che include il carciofo (var. *scolymus* L.), coltivato per la produzione di capolini, il cardo (var. *altilis* DC), le cui venature fogliari sono utilizzate nella preparazione di piatti tipici in Sud Europa e Nord Africa ed il cardo selvatico [var. *sylvestris* (Lamk) Fiori], diffuso in ambienti aridi del bacino del Mediterraneo e progenitore di entrambe le forme coltivate (Sonnante *et al.*, 2007; Acquadro *et al.*, 2005 b). Numerosi studi hanno messo in evidenza che tutte le varietà botaniche della specie posso essere sfruttate per l'estrazione di olio dai semi, per l'ottenimento di prodotti di interesse farmaceutico da radici e foglie e per la produzione di biomassa.

A tutt'oggi è stata effettuata una caratterizzazione molecolare della variabilità genetica in forme spontanee e coltivate di *C. cardunculus*, mediante applicazione di marcatori SSR (Simple Sequence Repeats o microsatelliti), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Ffragment Length Polymorphism) ed ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) (Perrino *et al.*, 2006).

Le varietà di carciofo sono classificate secondo diversi criteri. I principali sono i seguenti:

- in base alla presenza e allo sviluppo delle spine si distingue fra varietà *spinose* e *inermi*. Le prime hanno capolini con brattee terminati con una spina più o meno robusta, le inermi hanno invece brattee mutiche o mucronate;
- in base al colore del capolino si distingue fra varietà *violette* e *verdi*;
- in base al comportamento nel ciclo fenologico si distingue fra varietà *invernali* o rifiorenti e varietà *primaverili*. Le prime si prestano alla forzatura in quanto possono produrre capolini nel periodo autunnale e una coda di produzione nel periodo primaverile. Le seconde sono adatte alla coltura non forzata in quanto producono capolini solo dopo la fine dell'inverno.

Tra le varietà più famose si annoverano lo *Spinoso sardo* (coltivato anche in Liguria con il nome di *Carciofo spinoso della Liguria*), il *Catanese*, il *Verde di Palermo*, la *Mammola verde*, il *Romanesco*, il *Violetto di Toscana*, il *Precoce di Chioggia*, il *Violetto di Provenza*, il *Violetto di Niscemi*. Le varietà di maggiore diffusione in passato erano il *Catanese*, lo *Spinoso sardo* e il *Violetto di Provenza*, fra i tipi autunnali forzati, e il *Romanesco* con il *Violetto di Toscana* fra quelli primaverili non forzati. Lo *Spinoso sardo*, una delle varietà più apprezzate nel mercato locale e in alcuni mercati dell'Italia settentrionale, ha subito un drastico ridimensionamento dagli anni '90 a causa della ridotta pezzatura media dei capolini

e della minore precocità di produzione rispetto ad altre cultivar più precoci (*Tema, Terom, Macau*, ecc.).

1.1.3 TECNICA COLTURALE e CICLO PRODUTTIVO

Il carciofo viene considerato una coltura da rinnovo e si avvale, al momento dell'impianto, di un'aratura profonda. La coltivazione del carciofo si adatta a tutti i tipi di terreno anche se preferisce quelli di medio impasto, profondi e ben drenati, a causa della sua sensibilità ai marciumi radicali. Nei terreni argillosi, infatti, la maturazione viene ritardata, mentre in quelli sabbiosi e calcarei si ottengono capolini di dimensioni ridotte.

L'irrigazione influenza direttamente la durata del ciclo colturale del carciofo. Tale pratica è molto diffusa nelle aree più meridionali e sulle varietà precoci e nei mesi estivi evita alla pianta di andare in riposo consentendo un notevole anticipo della produzione. Nella coltivazione dei tipi tardivi (primaverili) il ricorso all'irrigazione è piuttosto limitato; talvolta si effettuano interventi irrigui a fine stagione, nelle primavere siccitose, per prolungare il periodo di raccolta ed ottenere un buon livello qualitativo del prodotto. L'ottenimento di una buona produzione commerciale, sia come epoca di raccolta sia come caratteristiche qualitative, è raggiungibile solo con una fertilizzazione adeguata. Una carciofaia al 3° anno di impianto, in buone condizioni di coltivazione, può produrre oltre 100 t/ha di biomassa (13 t/ha di sostanza secca). Il periodo di massimo accrescimento si verifica in corrispondenza della differenziazione dell'apice caulinare. Circa un terzo della biomassa prodotta rappresenta la produzione asportata con la raccolta; due terzi, quindi, possono essere riutilizzati dalla coltura nel successivo ciclo colturale interrando i residui.

I maggiori fabbisogni nutritivi si hanno da parte delle cultivar precoci dell'Italia meridionale a causa del più lungo ciclo produttivo. In questo caso si raggiungono apporti azotati fino a 500 kg di N/ha. Nella realtà laziale e per le varietà tardive, in linea generale, si consigliano apporti complessivi di 150-200 kg N/ha. L'azoto dovrebbe essere distribuito in minima parte insieme al fosforo ed al potassio al risveglio autunnale della coltura. Le esigenze azotate maggiori, invece, si hanno dalla fase di differenziazione dell'apice alla raccolta dei capolini ed è in questo periodo che va somministrata la restante parte di azoto, possibilmente in maniera frazionata.

Il fosforo, malgrado le limitate asportazioni colturali, va adeguatamente somministrato in

quanto, nei terreni calcarei e con pH superiore a 7, tende ad immobilizzarsi. E' consigliabile quindi apportare al risveglio vegetativo 100-150 kg/ha di P_2O_5 .

Il potassio viene asportato dal carciofo in grandi quantità, una buona parte di questo torna al terreno con i residui colturali. Pertanto, sono sufficienti dosi di 50-150 di ossido di potassio (K_2O) da somministrare sempre nella fase del risveglio vegetativo.

Le maggiori asportazioni di microelementi da parte del carciofo riguardano il calcio ed il sodio e ciò sta a dimostrare che la coltura si adatta bene nei terreni calcarei e salmastri dell'Italia meridionale. Il carciofo ha una elevata efficienza nell'assorbimento del ferro: è stato dimostrato che l'insolubilità di questo elemento viene superata tramite l'emissione a livello radicale di composti fenolici.

Il suo ciclo naturale è autunno-primaverile: alle prime piogge autunnali le gemme del rizoma si risvegliano ed emettono nuovi getti. I primi capolini sono emessi verso la fine dell'inverno, a partire dal mese di febbraio. In tarda primavera la pianta va in riposo con il disseccamento di tutta la parte aerea.

Nelle zone più calde delle regioni mediterranee il carciofo viene coltivato con una tecnica di forzatura che ha lo scopo di anticipare al periodo autunnale la produzione di capolini. La tecnica consiste nel forzare il risveglio nel corso dell'estate: dai rizomi di una coltura precedente si prelevano le gemme, dette ovuli, e dopo una fase di pregermogliamento sono messi a dimora dalla seconda metà di giugno in poi, facendo seguire un'irrigazione copiosa. In questo modo l'attività vegetativa ha inizio in piena estate, con differenziazione a fiore nel mese di settembre e produzione dei capolini di primo taglio nei mesi di ottobre e novembre.

La forzatura del carciofo produce risultati solo nelle *cultivar* riflorenti e, in ogni modo, è causa di situazioni di stress biologico che deprimono la longevità della carciofaia. Per questo motivo le carciofaie forzate sono condotte in coltura annuale, biennale o triennale. Dopo il secondo o terzo anno la percentuale di diradamento è tale da rendere economicamente più vantaggioso il reimpianto della carciofaia. Al gruppo delle varietà *riflorenti*, dette anche invernali, appartengono tipi la cui produzione si verifica a cavallo dell'inverno, con inizio ad ottobre-novembre, e, dopo una stasi invernale, continua in primavera fino a maggio. Queste varietà, in generale, sono caratterizzate da un capolino medio-piccolo del peso di circa 150-200 g. Una parte consistente della seconda produzione, cioè quella che appare dopo l'inverno, viene destinata all'industria conserviera per la surgelazione e l'inscatolamento. Queste varietà sono coltivate nell'Italia Meridionale e nelle Isole e sono rappresentate dalle due famiglie dei "Catanesi" e degli "Spinosi".

I tipi appartenenti alle varietà *non rifioranti*, o primaverili, forniscono una produzione più o meno precoce che può durare da febbraio-marzo fino a maggio-giugno. Questi carciofi rappresentano una produzione molto pregiata, hanno un capolino molto più grande dei rifioranti che si presta anche per l'esportazione. Le varietà primaverili, coltivate nell'Italia centro-settentrionale, si dividono in due grandi famiglie: i "Romaneschi" ed i "Violetti" (Bianco and Pimpini, 1990).

1.1.4 PROPAGAZIONE

Il carciofo si può propagare sia per via sessuata, con la riproduzione da seme, sia per via vegetativa sfruttando la sua naturale predisposizione ad emettere nuove piante dalle gemme del rizoma. La riproduzione da seme, pur essendo tecnicamente attuabile, non ha alcuna utilità pratica per le cultivar italiane: a causa del forte grado di eterozigosi delle nostre varietà, le piante nate da seme avrebbero caratteri completamente diversi ed eterogenei rispetto allo standard varietale. La propagazione vegetativa tradizionale segue metodi diversi secondo il tipo di ciclo colturale, ma si riconducono a due tipi: la propagazione per ovoli e quella per carducci (Bianco and Pimpini, 1990).

Gli ovoli sono porzioni di rizoma ingrossate provviste di una o più gemme. La propagazione per ovoli si pratica con il prelievo, all'inizio dell'estate, dei rizomi dalle vecchie carciofaie. Da questi vengono separati gli ovoli, messi a pregermogliare per uno o due giorni e poi messi a dimora in un periodo che va dalla seconda metà di giugno fino agli inizi di agosto. L'epoca di "semina" è correlata all'epoca del raccolto del primo taglio.

I carducci sono i polloni basali emessi dal rizoma delle piante di oltre un anno d'età nelle prime fasi vegetative. Fra le operazioni colturali che si praticano durante la fase vegetativa è prevista la scarducciatura, ossia il diradamento della coltura con l'eliminazione dei polloni in quanto sottraggono risorse nutritive alla pianta a scapito delle rese qualitative della produzione. I polloni asportati possono essere messi a dimora in autunno per impiantare una carciofaia poliennale che darà la prima produzione al secondo anno d'impianto.

Le colture ottenute da ovoli iniziano il loro ciclo in piena estate e sono pertanto in grado di produrre capolini già nell'autunno successivo o nella primavera successiva. Questa tecnica di propagazione è pertanto utilizzata per le varietà autunnali o rifioranti in coltura forzata. Le colture ottenute da carducci iniziano il loro ciclo in autunno inoltrato e poiché la pianta non riesce ad acquisire una sufficiente vigoria l'impianto è finalizzato a dare la prima produzione al secondo. Questa tecnica si adotta pertanto per le varietà primaverili in coltura non forzata.

La propagazione vegetativa ha il pregio di trasmettere il genotipo delle piante madri alle piante propagate, permettendo il mantenimento dello standard varietale. Ha però lo svantaggio di trasmettere le virosi accumulate, che sono una delle principali cause che riducono la longevità di una carciofaia. Per migliorare lo stato fitosanitario delle colture si può ricorrere a piante ottenute da micropropagazione. Questa tecnica consiste in una moltiplicazione *in vitro* con l'espianto dei meristemi apicali dagli apici vegetativi delle piante. I meristemi prelevati, detti espianti, essendo composti da cellule embrionali possono rigenerare un'intera pianta se opportunamente trattati (coltivazione "*in vitro*" su substrati nutritivi in cella climatica).

Il principio su cui si basa la micropropagazione risiede nel fatto che le cellule vegetali embrionali, essendo in fase di moltiplicazione, non sono infettate dai virus, pertanto le piante micropropagate sono risanate, ossia esenti da virus. In realtà la sicurezza del risanamento dipende dall'età delle cellule prelevate: le cellule effettivamente sane sono quelle del cono vegetativo, che rappresentano una porzione minima del meristema apicale, mentre, all'aumentare della distanza dall'apice meristematico, aumenta la probabilità che la cellula sia infettata dai virus. Con espianti di dimensioni ridotte aumenta la percentuale di risanamento delle piante micropropagate, per contro si riduce la percentuale di attecchimento. Un congruo compromesso si raggiunge prelevando espianti di dimensioni dell'ordine di mezzo millimetro.

Le colture ottenute da piante micropropagate presentano, almeno nei primi anni, un migliore stato fitosanitario che si manifesta con una maggiore vigoria e, di riflesso, una più elevata produttività. La micropropagazione presenta per contro degli svantaggi:

- le colture micropropagate sono più suscettibili alle avversità ambientali, pertanto il mantenimento dello stato fitosanitario richiede cure colturali più attente.
- la micropropagazione è una tecnica costosa perché richiede la prima fase richiede l'impiego di attrezzature di laboratorio e tecnici altamente specializzati. Il materiale micropropagato pertanto è molto più costoso di quello tradizionalmente usato, che in sostanza è materiale di scarto con un costo essenzialmente legato alla manodopera richiesta per il prelievo.
- quando allo standard varietale contribuisce la base genetica dei virus latenti integrati nel DNA dell'ospite, le piante micropropagate danno produzioni qualitativamente differenti da quelle propagate per carducci. Questo fenomeno si è riscontrato ad esempio nello Spinoso sardo, che con la micropropagazione perde in modo significativo parte delle proprietà organolettiche.

1.1.5 AVVERSITÀ

Il carciofo pur essendo una pianta rustica non sfugge alle avversità biotiche ed abiotiche (fisiopatie).

Tra le fisiopatie l' "atrofia del capolino" riveste un ruolo importante, ma solo per le varietà tardive. Non sono stati, infatti, osservati capolini atrofici su cultivar o tipi a produzione invernale o tardiva (Romanesco, Campagnano ecc.). La malformazione si presenta con capolini di dimensioni ridottissime o con capolini normali con brattee non completamente sviluppate e con margine superiore imbrunito. In ogni caso tutti i capolini atrofici si caratterizzano per la mancanza dei bocci fiorali (pappo) sul talamo (o cuore) il quale risulta necrotico. Al manifestarsi di questa fisiopatia concorrono diversi fattori quali: temperature maggiori di 25° C nella fase di transizione dell'apice caulinare da vegetativo a riproduttivo, condizioni idriche, contenuto di sali solubili nel terreno ecc.

I danni da gelo interessano la coltura quando la temperatura scende a livelli critici. In particolare già a 0° C si osserva il distacco della cuticola delle brattee, a -4° C si hanno danni permanenti alla parte aerea, a -7°C congela la pianta e a -10°C si ha la morte del rizoma. Per difendere la coltura dal gelo si possono effettuare irrigazioni a pioggia lenta allorché la temperatura arriva a 0°C.

Il carciofo è una tra le specie sensibili ai diserbanti di tipo ormonico (2,4 D). Danni da ormonici si osservano nelle carciofaie vicine a campi di frumento.

Il carciofo è dotato di ampia espansione fogliare e di fusti e gemme molto carnose, per cui è particolarmente soggetto agli attacchi di parassiti animali. Il più temuto parassita del carciofo nei nostri ambienti è l'arvicola (topo campagnolo) la cui enorme diffusione limita fortemente la durata degli impianti. Questo parassita è di difficile controllo; si cerca di contenere i danni mediante esche o carducci avvelenati in estate, quando la coltura è in vegetazione e le arvicole escono all'aperto avendo scarso alimento.

Tra gli insetti che danneggiano i capolini, due specie di lepidotteri sono degne di particolare attenzione: la nottua del carciofo (*Gortyna xanthenes* Germ.) e la depressaria (*Depressaria erinaceella* Stg.).

Le nascite larvali avvengono in ottobre-novembre per la depressaria e in gennaio-febbraio per la nottua. Importante è effettuare il controllo prima che le larve facciano il loro ingresso nella pianta. E' necessario inoltre fare una scelta oculata degli insetticidi in modo da conciliare tempi di carenza con ritmi di raccolta. Altri fitofagi da noi ricorrenti sono gli afidi (*Brachycaudus cardui*, *Aphis fabae*, *Myzus persicae* ecc.) e la cassida (*Cassida deflorata*

Suffr.) nei confronti dei quali è consigliabile intervenire con piretro naturale o con piretroidi, per il loro basso tempo di carenza (Pollini, 2006).

Tra le malattie crittogamiche quella che interessa maggiormente il carciofo nei nostri ambienti è rappresentata dal marciume del colletto che vede coinvolti funghi come *Sclerotinia spp.*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia spp.*, abbondantemente presenti nei terreni mal drenati. Il marciume del colletto da *Sclerotinia sclerotiorum* è molto diffuso e consiste in una alterazione litica dei tessuti corticali i quali imbruniscono ricoprendosi, in seguito, di una abbondante muffa di aspetto feltroso-cotonoso di color bianco candido in cui si evidenziano gli sclerozi (corpi di colore nero). Questa patologia si manifesta generalmente nei terreni umidi e ricchi di sostanza organica. I danni provocati sono ingenti tanto da compromettere, nella maggior parte dei casi, tutta la coltura. Non esistono misure di lotta dirette per fronteggiare il marciume del colletto in maniera efficace. Si suggerisce di non ripetere la coltivazione del carciofo nello stesso terreno in tempi brevi e di effettuare frequenti lavorazioni al terreno.

L'oidio (*Leveillula taurica*) e la peronospora (*Bremia lactucae*), nel territorio laziale, sono sporadiche e generalmente non creano problemi fitosanitari. L'oidio generalmente si manifesta alla fine dell'estate e può protrarsi sino al giungere dei primi freddi. L'infezione da oidio é riconoscibile in modo specifico poichè colpisce la pianta del carciofo a partire dalle foglie basali. Queste ultime, una volta colpite, prima ingialliscono e poi disseccano con un caratteristico ripiegamento dell'apice della foglia verso l'alto.

La peronospora si manifesta nei periodi dell'anno particolarmente umidi che generalmente coincidono con il principio dell'autunno; può, comunque, ripresentarsi anche in primavera. L'infezione colpisce le foglie più giovani della pianta del carciofo sulla quale si osservano caratteristiche macchie clorotiche che successivamente assumono una colorazione bruna. Sulla pagina inferiore della foglia colpita da peronospora si osserva la tipica efflorescenza biancastra che è costituita dagli organi di propagazione della malattia (sporangiofori). La peronospora provoca il disseccamento repentino delle parti colpite ed il conseguente deperimento della pianta.

Il marciume radicale è causato da *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*); si tratta di un batterio che colpisce le piante manifestandosi nelle ferite provocate da tagli operati a seguito di interventi colturali. Tale batterio, in condizioni climatiche caratterizzate da alta umidità, determina marcescenza della pianta.

I virus attualmente riconosciuti sul carciofo sono circa ventiquattro (Gallitelli *et al.*, 2004). Il fatto che tante entità virali diverse possano infettare questa pianta non desta eccessiva

sorpresa, considerando che la composita, essendo una coltura poliennale a propagazione vegetativa, trasferisce alla progenie i virus che nel tempo abbiano infettato le piante madri.

Nei virus del carciofo la latenza e la virulenza sono caratteristiche incostanti ed imprevedibili, governate, sembrerebbe, più da fattori esterni (climatici, agronomici e varietali) che da proprietà intrinseche ai virus stessi (Rana and Martelli, 1983).

L'elevata incidenza di infezioni virali è dovuta essenzialmente all'utilizzazione di materiale di propagazione non esente da virus ed alla condizione poliennale della coltura, la quale favorisce la diffusione di processi degenerativi di natura virale, soprattutto ad opera di insetti vettori, nonché per ultimo, ad una non efficace rotazione colturale.

Relativamente alla cultivar del carciofo romanesco, varietà trattata in questo lavoro, da recenti indagini (Pasquini and Barba, 2001) è emerso che lo stato sanitario della coltura è seriamente compromesso dalla presenza di complesse infezioni virali che inducono sintomatologie molto gravi, riducendo la quantità e la qualità dei capolini. In particolare è stata rilevata la presenza del virus latente del carciofo (*Artichoke latent virus*, ArLV), del virus italiano latente del carciofo (*Artichoke Italian latent virus*, AILV), del virus dell'arricciamento maculato del carciofo (*Artichoke mottle crinale virus*, AMCV) ed infine, quella del virus dell'avvizzimento maculato del pomodoro (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV).

1.1.6 CONTROLLO DELLE INFESTANTI

Il controllo delle infestanti di una coltura poliennale come il carciofo è di fondamentale importanza. Tra le infestanti della carciofaia c'è una lunga serie di malerbe annuali, biennali e perenni. Tra queste un ruolo di rilievo spetta alle graminacee e all'acetosella (*Oxalis* spp.). Quest'ultima infestante ha un ciclo autunno-primaverile coincidente con quello della coltura ed ha una notevole capacità di diffusione, essendo fornita di organi di moltiplicazione sotterranea (bulbilli) che, durante le lavorazioni, vengono diffusi dagli organi rotanti delle macchine. Prima dell'impianto si può intervenire con prodotti ad azione fogliare come glufosinate ammonio o glyphosate, in presenza di malerbe già note, aggiungendo un prodotto residuale quale il trifluralin, seguito da un leggero interrimento, o pendimethalin, distribuito in superficie. Successivamente gli interventi vanno effettuati in pre-emergenza delle infestanti (Bianco and Pimpini, 1990).

Tra i formulati ammessi ve ne sono alcuni selettivi nei confronti delle composite (propizamide, chlorthal-dimetil) e alcuni meno selettivi (simazina, linuron, oxyfluorfen) non impiegabili su carciofaie di nuovo impianto.

In genere è consigliabile una miscela dei due tipi di diserbanti in quanto l'uso ripetuto della propizamide o del chlorthal-dimetil comporta la diffusione di malerbe della famiglia delle Composite e soprattutto del *Sonchus oleraceus* L. Quindi è consigliabile aggiungere alla dose di 1,5-2 kg/ha di propizamide 1 kg/ha di linuron o circa 0,5 kg/ha di simazina. Impiegando simazina e linuron è bene prestare attenzione a non bagnare le foglie di carciofo durante il trattamento, inoltre per la simazina porre attenzione alla coltura successiva.

Infine, è poco noto ai consumatori che in talune zone questa specie viene coltivata senza interventi con agrofarmaci (www.netgalaxy.it/carciofi.htm).

1.2 IL PATOGENO

1.2.1 NOTIZIE GENERALI

L'agente patogeno responsabile del marciume del colletto è il fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary; in alcuni casi dai tessuti lesionati si può rinvenire anche *Sclerotium rolfsii*, ma raramente ciò accade su piante adulte; infatti, questo patogeno secondario risulta pericoloso soltanto su piantine in fase di attecchimento subito dopo il trapianto. *S. sclerotiorum* è un fungo polifago e non specifico, colpisce infatti, oltre al carciofo, piante come insalata, sedano, pomodoro, carota, fagiolo e molte altre colture erbacee, ortensi, floricole e industriali (Boland and Hall, 1987).

Il genere *Sclerotinia* ha una distribuzione geografica praticamente cosmopolita benchè sia più frequente nelle regioni temperate, caratterizzate da climi umidi e freschi (Mordue and Holliday, 1976).

1.2.2 I SINTOMI

S. sclerotiorum svolge il suo ciclo vitale prevalentemente nel suolo, di conseguenza l'attacco inizia dalla zona del colletto, anche se il fungo, mediante le ascospore, può essere trasportato per via aerea.

Sulla parte aerea della pianta colpita si osserva un progressivo ingiallimento e disseccamento delle foglie, a partire da quelle più esterne fino a quelle interne più giovani. Col progredire della malattia si possono osservare lesioni di colore bruno al livello del colletto, durante la diffusione del fungo i tessuti assumono una consistenza molle, nella stessa zona compare poi una caratteristica muffa biancastra ed infine compaiono delle membrane nelle globose, gli sclerozi, neri, spessi e duri che sono le strutture riproduttive caratteristiche per questo fungo e sono frequentemente un segno inequivocabile per la diagnosi di *Sclerotinia*.

La pianta con questi sintomi riduce progressivamente la sua produttività e muore nel giro di 2-3 anni, diminuendo così l'investimento delle piante/ettaro e la vita economica della carciofaia.



Fig. 1: Sintomi di marciume del colletto su pianta adulta.



Fig. 2: Sintomi di marciume del colletto su piantine subito dopo il trapianto.

1.2.3 IL CICLO INFETTIVO DI *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

Circa il 90% del ciclo di questo patogeno si svolge nel terreno sotto forma di sclerozi (Fig.4). Gli sclerozi sono generalmente considerati le più importanti strutture di sopravvivenza del genere *Sclerotinia*. Dagli sclerozi, di forma e dimensioni assai variabili (2-5 mm), prendono origine gli apoteci aventi forma di disco concavo, giallo bruno, di 5-7 mm di diametro (Fig.5). Il ricettacolo a forma di coppa, è portato da un pedicello cilindrico, largo 1-2 mm e lungo 3 mm e contiene gli aschi con 8 ascospore ellittiche uni seriate. La temperatura ottimale per la germinazione è compresa tra i 10 e i 20°C (Matta, 1996).

Le condizioni ottimali di temperatura ed una elevata umidità fanno germinare le ascospore in 6-8 ore. Uno studio ha dimostrato che gli apoteci raccolti dal campo rilasciavano continuamente ascospore per 7 giorni. Le ascospore infettano i tessuti della pianta ospite, germinano e ricoprono parte della pianta con micelio. Dal micelio sulla pianta ospite si formano poi gli sclerozi che ritorneranno nel terreno per il periodo di riposo che può variare da qualche settimana ad alcuni anni prima che gli sclerozi si riattivino con le adeguate condizioni ambientali.

Gli sclerozi sono le strutture che consentono alle specie appartenenti al genere *Sclerotinia* di sopravvivere per lunghi periodi di tempo anche in condizioni avverse. La crosta nera dello sclerozio sembra fungere da protezione contro l'invasione da parte di altri microrganismi.

Temperatura, pH e umidità hanno scarso effetto sulla sopravvivenza degli sclerozi anche se sembra che alte temperature e alta umidità favoriscano il degrado degli sclerozi vicini alla superficie del terreno. Alcuni microrganismi del suolo possono avere un effetto negativo sugli sclerozi; *Coniothyrium minitans* e alcune specie del genere *Trichoderma* sono considerati come micoparassiti distruttivi di *Sclerotinia spp*, capaci di attaccare gli sclerozi e/o il micelio, questa attività litica è attribuita alla secrezione di α -1,3 glucanasi di *C. minitans* che degrada le ife di *Sclerotinia spp*. (Punithalingam, 1982).



Fig. 3: Colonia di *Sclerotinia sclerotiorum* con sclerozi allevata in piastra Petri.

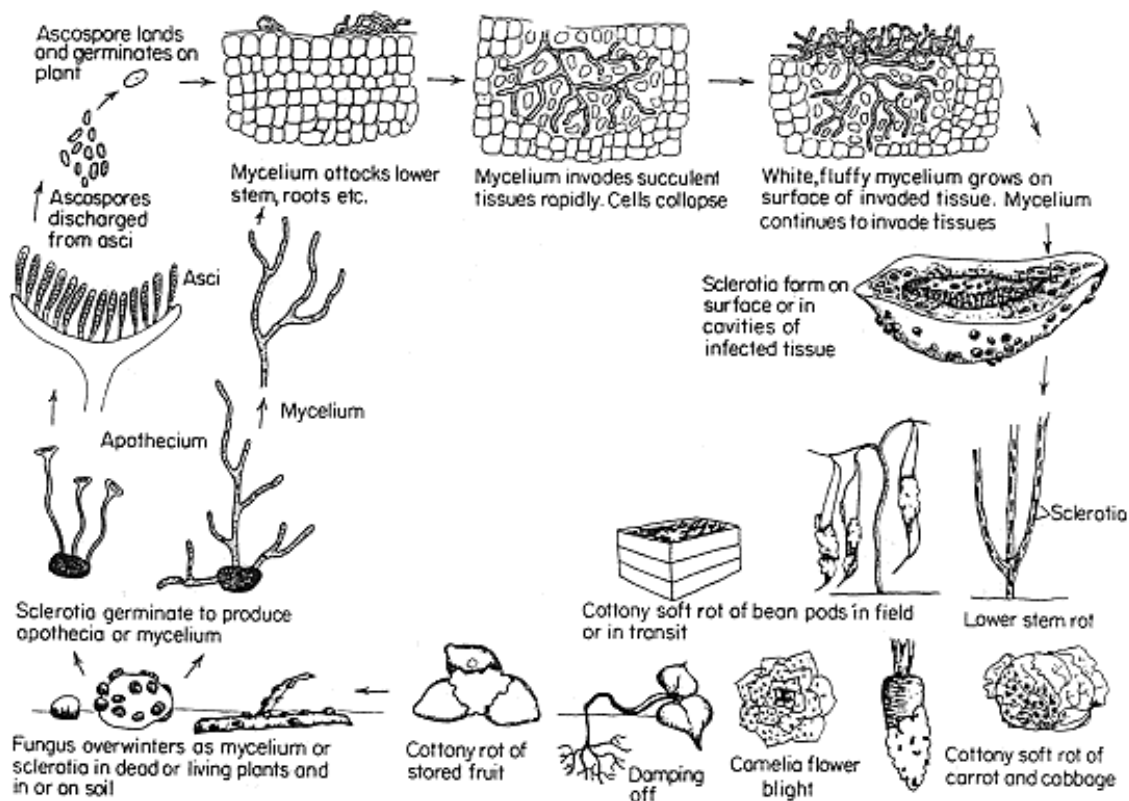


Fig. 4: Ciclo vitale di *Sclerotinia sclerotiorum* su ortaggi e fiori (Agrios, 2005)

Le ascospore sono i più importanti mezzi di diffusione di *S. sclerotiorum*. Anche gli sclerozi sviluppatisi sul micelio biancastro possono causare infezione, ma di solito questo tipo di infezione rimane circoscritta all'interno di una zona. Lo spostamento di terreno contaminato (con attrezzature agricole, scarpe e piante infette) e la concimazione con letame di animali nutriti con residui vegetali infetti, sono due mezzi di diffusione di sclerozi e micelio. Anche l'irrigazione ha dimostrato essere responsabile della diffusione di sclerozi da un appezzamento all'altro. Infine anche le sementi possono costituire una fonte d'infezione, sia per la presenza di sclerozi che di micelio. Evitare l'accumulo di umidità sotto e tra il fogliame delle colture sensibili è un modo per contrastare le infezioni. Avere una spaziatura maggiore tra le piante aiuta a ridurre l'umidità. La rotazione delle colture è una pratica efficace per combattere molte malattie, tuttavia non dà risultati soddisfacenti nel caso di *S. sclerotiorum* a causa della estrema longevità degli sclerozi nel suolo. Questa malattia è presente in tutte le aree di coltivazione del carciofo, ove normalmente si ripresentano nel

corso di ciascun ciclo colturale le condizioni ambientali favorevoli alle infezioni (Amenduni et al., 2006).

1.2.4 ASPETTI MOLECOLARI DELLA PATOGENICITA'

S. sclerotiorum è un fungo capace di infettare un ampio raggio di piante ospiti. Tutte le specie di *Sclerotinia* sono necrotrofe in quanto sono capaci di uccidere le cellule ospiti durante il processo di infezione. Più di 120 anni fa De Bary (1866) osservò che le cellule di carota venivano uccise precocemente dalle ife sul fronte di avanzamento. Inoltre notò che il fluido ricavato dal tessuto marcescente di carota era capace di degradare il tessuto sano, mentre il fluido bollito non aveva alcun effetto. Queste osservazioni sperimentali portarono a concludere che il fungo era capace di produrre enzimi litici termolabili che degradavano le cellule vegetali.

S. sclerotiorum è dotato di un set di enzimi e/o metaboliti che rendono il patogeno in grado di invadere il tessuto ospite, uccidere le cellule ed eventualmente convertire il tessuto ospite in biomassa fungina. Molti di questi enzimi (Endo-eso poligalatturonasi = PG, Pectiniasi = PNL, Pectin Metil Esterasi = PME, cellulasi, proteasi ecc.) e metaboliti tossici (acido ossalico) agiscono extracellularmente nell'interfaccia pianta-fungo o anche nei tessuti dell'ospite a distanza dall'apice ifale. Essi sono considerati dei fattori di patogenicità, cioè molecole che causano danno all'ospite e permettono quindi di caratterizzare il quadro di malattia ed al patogeno il suo ciclo vitale (Magro and Marciano, 1984; Marciano *et al.*, 1983; Poussereau *et al.*, 2001).

Molti funghi, inclusa *S. sclerotiorum*, producono acido ossalico in coltura e nei tessuti infetti (Dutton and Evano, 1996; Magro *et al.*, 1984; Marciano *et al.*, 1983).

La produzione di questa molecola contribuisce alla patogenicità del fungo in modo molto vantaggioso in quanto determina una drammatica acidificazione dei tessuti dell'ospite realizzando valori di pH che sono ottimali per la degradazione delle pareti cellulari da parte delle poligalatturonasi fungine. Essa contribuisce inoltre alla rimozione del calcio dalle pareti cellulari della pianta. La cattura del calcio da parte dell'acido ossalico può interrompere nelle cellule il sistema dei segnali Ca^{++} . Il ruolo dell'ossalato nel prevenire l'attivazione dei processi ossido-riduttivi che sostengono i meccanismi di difesa nella pianta è evidenziato dalle ricerche di Cessna *et al.* (2000).

L'acido ossalico può legarsi direttamente anche al rame e, quindi, può influenzare negativamente il funzionamento delle proteine contenenti rame, come le fenolasi che hanno rame nel centro attivo (Sato, 1980).

1.2.5 CONTROLLO DELLA MALATTIA

Le malattie causate da *S. sclerotiorum* sulle diverse piante ospiti sono tradizionalmente considerate molto difficili da controllare. Le principali colture agrarie colpite da questo patogeno non posseggono alti livelli di resistenza.

I coltivatori di soia possono contare su genotipi parzialmente resistenti a *Sclerotinia spp.*, ma non ci sono oggi genotipi completamente resistenti a *S. sclerotiorum* (Boland and Hall, 1987; Kim and Diers, 2000). Lo studio della resistenza in campo è spesso problematico a causa della dipendenza della malattia dalle condizioni ambientali, inoltre è difficile distinguere gli effetti della resistenza con i meccanismi di fuga fisiologici, anch'essi associati alla gravità della malattia. Marcatori strettamente legati ai geni per la resistenza a *S. sclerotiorum* sono stati trovati oltre che nella soia anche in altre colture come il girasole, il fagiolo e la colza (Arahana *et al.*, 2001; Bert *et al.*, 2004; Kolkman and Kelly, 2003; Zhao and Meng, 2003). Diversi fungicidi sono stati usati con successo su soia, fagioli, colza ed altri vegetali (Budge and Whipps, 2001; Del Rio *et al.*, 2004; Twengstrom *et al.*, 1998). In alcune colture la resistenza a *S. sclerotiorum* è correlata alla resistenza all'acido ossalico, infatti una strategia di difesa contro questo patogeno in coltura è l'uso di transgeni che degradano l'acido ossalico prodotto da *S. sclerotiorum* (Kolkman and Kelly, 2000; Wegulo *et al.*, 1998). E' stato scoperto un gene nel frumento che codifica per una ossalato ossidasi la quale catalizza l'ossidazione dell'acido ossalico in ossigeno molecolare con emissione di CO₂ e H₂O₂ (Lane *et al.*, 1993). Per quanto riguarda la resistenza, il perossido d'idrogeno è conosciuto per essere coinvolto nella risposta ipersensibile (HR) (Levine *et al.*, 1994; Wojtaszek, 1997). H₂O₂ è un composto direttamente tossico per il patogeno ed inoltre è coinvolto nell'accumulo di acido salicilico, una importante molecola di segnalazione nella resistenza sistemica acquisita (SAR) (Gaffney *et al.*, 1993). Ossalato ossidasi e altri enzimi che degradano l'acido ossalico sono stati inseriti sperimentalmente in diverse importanti colture come soia, girasole, arachidi e hanno dimostrato una maggiore resistenza a

Sclerotinia spp. Uno degli svantaggi di questa tecnica è la possibilità di fuga dei transgeni in piante infestanti che potrebbero far comparire così delle specie infestanti più invasive delle attuali.

Il controllo biologico di *Sclerotinia spp.* è considerato una strategia di lotta alternativa alle tradizionali. In particolare gli sclerozi di questo patogeno possono essere attaccati da micoparassiti come *C. minitans* e *Sporidesmium sclerotivorum* (Ayers and Adams, 1981).

C. minitans è stato ritrovato negli sclerozi di *S. sclerotiorum* e si suppone che questo micoparassita sia in grado di ridurre la sopravvivenza degli sclerozi. (Huang *et al.*, 2000; Huang and Erickson, 2008). Per ridurre la pressione sull'ambiente fatta dall'uso sempre maggiore di prodotti chimici per la lotta contro i patogeni delle piante, il controllo biologico è tuttora un argomento interessante per la ricerca; ciò al fine di fornire ai coltivatori almeno un prodotto commerciale, a base di micoparassiti, per il biocontrollo di *S. sclerotiorum* (Del Rio *et al.*, 2002; Jones and Whipps, 2002; Reeleder, 2004).

1.3 RESISTENZA DELL'OSPITE ED ATTIVAZIONE DEI MECCANISMI DI DIFESA

Per resistenza s'intende la capacità di evitare, contrastare o tollerare gli effetti di uno stress biotico o abiotico, essa è la conseguenza di una interazione molecolare complementare (Keen, 1990).

Le piante in natura sono continuamente sottoposte all'attacco di vari organismi che si nutrono sia della loro parte aerea che degli organi ipogei. Per difendersi hanno sviluppato, durante l'evoluzione, tutta una serie di meccanismi che tendono a riconoscere precocemente la presenza del patogeno e ad attivare la sintesi di composti di difesa antimicrobici.

Molte piante sono resistenti alla maggior parte dei patogeni, per cui la comparsa dell'infezione è un'eccezione. La malattia è la manifestazione 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".

La teoria nota come "gene per gene" ha cercato di spiegare gli aspetti genetici di questa interazione che determina la specificità ospite-patogeno (Flor, 1971; Keen, 1990; Staskawicz *et al.*, 1996). Il riconoscimento dei patogeni nelle piante è spesso determinato da singoli geni *R* (di resistenza), mentre il gene corrispondente nel patogeno è chiamato "gene *avr*" (di avirulenza). L'interazione "gene *R* per gene *avr*" è basata sulla specificità dell'interazione stessa nel caso di assenza di riconoscimento (assenza di gene *R* o *avr*) si manifesta la malattia.

Affinché si verifichino resistenza o immunità, la pianta deve essere portatrice del gene *R* e il patogeno deve essere portatore del gene *avr*. 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. Da un punto di vista biochimico, i geni *R* codificano proteine in grado di riconoscere prodotti diretti o indiretti di un gene *avr* del patogeno (chiamati generalmente "elicitore").

Tutte le altre combinazioni, con l'assenza dell'elicitore o del recettore, impediscono il riconoscimento del patogeno da parte della pianta e comportano il mancato avvio dei meccanismi di difesa con la manifestazione della malattia (Lucas, 1998).

I geni *avr* del patogeno, invece, 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.

Sebbene il prodotto del gene *avr* sia spesso chiamato “elicitore” perché provoca una risposta di difesa antimicrobica, ci sono molti altri elicitori non codificati da classici geni *avr*, come ad esempio prodotti del metabolismo batterico, frammenti di parete dei funghi, sottoprodotti dei danni o delle risposte delle cellule vegetali, o ancora trattamenti chimici o stress, che imitano l'impatto degli elicitori sulle cellule vegetali (ad es. ozono o UV-C), anche in assenza di patogeni e aumentano in tal modo i sistemi di protezione naturale della pianta (Lucas, 1998).

Il riconoscimento specifico ospite-patogeno e la percezione degli stimoli abiotici possono stimolare l'ospite ad organizzare reazioni di difesa di diverso tipo.

Il riconoscimento pianta-patogeno avviene tra recettori posti sulla membrana della cellula vegetale e composti “elicitori”, derivanti ad esempio dall'idrolisi della propria parete, conseguente alla produzione di enzimi litici da parte del patogeno, o mediante sostanze che si liberano dal patogeno stesso. Questo fatto determina nelle cellule contigue al punto di invasione l'attivazione di un' enzima situato nella membrana cellulare, in grado di produrre molecole che innescano lo “scoppio ossidativo” e composti con forte potere ossidante, avviando una vera e propria morte cellulare programmata, detta risposta di ipersensibilità (Hypersensitive Response, HR), che tende a fare terra bruciata intorno al parassita, impedendone la moltiplicazione e conducendolo a morte (Matta, 2000).

In aggiunta alla risposta primaria, rappresentata soprattutto dalla HR, molte piante attivano una serie di meccanismi generali di difesa che coinvolgono tutti i tessuti vegetativi, arrivando così ad una “resistenza sistemica acquisita” (Systemic Acquired Resistance, SAR) (Sticher *et al.*, 1997; Metraux, 2001; Gozzo, 2003; Durrant and Dong, 2004). Si tratta di un fenomeno molto diffuso nei vegetali e ultimamente molto studiato. La sua attivazione può essere stimolata da attacchi di patogeni e di insetti o da attivatori chimici, ma anche da attivatori abiotici: ferite, stimoli elettrici, composti inorganici, acidi grassi, oligomeri, peptidi, fitofarmaci, regolatori di crescita, oli minerali ecc. Vi sono poi una serie di composti di sintesi in grado di indurre la SAR tra cui acilbenzolar-S-methyl (BTH), acido β -aminobutirrico (BABA), l'acido 2,6-dicloro isonicotinico (INA) e fosfato monopotassico.

La HR e la SAR portano all'attivazione di una varietà di geni di difesa inducibili, con sintesi ed accumulo di composti normalmente mancanti nei tessuti vegetali sani, o presenti costitutivamente solo a bassi livelli (Hammond-Kosack and Jones, 1996; Keen, 1990).

Un altro tipo di reazione di difesa è la resistenza localizzata acquisita (Localized Acquired Resistance, LAR) che si concretizza in intense alterazioni metaboliche nelle cellule adiacenti al sito d'infezione che circondano la zona di morte cellulare causata dalla HR (rafforzamento delle pareti mediante deposizione e legami tra polisaccaridi, proteine, glicoproteine e fenoli insolubili; produzione di fitoalessine e stimolatori come SA, Et (etilene), metaboliti lipidici; accumulo di proteine PR e peptidi) (Kauffmann *et al.*, 1987): da queste reazioni si dovrebbe ottenere la compartimentazione del patogeno.

Infine la resistenza sistemica indotta (Induced Systemic Resistance, ISR) è un fenomeno di resistenza indotta dall'interazione asintomatica tra rizobatteri, funghi micorrizogeni e pianta (Pozo *et al.*, 2004; Vallard and Goodman, 2004).

Nella SAR dopo poche ore dalla necrosi localizzata, la pianta comincia ad esprimere una serie di geni correlati alla patogenesi ed i relativi prodotti genici (proteine di resistenza, PR) sia localmente, nel punto di infezione, sia sistemicamente in tutto il resto della pianta, nei tessuti distali.

Tra gli enzimi implicati nella risposta di difesa della piante, le perossidasi, le β -glucanasi e le chitinasi giocano un ruolo chiave. Le attività di β -glucanasi e chitinasi sono correlate con la resistenza della pianta in quanto i loro substrati, β -1,3-glucano e chitina, sono i principali componenti della parete cellulare di molti funghi patogeni e vanno a degradare le giovani ife fungine durante la loro penetrazione nei tessuti dell'ospite. Le perossidasi invece sono implicate in numerosi processi fisiologici: metabolismo dell'auxina, biosintesi dell'etilene, formazione della lignina, meccanismi di crescita e senescenza (Penel *et al.*, 1992). Considerando che la parete cellulare costituisce la prima linea di difesa all'attacco degli organismi patogeni e che le perossidasi sono enzimi determinanti nei processi di costruzione e rafforzamento della parete (Fry, 1986), è evidente che esse svolgano un ruolo attivo nei meccanismi di difesa delle piante. I processi che le vedono impegnate includono l'ossidazione dei fenoli, la lignificazione, la suberificazione (Rolando *et al.*, 1991); perciò, si ipotizza che isoforme acide extracellulari di perossidasi libere o legate alle pareti possano aumentare la resistenza mediante la costruzione o il rafforzamento delle barriere fisiche.

Oggi gran parte dei trattamenti antiparassitari sulle colture hanno solo una funzione preventiva, che può risultare inutile e quindi costosa e dannosa in assenza di reali attacchi.

L'utilizzo, invece, di composti chimici che stimolano dei processi di autodifesa (cosiddetti induttori di resistenza), distribuiti in maniera opportuna (riescono, infatti, ad esplicare la loro azione anche a bassissime concentrazioni) dopo un'attenta analisi dell'areale di coltivazione, può permettere di avere in campo piante dotate di sistemi di protezione naturale e quindi capaci di autodifendersi anche in assenza di patogeni.

Le cellule delle piante attaccate da un agente patogeno sintetizzano un gran numero di composti in grado di svolgere un ruolo protettivo nella difesa dei tessuti vegetali, fra queste si annoverano:

- le fitoalessine: sono molecole con basso peso molecolare dotate di proprietà antimicrobiche e tossiche nei confronti di alcuni funghi e batteri fitopatogeni (De Witt, 1987; Darvill e Albersheim, 1984; Hammerschmidt, 1999);
- gli inibitori di proteasi, che agiscono contro batteri ed insetti probabilmente inattivando i loro enzimi digestivi (Ryan, 1992);
- le proteine di patogenesi (Pathogenesis-Related PR) che vengono sintetizzate in seguito a stress biotici o abiotici (Van Loon, 1985; Boller, 1987; Carr e Klessing, 1989; Bol *et al.*, 1990; Lamb and Dixon, 1990; Linthorst, 1991).

1.4 PROTEINE DI PATOGENESI (PR)

Nelle interazioni piante ospite-patogeno i danni causati dal patogeno sono limitati in virtù delle rapide risposte di difesa messe in atto dalla pianta nella fase del riconoscimento. Le proteine collegate alla patogenesi (“Pathogenesis-Related Proteins”, PRs), rappresentano un importante aspetto dei meccanismi di difesa della pianta. Sono proteine codificate dalla pianta ed indotte in maniera specifica quando essa è attaccata da un patogeno o è sottoposta ad uno stress, che può essere anche abiotico. Una loro peculiarità è quella di venire indotte e prodotte non solo localmente, nel punto in cui ha operato lo stress, ma anche nel resto della pianta perciò si ritengono associate alla resistenza sistemica acquisita (SAR). L’induzione delle proteine PR è stata riscontrata in diverse specie vegetali, appartenenti a famiglie tassonomicamente differenti e ciò fa supporre che tali proteine abbiano un ruolo importante e generalizzato nella difesa delle piante dai patogeni (Van Loon e Van Strien, 1999).

Originariamente in tabacco vennero caratterizzate cinque principali classi di PRs, successivamente, nel 1994, venne proposta una nomenclatura unificatrice basata sulla suddivisione di queste proteine in famiglie, aventi la medesima sequenza aminoacidica, le stesse caratteristiche biochimiche e sierologiche nonché identiche attività enzimatiche e biologiche (Van Loon *et al.*, 1994). Attualmente sono suddivise in 17 famiglie (Van Loon *et al.*, 2006).

FAMIGLIE	PROPRIETA'
PR-1	antifungina
PR-2	β 1-3 glucanasi
PR-3	chitinasi di tipo I,II,IV, V, VI, VII
PR-4	chitinasi di tipo I, II
PR-5	antifungine, proteine taumatina-simili, osmotine, zeamantine, permeatine, proteine simili agli inibitori di tripsina / α amilasi.
PR-6	inibitore di proteinasi
PR-7	endoproteasi
PR-8	chitinasi di tipo III
PR-9	perossidasi
PR-10	ribonucleasi
PR-11	chitinasi di tipo I
PR-12	defensine
PR-13	tionine
PR-14	proteine di trasferimento di lipidi
PR-15	ossalato ossidasi
PR-16	ossalato ossidasi-simile
PR-17	proteasi

Tab. 2: Schema famiglie di proteine PR con le rispettive proprietà.

Proteine PR-1

Sono proteine di 15-17 kDa, rappresentano un gruppo consistente indotto da patogeni e dall'acido salicilico e, di conseguenza, sono frequentemente utilizzate come marcatori per la SAR; attualmente ne è sconosciuta la funzione biologica, anche se sono state studiate dal punto di vista molecolare per diverso tempo. Possono raggiungere concentrazioni del 2% nei tessuti infettati (Alexander *et al.*, 1993). Esistono sia isoforme acide che basiche (Antoniw *et al.*, 1980; Matsuoka e Ohasi, 1984). Le PR-1 espletano attività antifungina a concentrazioni micromolari, sia *in vitro* che *in planta*. Esperimenti in piante transgeniche di tabacco hanno

dimostrato che in presenza di alti livelli di PR-1 c'è una significativa riduzione di sintomi di malattia causata da *Peronospora tabacina* o da *Phytophthora infestans* var. *nicotianae* (Niderman *et al.*, 1995). Il loro accumulo postinfettivo è stato rilevato in riso, frumento, mais, tabacco, *Arabidopsis thaliana* e in molte altre specie vegetali. Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, è stato ipotizzato che l'attività antifungina si esprima attraverso l'interazione con proteine associate ai canalicoli del calcio (Ca^{2+}) (Selitrennikoff, 2001).

Proteine PR-2

Le proteine appartenenti a questa famiglia sono molto diffuse nel mondo vegetale infatti a tale classe appartengono importanti proteine enzimatiche con attività idrolitica, le endo- β -1,3-glucanasi (β -Glu) (Shewry and Lucas, 1997; Yun *et al.*, 1997). Hanno un peso molecolare compreso tra i 25 e i 35 kDa, sono in grado di catalizzare il taglio idrolitico dei β -1,3-glucani, molecole abbondanti nella parete cellulare vegetale e in quella dei funghi. Sono raggruppate in due gruppi: le glucanasi del gruppo I (proteine basiche a localizzazione vacuolare), le glucanasi del gruppo II (acide a localizzazione apoplastica). Sono state trovate in numerose piante e *in vitro* hanno attività antifungina contro funghi di vario tipo (Breiteneder, 2000; Selitrennikoff, 2001). L'espressione dei geni che codificano per queste proteine è indotta da stress, ormoni (Felix e Meins, 1987) ed elicitori fungini (Lamb *et al.*, 1989).

Le β -Glucanasi possono rilasciare, dalla parete cellulare dei patogeni, oligosaccaridi che agiscono come segnali elicitori delle difese della pianta (Boller, 1995; Darvill and Albersheim, 1984). È noto che i β -1,3-glucani sono il principale componente parietale degli oomiceti; sembra dunque che l'azione delle PR-2 possa venire diretta particolarmente contro questa classe di patogeni.

Proteine PR-3

A questa famiglia appartengono enzimi della categoria delle chitinasi. Sono enzimi che idrolizzano la chitina, componente principale dell'esoscheletro degli insetti e della parete cellulare dei funghi. Tutte le chitinasi sono state raggruppate in 7 classi, denominate da I a VII, in base alla sequenza amminoacidica e le PR-3 sono riferite alle classi I, II e IV. Queste chitinasi hanno dimostrato di avere attività antifungina *in vitro* verso *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Botrytis cinerea* (Selitrennikoff, 2001; Hoffmann - Sommergruber, 2002).

Proteine PR-4

Hanno un peso molecolare che varia da 13 a 15 kDa. Vengono distinte in 2 classi in base alla presenza o assenza di un dominio N-terminale ricco di cisteina. Hanno mostrato una potente attività antifungina contro molti patogeni e si pensa che esse operino attraverso il legame con la chitina della parete ifale in accrescimento alterando la polarità cellulare e bloccando la crescita dell'ifa (Selitrennikoff, 2001; Hoffmann-Sommergruber, 2002). Molte PR-4 sono state isolate da cereali, tra queste quelle isolate da semi di orzo e quelle isolate da foglie di orzo infettate con *Erysiphe graminis* (Hejgaard *et al.*, 1992). Sia la proteina purificata da orzo che le proteine purificate da frumento, sono dotate di attività antifungina nei confronti di svariati funghi fitopatogeni (Hejgaard *et al.*, 1992; Caruso *et al.*, 1996).

Proteine PR-5

Tutte le proteine da patogenesi della famiglia PR-5 presentano una sequenza aminoacidica simile a quella della taumatina, tra le proteine che appartengono a questa famiglia ci sono anche l'osmotina, la NP24 e la zeamatina (King *et al.*, 1988; Roberts e Selitrennikoff, 1990). Sono state trovate in foglie di varie piante, come *A. thaliana*, soia, riso, frumento, tabacco, pomodoro, fagiolo e molte altre; esse si accumulano rapidamente nella pianta a seguito di stress biotici e abiotici e hanno un ruolo nella difesa della pianta. Infatti, presentano forte attività antifungina ed è stato ipotizzato il meccanismo d'azione consista nel loro inserimento nella membrana cellulare del fungo a formare un poro transmembrana causa di perdita di acqua ed elettroliti cui segue la lisi cellulare (Selitrennikoff, 2001; Hoffmann-Sommergruber, 2002).

Piante transgeniche di patata che esprimono costitutivamente alti livelli di osmotina mostrano una maggiore resistenza nei confronti di *Phytophthora infestans* (Liu *et al.*, 1993).

Proteine PR-6 e PR-7

Le proteine appartenenti alla famiglia delle PR-6 sono degli inibitori di proteinasi e possono essere coinvolte nella difesa della pianta contro insetti ed altri erbivori, vari microrganismi e nematodi. Quelle appartenenti alla famiglia delle PR-7 invece sono endoproteinasi e sembra che il meccanismo d'azione consista nella degradazione di proteine della parete cellulare.

Proteine PR-8 e PR-11

Le proteine di questa famiglia sono delle chitinasi. Della famiglia PR-8 fanno parte chitinasi di III classe, mentre della famiglia PR-11 fanno parte chitinasi di classe I (Van Loon e Van Strien, 1999).

Proteine PR-9

Le proteine appartenenti a questa famiglia sono state ben studiate e biochimicamente caratterizzate. A tale famiglia appartengono le perossidasi, ovvero ossidoreduttasi che utilizzano il perossido di idrogeno per l'ossidazione di substrati organici e inorganici; sono enzimi importanti coinvolti nella difesa delle piante, oltreché nello sviluppo e nella crescita. Le perossidasi delle piante sono implicate in numerosi processi fisiologici: metabolismo dell'auxina, biosintesi dell'etilene, formazione della lignina, meccanismi di crescita e senescenza (Gaspar *et al.*, 1982), in particolare, le per ossidasi incluse nelle PR-9 sono coinvolte nella formazione della lignina per l'ispessimento della parete cellulare e nei processi ossidativi attivati in seguito all'invasione di un patogeno (Breiteneder, 2000).

Cambiamenti nell'attività delle perossidasi durante le reazioni di resistenza e suscettibilità sono stati osservati in molte interazioni pianta-patogeno. Ad esempio, incrementi in attività perossidasi sono stati osservati nelle reazioni di resistenza in riso, frumento, orzo e cotone (Reimers *et al.*, 1992; Flott *et al.*, 1989; Kerby *et al.*, 1992, Caruso *et al.*, 2001).

La superfamiglia delle perossidasi delle piante è suddivisa in tre classi; della I classe fanno parte isoforme intracellulari, della II classe le perossidasi fungine, mentre nella III classe ci sono molte isoforme extracellulari. Le piante possiedono un numero molto elevato di geni che codificano per le perossidasi, ma solo pochi di essi sono espressi in risposta a patogeni.

Proteine PR-10

Le proteine che fanno parte della famiglia delle PR-10 sono riferibili a delle ribonucleasi. Questo tipo di proteine è stato isolato in molte piante, (asparago, prezzemolo, fagiolo, pisello, patata e melo) quelle estratte dal ginseng hanno mostrato di avere attività ribonucleasica. Sono codificate da una famiglia genica, designata *Ypr10* da Van Loon e Van Strien (1999) e molti di questi geni vengono attivati in seguito all'attacco di patogeni, al contatto con elicitori fungini, a ferite e altri stress (Hoffmann-Sommergruber, 2002).

Proteine PR-12

Le proteine di questa famiglia sono anche dette defensine, sono state isolate da diverse specie vegetali, queste sono piccoli peptidi (45-54 amminoacidi) con 8 cisteine, 2 glicine, un residuo aromatico e un residuo di acido glutammico altamente conservati (Broekaert *et al.*, 1995). Sono importanti nei meccanismi di difesa della pianta per la loro azione protettiva sui semi nei primi stadi della germinazione e perché alcuni membri di questa famiglia sono in grado di inibire la crescita di funghi fitopatogeni. E' stato osservato che semi di rafano infettati con un fungo patogeno rilasciavano una defensina dotata di attività antifungina. Inoltre piante transgeniche che esprimono alti livelli di questa proteina hanno mostrato una maggiore resistenza ad *Alternaria longipes* (Terras *et al.*, 1995).

Proteine PR-13

Di questa famiglia fanno parte le tionine che sono proteine basiche ricche in cisteina, hanno un basso peso molecolare (5 kDa), e nel corso dei vari studi sono state identificate sia in dicotiledoni che in monocotiledoni. Sono raggruppate in 4 classi sulla base della sequenza amminoacidica. Tutte le tionine hanno mostrato una discreta attività antifungina *in vitro*.

Proteine PR-14

Le proteine che fanno parte della famiglia delle PR-14 sono chiamate proteine per il trasferimento dei lipidi dato che trasferiscono fosfolipidi dai liposomi ai mitocondri; sono proteine di 9 kDa localizzate nella parte esterna della membrana mitocondriale. Sono proteine largamente distribuite nel regno vegetale (Breiteneder, 2000).

Proteine PR-15 e PR-16

Queste due famiglie di proteine PR sono tipiche delle monocotiledoni e comprendono proteine riferibili ad ossalato ossidasi ed ossalato ossidasi con attività superossido dismutasica; generano perossido di idrogeno potenzialmente tossico direttamente sul patogeno od indirettamente come attivatore di risposte di difesa nella pianta (Van Loon *et al.*, 2006).

Proteine PR-17

Questa famiglia di proteine di patogenesi è stata scoperta in tabacco, frumento ed orzo; sembra che la funzione chimica sia simile a quella delle proteinasi, anche se ufficialmente la funzione è sconosciuta (Van Loon *et al.*, 2006).

1.5 PRINCIPALI INDUTTORI DI RESISTENZA

Le sostanze chimiche riconosciute dalla pianta e che ne inducono le reazioni di difesa vengono chiamate induttori di resistenza. Essi promuovono nella pianta meccanismi di difesa in grado di proteggerla dagli attacchi di microrganismi patogeni, senza peraltro produrre reazioni di ipersensibilità. Inoltre, tali induttori sono in grado di agire anche in assenza dell'agente patogeno.

I più importanti induttori di resistenza sono il benztiodiazolo (BTH), l'acido β -aminobutirrico (BABA) e vari fosfati.

Il BTH è un analogo funzionale di SA e, pertanto, come quest'ultimo, è in grado di attivare i meccanismi di resistenza legati a SAR. Tuttavia, mentre il trattamento per via esogena di SA determina fitotossicità ed induce una resistenza locale, BTH, al contrario, è perfettamente tollerato dalle piante alle comuni dosi di impiego, attivando una resistenza di tipo sistemico. Inoltre è immediatamente metabolizzato, quindi non lascia residui ed ha impatto ambientale molto basso, se non nullo. BTH si è dimostrato in grado di indurre la SAR (Dann and Deverall, 2000; Matta and Gullino, 1997; Sticher *et al.*, 1997), con o senza l'associazione di altri attivatori chimici o di origine fungina (Kästner *et al.*, 1998).

BTH è attivo contro una vasta gamma di patogeni batterici, fungini e virali, oltre che di insetti e nematodi. L'azione protettiva è stata osservata specificamente in pieno campo su molte colture, quali pomodoro e specie da frutto; in generale, nelle monocotiledoni l'effetto di BTH è più durevole rispetto a quello osservato nelle dicotiledoni (Oostendorp *et al.*, 2001).

E' stato osservato che l'acido β -ammino butirrico (BABA) è in grado di attivare risposte di difesa verso i mal bianchi quando viene usato ad alte concentrazioni (Oostendorp *et al.*, 2001). Il BABA è un amminoacido non proteico riscontrato raramente in natura. Assai simile ad esso è l'acido γ -ammino butirrico, un neurotrasmettitore nel sistema nervoso degli organismi animali. Benché si trovi molto raramente nelle piante, è risultato essere un potente induttore di resistenza. Già 50 anni or sono, è stata riportata la sua azione protettiva su piante di pisello nei confronti del fungo oomicete *Aphanomyces euteiches* (Papavizas e Davey, 1963; Papavizas, 1964).

Il BABA agisce aspecificamente contro molti organismi patogeni (virus, batteri, funghi, nematodi); non presenta attività antimicrobica diretta e ciò supporta l'ipotesi che la sua funzione si espleti nell'indurre risposte di difesa nella pianta (Jakab *et al.*, 2001).

Le modalità di azione di questa sostanza non sono state ancora chiarite. E' stato rilevato che in pomodoro si ha induzione della proteina PR-1 quando viene applicato ad alte concentrazioni (Oostendorp *et al.*, 2001).

.

2. OBIETTIVI DELLA TESI

In quest'ultimo decennio numerose ricerche condotte su diversi tipi di piante hanno dimostrato l'efficacia dei cosiddetti induttori di resistenza nell'influenzare la capacità di difesa della pianta nei confronti di alcune malattie mediante il conseguimento di una condizione fisiologica di potenziamento delle difese denominata "primed state" con quest'ultima le piante sono capaci di attivare la risposta di resistenza, sia agli stress biotici che abiotici, in modo migliore o più rapido (Conrath *et al.*, 2002; Conrath *et al.*, 2006; Goellner and Conrath, 2008). Ad esempio per quanto riguarda i cereali diverse ricerche hanno dimostrato l'efficacia degli induttori di resistenza, in particolar modo di BABA e BTH (Stadnik *et al.*, 2000; Oka *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001; Roldàn Serrano *et al.*, 2007). BABA è stato usato con successo su vite contro *Plasmopara viticola* (Gohen *et al.*, 1999), cavolfiore contro *Peronospora parasitica* (Siluè *et al.*, 2002), nel tabacco contro il virus del mosaico del tabacco (TMV) (Siegrist *et al.*, 2000). Anche per altre specie orticole come cocomero, melone, ecc. sono note prove di induzione di resistenza (Oostendorp *et al.*, 2001; Buzi *et al.*, 2004). Allo stato attuale non esistono informazioni riguardanti l'uso di induttori di resistenza su piante della vasta famiglia delle *Compositae* e in questo lavoro si affronta per la prima volta l'argomento dell'induzione di resistenza su carciofo.

Questa tesi si propone di esaminare alcuni aspetti fisiopatologici dell'interazione Carciofo - *Sclerotinia sclerotiorum*, con l'approfondimento delle conoscenze su attività biochimico-fisiologiche che sostengono la resistenza costitutiva ed indotta di alcune varietà di carciofo.

In questo lavoro di ricerca sono stati individuati tre obiettivi fondamentali che sono stati raggiunti attraverso una serie di tappe sperimentali intermedie:

obiettivo 1: verificare la resistenza del carciofo alle principali fitopatie

Prima tappa di questa ricerca è stata quella di verificare la "resistenza costitutiva" del carciofo ai principali parassiti fungini misurando il grado di resistenza ai parassiti fungini più comuni nell'areale laziale, di diverse varietà (tradizionali e di nuova costituzione) di carciofo, in condizioni naturali e anche a seguito di inoculazione artificiale con *S. sclerotiorum*. A questo proposito nel periodo primaverile sono stati effettuati monitoraggi della condizione sanitaria delle

varietà di carciofo in pieno campo ed in contemporanea sono stati raccolti ed elaborati i relativi dati climatici.

obiettivo 2: comparare prodotti con proprietà di induttori della resistenza

Nell'ambito del tema della “resistenza indotta” ha rivestito particolare importanza verificare la capacità di alcune sostanze definite induttori chimici di resistenza (BABA=acido β -aminobutirrico, BTH=acybenzolar-s methyl e KH_2PO_4 =fosfato monobasico di potassio) di indurre specifiche risposte di difesa da parte della pianta ed in special modo affrontare ricerche rivolte all'induzione di proteine di patogenesi (PR) di rilevante significato fisiopatologico come marcatori della resistenza quali perossidasi, glucanasi e chitinasi. A tal fine, in seguito a trattamenti con induttori chimici di resistenza ed in seguito a inoculazione con *S. sclerotiorum*, sono stati calcolati gli indici da malattia e prelevati tessuti dalle piante in esame; ciò al fine di verificare la presenza di eventuali proteine PR, prodotte dalla pianta in risposta al trattamento e ritenute significativi marcatori di resistenza.

obiettivo 3: verificare la risposta di “resistenza indotta” delle piante di carciofo in campo

Durante il terzo anno di sperimentazione, per confermare i risultati già ottenuti sulle piantine allevate in cella climatica, sono stati effettuati trattamenti in campo con gli stessi induttori, precedentemente riportati, sulle varietà C3 ed Exploter. Le foglie delle piante trattate e di quelle di controllo prelevate e portate in laboratorio sono state inoculate con *S. sclerotiorum*. Sui tessuti fogliari trattati e non trattati, sani ed inoculati, sono state poi effettuate analisi quantitative e qualitative volte a determinare il contenuto di proteine PR (perossidasi, β 1-3glucanasi e chitinasi).

3. MATERIALI E METODI

3.1 ATTIVITÀ SPERIMENTALI DI CAMPO

Il monitoraggio riguardante gli attacchi dei parassiti del carciofo è stato eseguito presso l'azienda sperimentale dimostrativa ARSIAL di Tarquinia, dove nell'ottobre 2005 è stato impiantato un carciofeto delle dimensioni di 1110 m², costituito da 8 varietà di carciofo. Ogni varietà è stata coltivata nell'appezzamento in 4 parcelle distinte comprendenti ognuna 20 piante.

Durante ogni sopralluogo, dopo un esame generale dell'impianto per definire nell'insieme il suo stato, si è passati ad analizzare, pianta per pianta, la situazione fitosanitaria. Per ogni parcella sono stati raccolti dati utili a calcolare le percentuali di infezione, nonché prelevati dei campioni di materiale vegetale necessari all'identificazione delle patologie riscontrate, mediante isolamenti in laboratorio. Inoltre, per ottenere un quadro completo di informazioni, sono stati accuratamente annotati tutti gli interventi relativi alle concimazioni nonché ai trattamenti effettuati contro parassiti animali (afidi, lumache). Infine, sono stati raccolti ed elaborati i dati climatici registrati dalla capannina meteorologica presente in azienda.

3.2 IDENTIFICAZIONE DEGLI AGENTI PATOGENI

I campioni prelevati in campo (porzioni di foglie, steli o radici) sono stati posti in camera umida, dove, attraverso uno strato di carta bibula imbevuta di acqua, viene a crearsi un ambiente ad umidità elevata e costante, favorevole alla proliferazione fungina.

Una volta sviluppatosi il micelio da questi campioni, sono state svolte indagini microscopiche per il riconoscimento del fungo, attraverso la realizzazione di vetrini ed osservazioni al microscopio ottico tipo "Zeiss Axioskop".

Gli stessi campioni sono stati trattati anche secondo il protocollo necessario per realizzare gli isolamenti in piastra Petri. Innanzitutto, i frammenti hanno subito una sterilizzazione superficiale mediante immersione in una soluzione di acqua ed ipoclorito di sodio (NaOCl) al 2%, per un tempo variabile da 3 a 5 minuti, poi risciacquati più volte con acqua deionizzata, quindi asciugati su fogli di carta bibula sterilizzata in autoclave. Questa operazione viene fatta per eliminare la carica microbica superficiale che potrebbe essere dovuta a residui di terreno o altro e potrebbe compromettere il riconoscimento del vero

responsabile della patologia. Dopodichè gli stessi frammenti sono stati posti in piastre Petri contenenti substrato di coltura composto da PDA (Potato Dextrose Agar) e Streptomicina. Il terreno è stato preparato sciogliendo PDA, sotto forma di polvere, in acqua deionizzata nella dose di 39 g/l, e sterilizzando la soluzione così ottenuta in autoclave alla temperatura di 121°C per 15 minuti. Terminato il processo di sterilizzazione, al substrato, mantenuto alla temperatura di 40-45°C, sono stati uniti 0,06 g/l di Streptomicina.

Il terreno così ottenuto è stato versato nelle piastre, sotto cappa a flusso laminare verticale Heraeus, modello “Hera safe”.

I frammenti di tessuto di carciofo, sono stati sistemati su substrato solidificato, in numero di quattro per ogni piastra, utilizzando lancette e pinzette sterili. Dopo la chiusura con parafilm, le piastre sono state messe ad incubare a 25°C.

Trascorso il tempo necessario alla crescita delle colonie fungine, sono state eseguite osservazioni sulle caratteristiche culturali e morfologiche ed ulteriori specifiche indagini microscopiche per identificare l’agente patogeno; sono state inoltre realizzate foto al microscopio, per agevolare l’identificazione che è avvenuta utilizzando chiavi dicotomiche e mediante un confronto con immagini appartenenti a funghi noti.

Infine, per quanto riguarda le virosi, oltre all’osservazione dei sintomi tipici in campo, si è proceduto a delle analisi su base sierologica per verificare su alcuni campioni l’eventuale presenza del temuto virus dell’avvizzimento maculato del pomodoro (Tomato spotted wilt virus: TSWV). Tali analisi sono state condotte presso il laboratorio del CRA-PAV Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma.

3.3 DETERMINAZIONE DEGLI INDICI DI MALATTIA

Gli attacchi di peronospora nelle parcelle del campo sperimentale di Tarquinia sono stati valutati prelevando dei campioni di foglie delle varietà di carciofo colpiti da *Bremia lactucae*. A soppena pervenuti in laboratorio i campioni sono stati fotografati al fine di ricavare l’indice di malattia, attraverso la percentuale di aree necrotiche. A tale scopo, è stato utilizzato il software “Assess Image Analysis Software for Plant Disease Quantification, Lakhdar Lamari, American Phytopathological Society“. La successiva elaborazione dei dati è stata fatta mediante la formula di McKinney. Invece, per quanto riguarda i marciumi del colletto e le virosi, sono state calcolate le percentuali d’infezione in base al numero di piante colpite sul totale di piante presenti in ogni parcella e poi le

percentuali ottenute dalle 4 ripetizioni di ogni varietà sono state elaborate statisticamente con il test di Tukey.

3.4 MATERIALE VEGETALE

Piantine di carciofo, appartenenti alle varietà C3 ed Exploter, fornite dalla ditta Vitroplant Italia srl, sono state allevate in cella climatica Hotpack modello 317332M alla temperatura di 22 °C, umidità relativa del 70%, e fotoperiodo di 12 ore di buio e 12 ore di luce, in vasi di 10 cm di diametro per 10 cm di altezza, contenenti terriccio come substrato di crescita. Le piante sono state costantemente monitorate ed irrigate.

3.5 CEPPI FUNGINI

Il ceppo S7 di *Sclerotinia sclerotiorum*, utilizzato per inoculare artificialmente le piantine di carciofo, è stato ottenuto nel corso degli isolamenti effettuati da piante di carciofo infette ed è conservato nella micoteca del Dipartimento di Protezione delle Piante dell'Università degli Studi della Tuscia. Per procedere alle inoculazioni il ceppo è stato trasferito su piastre Petri contenenti come substrato di coltura PDA, che sono state poste per 7 giorni in incubatore a 25°C in modo da premettere lo sviluppo del micelio sull'intera superficie del substrato. Alcune delle piastre così ottenute sono state aperte sotto cappa sterile e sulla superficie della piastra con *S. sclerotiorum* sono state depositate cariossidi di frumento, precedentemente sterilizzate. Le piastre sono state di nuovo poste in incubatore a 25°C per altri 5 giorni e al termine di questo periodo le cariossidi risultavano interamente colonizzate dal micelio di *S. sclerotiorum*.

3.6 TRATTAMENTI CON INDUTTORI CHIMICI DI RESISTENZA

3.6.1 IN CELLA CLIMATICA

È stata impostata una prova di induzione di resistenza utilizzando venti piante delle due varietà C3 ed Exploter; a tal fine le piante di ciascuna varietà sono state suddivise in quattro gruppi: tre gruppi di piante sono stati trattati ciascuno con un induttore, mentre il quarto gruppo, esente da trattamento, è stato utilizzato come controllo.

I composti chimici induttori di resistenza utilizzati ed i relativi dosaggi sono di seguito riportati:

- **BTH** (acibenzolar-S-methyl (proposta ISO); acido benzo[1,2,3]tiodiazolo-7-carbotioico S-metil estere (IUPAC); (CGA245704) BION® 50WG, A 9180 A) (Novartis Crop Protection, Greensboro, USA) 50 µM (0,0025 g in 100 ml di acqua).
- **KH₂PO₄** 25 µM (0,34 g in 100 ml di acqua).
- **BABA** (DL-β-AminoButyric Acid) 100 µM (1 g in 100 ml di acqua).

I trattamenti con BTH e KH₂PO₄ sono stati effettuati mediante la nebulizzazione dei composti sull'intera superficie delle foglie; la sospensione di BABA invece è stata usata come trattamento alle radici, irrorando il terreno. Le dosi impiegate rappresentano un adattamento di quelle suggerite dalla letteratura (Ishii *et al.*, 1999, Titone *et al.* 1998, Jakab *et al.* 2001) al fine di limitare gli effetti fitotossici di un eventuale sovradosaggio. Sono stati eseguiti due trattamenti, a distanza di due settimane l'uno dall'altro. Il materiale vegetale, costituito da foglie, è stato raccolto una settimana dopo ciascun trattamento, in modo da consentire agli induttori di essere assorbiti dalla pianta, di entrare in circolo e promuovere la resistenza. Trascorse tre settimane dal secondo trattamento, le piantine, nel numero di tre per ogni blocco, sono state inoculate all'altezza del colletto con cariossidi di frumento, precedentemente colonizzate con l'agente patogeno *S. sclerotiorum*. Dopo cinque giorni dall'inoculo, le piantine sono state rimosse e le foglie ed i colletti, raccolti separatamente, sono stati utili

3.6.2 IN CAMPO

Sono state scelte 20 piante per ciascuna delle 2 varietà (C3 ed Exploter) aventi caratteristiche omogenee di sviluppo, provenienti dalle 4 parcelle nelle quali una stessa varietà si ripete all'interno del carciofeto (5 piante per ogni parcella) e sono state trattate con i 3 induttori di resistenza già citati usando le stesse dosi già adottate per la prova in cella climatica. Delle 20 piante scelte 5 sono state trattate con BTH, 5 con KH_2PO_4 , 5 con BABA e 5 sono state lasciate come controllo. Tutti e tre gli induttori sono stati distribuiti per irrorazione fogliare e le foglie trattate sono state 10 per ogni pianta.

3.7 INOCULAZIONE CON *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

3.7.1 INOCULAZIONE DI PIANTE ALLEVATE IN CELLA CLIMATICA

Le piantine sono state allevate in cella climatica e precedentemente trattate, dopo una settimana dall'ultimo trattamento, sono state inoculate con *S. sclerotiorum*. Le cariossidi di frumento colonizzate dal fungo sono state poste a contatto con il colletto della piantina. Dopo l'inoculazione si è proceduto al monitoraggio giornaliero per 5 giorni ed alla raccolta di dati relativi ai sintomi di malattia che comparivano sulle piantine. Con questi dati sono state impostate delle classi di malattia attribuendo un punteggio di gravità dei sintomi che andava da 0 a 4; le classi risultavano così definite:

- pianta morta = 4;
- pianta collassata = 3,5;
- pianta in via di appassimento = 3;
- pianta con 1 foglia secca = 2
- pianta con lievi imbrunimenti al colletto = 1;
- pianta senza sintomi = 0.

I valori attribuiti a ciascuna classe sono stati utilizzati nella formula di McKinney per calcolare l'indice di malattia.

3.7.2 INOCULAZIONE DI PIANTE IN CAMPO

Dalle 20 piante scelte per ognuna delle 2 varietà oggetto di studio, dopo una settimana dall'ultimo trattamento sono state asportate le foglie interessate dal trattamento e quelle di controllo. I campioni di foglie trattate e non sono stati portati in laboratorio e si è proceduto all'inoculazione apponendo sulla nervatura principale della foglia 5 dischetti di agar colonizzato da *S. sclerotiorum*, del diametro di 2 mm, asportati dalle piastre Petri sulle quali il fungo era stato precedentemente trasferito. Dopo l'inoculazione le foglie poste in camera umida sono state monitorate per una settimana. Dopo 7 giorni sono stati raccolti i dati relativi alle dimensioni delle lesioni sviluppetisi sulle foglie. I dati medi relativi alla grandezza della lesioni per ogni foglia sono stati usati per il calcolo degli indici di malattia con la formula di McKinney.

3.8 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE

Dopo la raccolta, le foglie e successivamente anche i collietti, sono stati polverizzati con pestello in mortaio freddo, con azoto liquido e quindi sottoposte ad estrazione utilizzando come mezzo il tampone freddo Tris-HCl 20 mM, pH 7,8 (2 mL g⁻¹ di tessuto fresco), con l'aggiunta di polivinilpolipirrolidone (PVPP) insolubile (Sigma). La sospensione è stata posta a 4°C per 1 ora, quindi filtrata attraverso quattro strati di garza e centrifugata a 27000 g (centrifuga mod. J2-21M/E, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA) per 30 minuti. Il pellet è stato eliminato ed il surnatante recuperato e dializzato in acqua distillata a 4°C, con tre cambi d'acqua in di 24 ore.

3.9 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLE PROTEINE TOTALI

La determinazione della proteina totale è stata eseguita con il metodo di Bradford (1976). L'assorbanza delle miscele di reazione (volume finale 1 mL), contenenti l'estratto da saggiare ed il colorante Comassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate) in soluzione acquosa, è stata letta a 595 nm.

La proteina totale è stata espressa in $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, utilizzando come riferimento un'idonea retta di taratura. Per la determinazione della retta standard di riferimento è stata utilizzata BSA (Bovin Serum Albumin, Sigma®). Il saggio della proteina totale permette di esprimere l'attività enzimatica, presente in una soluzione proteica, come "attività enzimatica specifica", ossia riferita alla proteina totale presente nella soluzione stessa.

3.10 DOSAGGIO DELL'ATTIVITÀ PEROSSIDASICA

L'attività perossidasi è stata misurata a 30°C, utilizzando una miscela di reazione (3 mL finali) contenente H_2O_2 13 μM e guaiacolo 124 μM in Tris 50 mM pH 7,4. Il saggio è stato avviato per l'aggiunta dell'enzima ed è proseguito per 3-5 minuti seguendo l'aumento di assorbanza a 470 nm, dovuto alla formazione di tetraguaiacolo (coefficiente di estinzione molare 26,6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Un'unità di attività enzimatica (U) è stata definita come la quantità di enzima necessaria per la formazione di 1 μmole di tetraguaiacolo in un minuto, nelle condizioni sperimentali del saggio.

3.11 DOSAGGIO DELL'ATTIVITÀ GLUCANASICA

L'attività delle β -1,3-glucanasi presenti negli estratti grezzi è stata saggiata attraverso la misura della produzione di zuccheri riducenti (Nelson, 1944), utilizzando laminarina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) come substrato di reazione, come descritto da Kauffman *et al.* (1987) (Kim and Hwang, 1994). Tale saggio colorimetrico degli acidi esouronici e di alcuni chetozuccheri si basa sul principio che essi possono ridurre rapidamente soluzioni di Cu^{++} (15.6 mM) a pH acidi in presenza di alte concentrazioni saline per sopprimere la

riossidazione del Cu^+ . Il Cu^+ ridotto è visualizzato colorimetricamente con reagente arseniomolibdato. Miscela di reazione: 40 μL di substrato a base di laminarina (Sigma) 0.1% in tampone acetato di sodio 0.1 M, pH 5.2 e 90 μL di preparato enzimatico, incubata a 37°C per 3 ore, in agitazione (200 oscillazioni min^{-1}). Il controllo è stato preparato addizionando l'estratto enzimatico denaturato. Terminata l'incubazione i campioni sono stati addizionati di 300 μL di reagente "A" di Nelson (soluzione rameica*), bolliti per 20 min., raffreddati, addizionati di 200 μL di reagente "B" (arsenomolibdato**) e di 1 mL di acqua distillata. I campioni sono stati analizzati spettrofotometricamente a 660 nm. La retta standard di riferimento è stata ottenuta utilizzando soluzioni di glucosio. L'attività enzimatica è stata espressa definendo come 1 nKat (o nKatal) l'attività che catalizza la formazione di 1 nmole di glucosio al secondo; pertanto l'attività enzimatica specifica corrisponderà a Kat mg^{-1} di proteina (Yi and Hwang, 1996).

(*) Preparazione del reagente "A" di Nelson (soluzione rameica) 280 g di solfato di sodio anidro e 40 g di cloruro di sodio, sono stati sciolti a caldo ed in agitazione vigorosa in 750 ml di acqua distillata. La solubilizzazione completa è stata resa possibile per aggiunta alla soluzione salina di 100 ml di tampone acetato di sodio 2 M (pH 5.1) e 65 ml di solfato di rame 0.32 M, a circa 60°C. Il pH del reagente è stato aggiustato a 4.8 ed il volume portato ad 1 litro. Il reagente è stato conservato a 37°C per non più di 2 mesi.

(**) Preparazione del reagente "B" di Nelson (arsenomolibdato) In 450 ml di acqua distillata sono stati aggiunti 25 g di molibdato ammonico, 21 ml di H_2SO_4 conc. e 25 mL di una soluzione contenente 3 g di $\text{NaAsSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. La soluzione è stata incubata a 37°C per 24 ore e conservata poi a 4°C in bottiglia scura.

3.12 DOSAGGIO DELL'ATTIVITÀ CHITINASICA

L'analisi quantitativa dell'attività chitinasica presente negli estratti è stata misurata seguendo il metodo spettrofotometrico riportato da Miller (1959) attraverso la misurazione della quantità di zuccheri riducenti (residui di *N*-acetil- β -D-glucosammina) liberati da chitina colloidale per effetto dell'attività enzimatica, in presenza di acido dinitrosalicilico. La miscela di reazione (250 μL di chitina colloidale 1% in tampone citrato fosfato 50 mM pH 5,0 e 250 μL di estratto enzimatico) è stata posta ad incubare per 2 ore a 40°C, e quindi raffreddata in ghiaccio ed addizionata con 1 mL del reagente acido dinitrosalicilico DNSA. Sono seguiti una nuova incubazione a 100°C per 15 minuti, un successivo raffreddamento e

una lettura allo spettrofotometro (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, USA) dell'assorbanza a 640 nm.

La retta standard di riferimento è stata ottenuta utilizzando *N*-acetil- β -D-glucosammina.

A tali condizioni, una unità enzimatica specifica (unità internazionali, UI) è stata definita come, la quantità di enzima in grado di liberare 1 μ mole di *N*-acetil- β -D-glucosammina mg^{-1} di proteina min^{-1} a 40°C.

3.13 SEPARAZIONE DELLE FORME ISOENZIMATICHE MEDIANTE IEF

L'analisi qualitativa delle forme isoenzimatiche presenti negli estratti è stata eseguita mediante la tecnica dell'isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (Ried and Collmer, 1985) su sistema a cella orizzontale Multiphor® II 2117 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) (Ried and Collmer, 1985). Supporto di corsa: gel sottile (0.8 mm di spessore, dimensione 10 x 12.5 cm) di poliacrilammide, contenente (volume finale 10.1 mL): acrilammide monomero (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 4.8%, bisacrilammide (N N'-metilenebisacrilamide, LKB - Produkter AB, Bromma, Sweden) 0.15%, glicerolo 15%, ammonio persolfato 0.04%, TEMED 0.1%, Ampholine™ (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) (pH di 3.5-10.0) 5%.

In ciascuno dei pozzetti è stata caricata una quantità di estratto da saggiare corrispondente a 30 μ g di proteina totale. La corsa elettroforetica è stata eseguita a 4°C, 5 W costanti, 15 mA e 1500 V di limite. La prefocalizzazione, avente lo scopo di distribuire le Ampholine nel gel, è stata eseguita a 4W costanti per circa 30 minuti.

Come soluzione anodica (+) è stato utilizzato acido aspartico 0.04 M, mentre come soluzione catodica (-) NaOH 0.1 M.

3.13.1 ANALISI DELLE FORME ISOENZIMATICHE DI PEROSSIDASI

L'analisi isoenzimatica delle perossidasi è stata eseguita secondo Caruso *et al.* (1999). Dopo la corsa in IEF (§ 3.12), il gel di acrilammide è stato immerso in tampone fosfato di sodio 0.1 M pH 5.4 per 10 minuti. Successivamente è stato posto in una soluzione di guaiacolo

(Farmitalia Carlo Erba S.p.A., Milano, Italia) al 4.4% (v/v) in tampone fosfato di sodio 0.1 M pH 5.4, per 10 minuti a temperatura ambiente e quindi, dopo immersione in acqua distillata, in una soluzione di perossido di idrogeno (Panreac Montplet & Esteban SA, Barcelona, España) 18% in tampone fosfato di sodio 0.1 M pH 5.4, fino alla comparsa delle bande di colore rosso-bruno. Dopo un nuovo risciacquo, le bande sono state fissate ponendo il gel in una soluzione di acqua, 5% di metanolo e 7.5% di acido acetico. I punti isoelettrici sono stati valutati attraverso il calcolo della regressione della distanza di posizionamento di proteine marcatrici (Isoelectric Focusing Calibration Kit, Pharmalite 3-10, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Sweden).

3.13.2 ANALISI DELLE FORME ISOENZIMATICHE DI GLUCANASI

L'analisi delle forme isoenzimatiche di β -1,3-glucanasi presenti negli estratti è stata eseguita secondo la procedura proposta da Pan *et al.* (1989) (Kim and Hwang, 1994). Dopo IEF, eseguita come descritto al 3.12, il gel è stato lavato con tre passaggi in acqua distillata, quindi immerso ad equilibrare in tampone acetato di sodio 50 mM pH 5.2 per 10 minuti. Successivamente è stato incubato a 40°C per 45 minuti in una soluzione di laminarina 0.5% (p/v) in tampone acetato di sodio 25 mM pH 5.2. Dopo l'incubazione il gel è stato sottoposto ad ulteriori tre lavaggi con acqua distillata e quindi a colorazione con 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (rosso tetrazolio) (Sigma) 0.15% (p/v) in NaOH 1M, a 100°C, per circa 10 minuti, fino a che non si sono rese evidenti le bande rosse su fondo rosa. Queste corrispondono alle isoforme di attività glucanasica (Pan *et al.*, 1989). I punti isoelettrici sono stati valutati mediante il calcolo della regressione della distanza di posizionamento di proteine marcatrici (Isoelectric Focusing Calibration Kit, Pharmalite 3-10, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Sweden).

Dopo la colorazione il gel è stato conservato a 4°C in una soluzione 3% glicerolo, 40% metanolo e 10% acido acetico.

3.13.3 ANALISI DELLE FORME ISOENZIMATICHE DI CHITINASI

L'analisi qualitativa delle isoforme enzimatiche delle chitinasi presenti negli estratti è stata eseguita mediante isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) su sistema a cella orizzontale Multiphor II (Pharmacia LKB), come descritto precedentemente. Successivamente la colorazione è stata effettuata secondo la procedura di Trudel and Asselin (1989).

Dopo IEF, il gel è stato posto in 100 mL di soluzione tampone Na-acetato 0,1 M pH 5,2, sotto agitazione lenta per 10 minuti, allo scopo di allontanare le Ampholine e condizionare il gel per il pH. Successivamente al gel di corsa è stato sovrapposto un gel di saggio (overlay), contenente 7,5% di acrilammide, 1% di glicol-chitina, 0,5 M di tampone Na-acetato pH 5,0, 25% di glicerolo. La glicol-chitina è stata preparata secondo la procedura di Molano *et al.* (1977). I due gel a contatto, sono stati posti in incubazione per 2 ore a 37°C, con UR prossima alla saturazione. La successiva colorazione del gel di agarosio è avvenuta con Fluorescent Brightener 28 (Calcofluor White M2R, Sigma®) 0,01% (p/v) in Tris-HCl 0,5 M pH 8,9, per 10 minuti al buio e a temperatura ambiente. Successivamente si è provveduto a ripetuti lavaggi con acqua ed alla visualizzazione delle forme isoenzimatiche di chitinasi, corrispondenti a bande scure in cui è avvenuta la degradazione del substrato, osservando e fotografando i gel in un transilluminatore (Spectroline Model CC-80 ultraviolet florescent analysis cabinet – Spectronics corporation) UV λ 365 nm. Le bande di attività sono state visualizzate in quanto la fluorescenza è visibile dove è presente la glicolchitina, ma non nelle zone dove essa è stata degradata. I punti isoelettrici sono stati valutati attraverso il calcolo della regressione della distanza di posizionamento di proteine marcatrici.

La conservazione del gel è avvenuta a temperatura ambiente, al buio, in soluzione acquosa di sodio azide 0,02%.

3.14 ELABORAZIONE STATISTICA DEI RISULTATI RELATIVI AI SAGGI QUANTITATIVI

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza e le medie delle variabili risultate significativamente differenti sono state confrontate mediante il test di Tukey. I dati rappresentano la media di tre repliche.

4. RISULTATI

4.1 ANDAMENTO CLIMATICO

Nei 3 anni di sperimentazione in campo l'andamento meteorologico relativo al periodo marzo-maggio è stato rilevato attraverso la raccolta dei dati climatici (temperatura, umidità relativa e pioggia) per mezzo della stazione meteorologica situata nell'azienda sperimentale dimostrativa ARSIAL di Tarquinia. Sono stati così realizzati i 3 climadiagrammi relativi ai 3 anni di sperimentazione per i mesi di monitoraggio delle fitopatie del carciofo in campo (Fig. 5, 6 e 7).

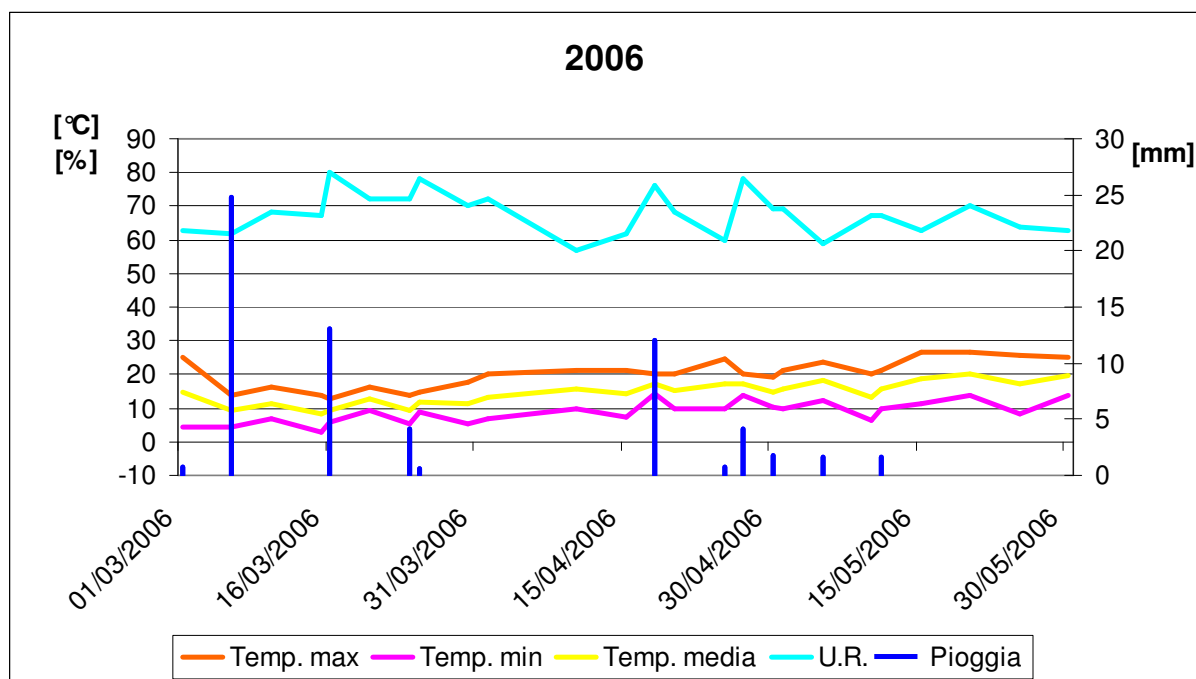


Fig. 5: Andamento climatico registrato nell'anno 2006 (trimestre marzo-maggio) nella zona di Tarquinia (VT).

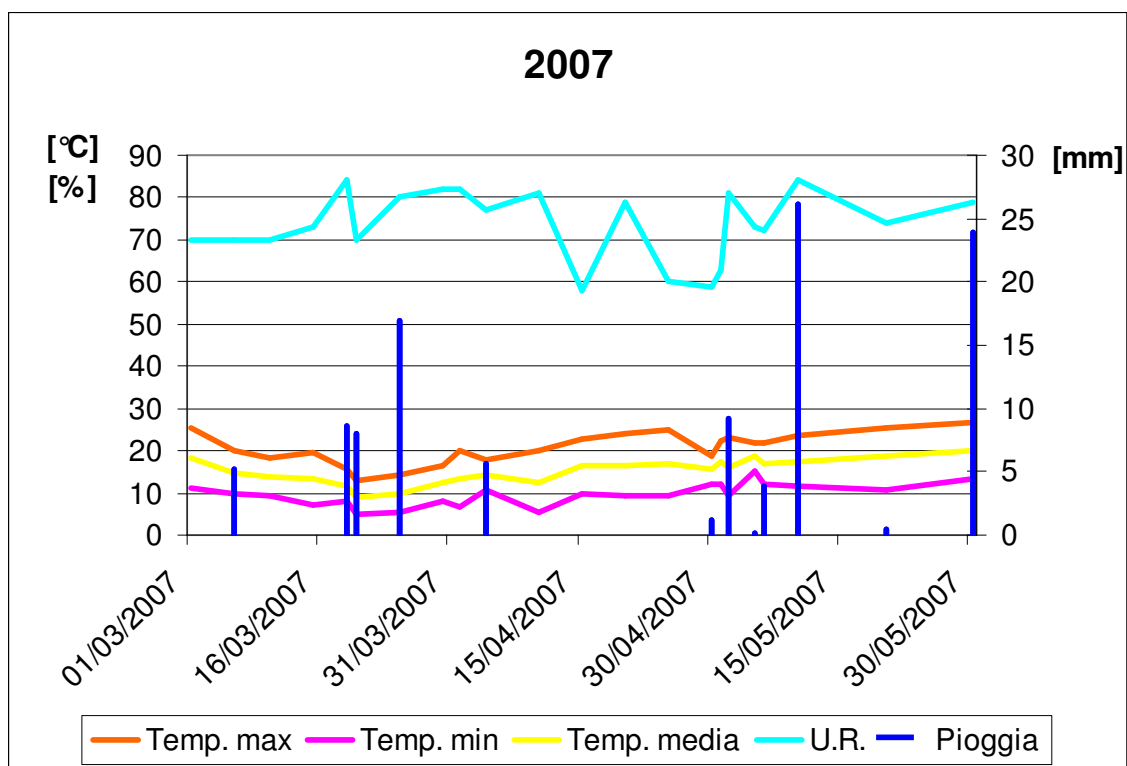


Fig. 6: Andamento climatico registrato nell'anno 2007 (trimestre marzo-maggio) nella zona di Tarquinia (VT).

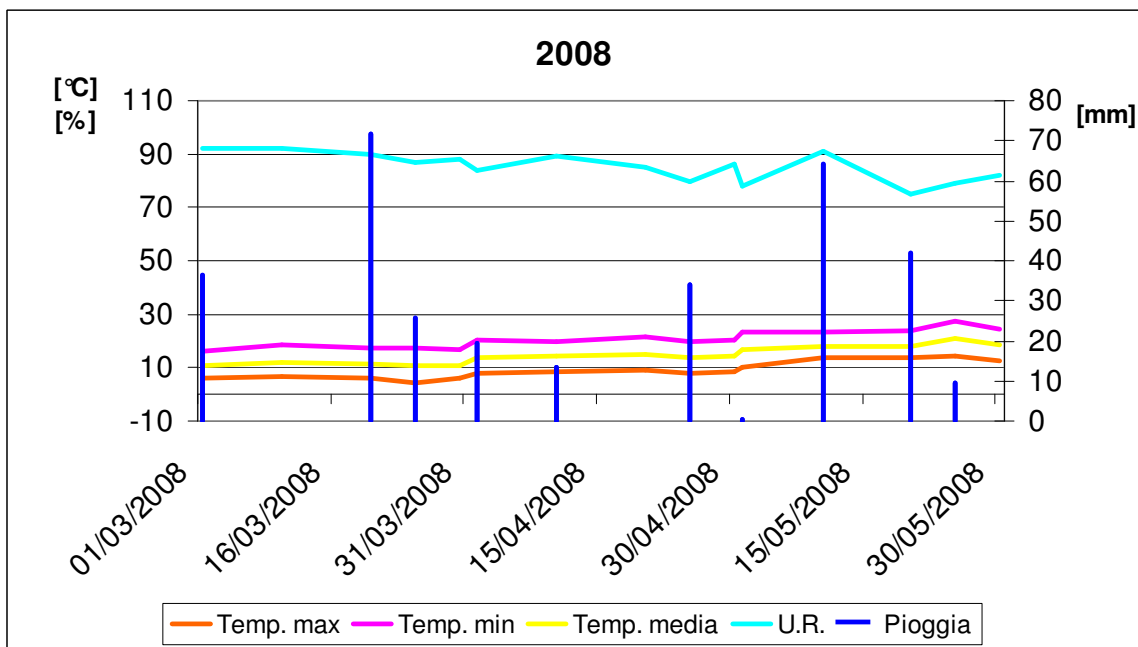


Fig. 7: Andamento climatico registrato nell'anno 2008 (trimestre marzo-maggio) nella zona di Tarquinia (VT).

4.2 MONITORAGGIO FITOPATOLOGICO EFFETTUATO IN CAMPO SU VARIETÀ DI CARCIOFO TRADIZIONALI E DI NUOVA COSTITUZIONE.

I sopralluoghi settimanali effettuati nel carciofeto sperimentale dell'azienda ARSIAL di Tarquinia (Fig. 8), hanno permesso di avere un quadro completo delle patologie più importanti che colpiscono le 8 varietà di carciofo oggetto di studio (Tabella, 3), nell'areale laziale di coltivazione.

È stata così rilevata la presenza di *Bremia lactucae*, agente della peronospora, un'importante patologia dell'apparato fogliare del carciofo (Fig. 9, A-B). Inoltre, sono stati osservati gravi sintomi di marciumi alla base delle piante, in corrispondenza del colletto. Nella stragrande maggioranza dei casi, questi marciumi sono stati attribuiti a *Sclerotinia sclerotiorum*, anche se mediante isolamenti su substrati selettivi si è accertata la sporadica presenza di *Sclerotium rolfsii*, altro temibile agente di marciume (Fig. 9, C-D). Infine, è stata inoltre evidenziata la presenza di sintomi riconducibili a virosi (Fig. 9, E-F).

Varietà	Provenienza
C3 micropropagato	Vitroplant Italia srl
C3 propagato per carducci	Azienda sperimentale dimostrativa ARSIAL di Cerveteri
Exploter	Vitroplant Italia srl
Giove	Vitroplant Italia srl
Campagnano	Azienda sperimentale dimostrativa ARSIAL di Cerveteri
Apollo	Vitroplant Italia srl
Grato 1	Azienda sperimentale dimostrativa ARSIAL di Cerveteri
Grato 2	Azienda sperimentale dimostrativa ARSIAL di Cerveteri

Tab. 3: Elenco delle varietà di carciofo oggetto di studio e loro provenienza.



Fig. 8: Panoramica del carciofeto sperimentale allestito presso l'azienda ARSIAL di Tarquinia.



Fig. 9: A, Pianta di carciofo colpita da peronospora. B, Fruttificazioni di *Bremia lactucae*. C, Deperimento dovuto a marciumi basali. D, Pianta morta in seguito all'attacco di *Sclerotinia sclerotiorum*. E-F, Pianta affetta da virosi.

4.2.1 VIROSI

Sin dal primo anno di coltivazione, durante i rilievi effettuati in campo, si è potuta osservare un'elevata incidenza di piante affette da virosi. In questa indagine ci si è limitati a determinare le percentuali di infezione, senza approfondire, attraverso analisi di laboratorio, l'identificazione dei virus stessi. I valori ottenuti mostrano una diffusa presenza di virosi sulle piante appartenenti a tutte le otto varietà studiate (Fig. 10, 11 e 12). Nel secondo anno di vita del carciofeto, la presenza di questa importante patologia aumenta notevolmente, arrivando a compromettere lo stato sanitario delle piante infette. In particolare, le varietà Apollo, Giove, C3 e Campagnano hanno mostrato marcati sintomi di virosi nell'anno 2007.

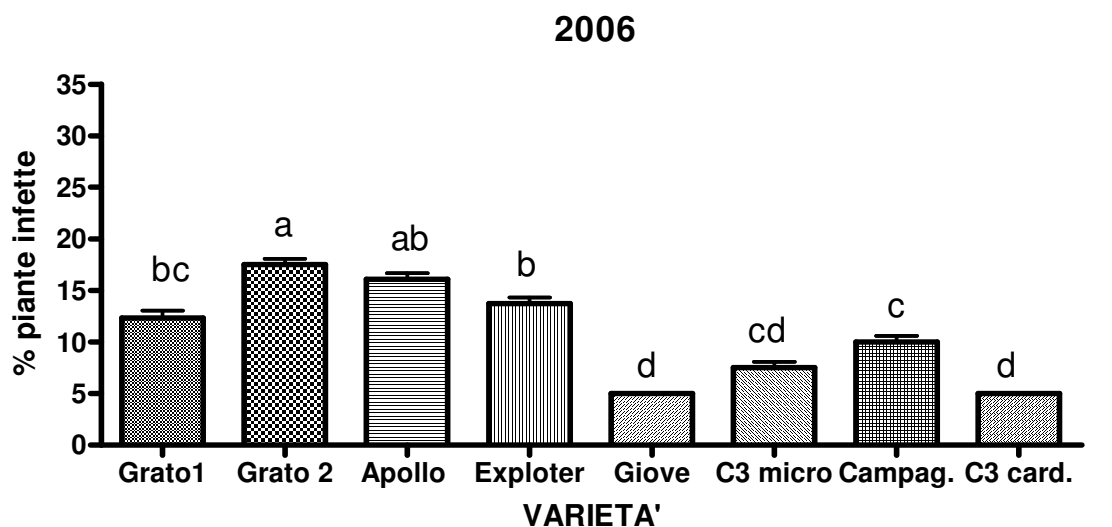


Fig. 10: Percentuale di infezione virale sulle 8 varietà di carciofo confrontate in campo nella primavera 2006.

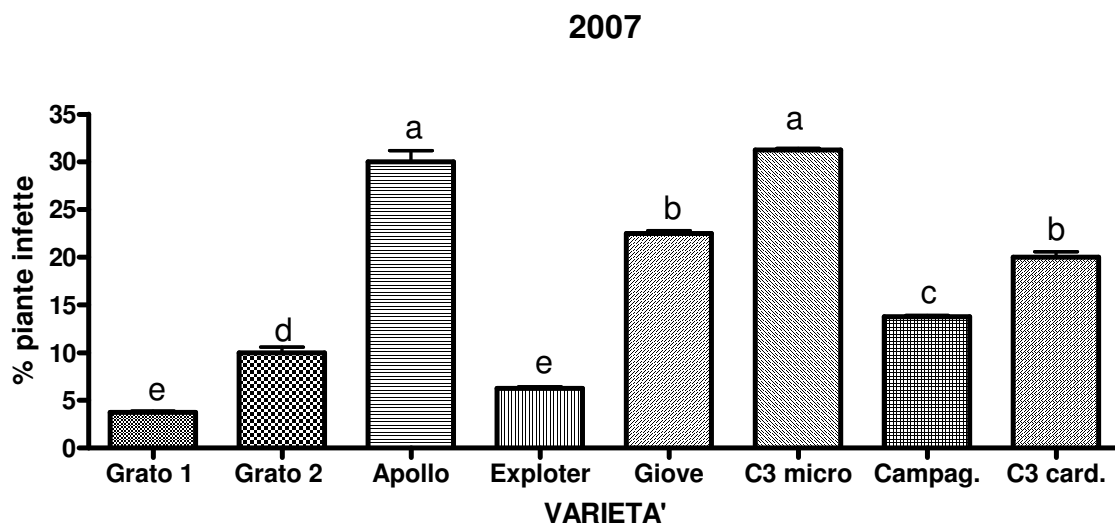


Fig. 11: Percentuale di infezione virale sulle 8 varietà di carciofo confrontate in campo nella primavera 2007.

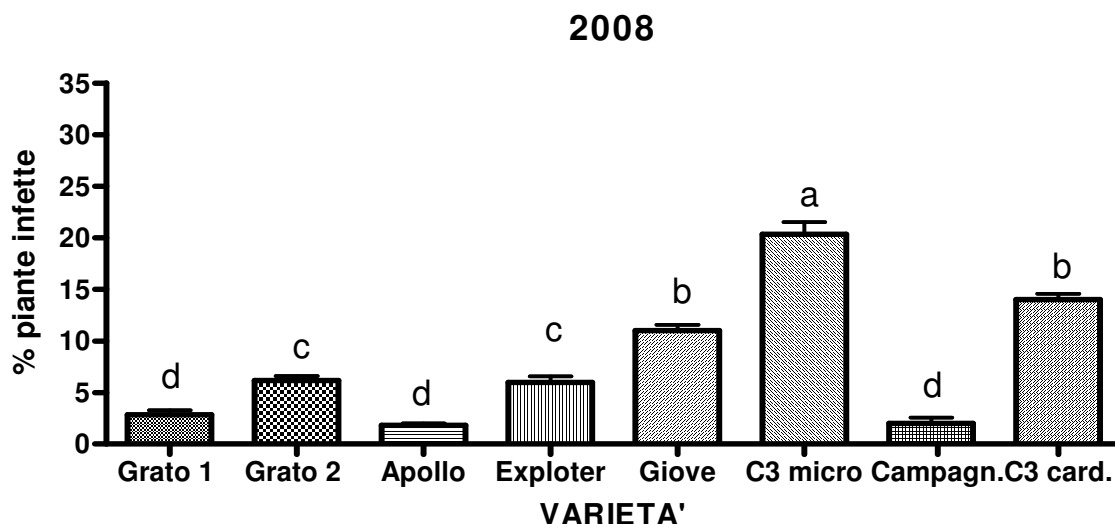


Fig. 12: Percentuale di infezione virale sulle 8 varietà di carciofo confrontate in campo nella primavera 2008.

4.2.2 PERONOSPORA

Mediante opportuni campionamenti, effettuati nei tre anni di monitoraggio, è stata calcolata la percentuale di area necrotica presente sulle foglie di carciofo colpite da peronospora (Fig. 13). Questi dati sono stati ottenuti utilizzando il software “Assess Image Analysis Software for Plant Disease Quantification, Lakhdar Lamari, American Phytopathological Society“, un programma in grado di distinguere il colore delle macchie necrotiche rispetto al verde della foglia, di delimitare queste aree necrotiche e di calcolarne l’area rispetto all’intera superficie fogliare (Fig. 13). Nel primo anno d’impianto, tutte le varietà sono state colpite da *B. lactucae*, in modo più o meno significativo. La malattia comparsa all’inizio della primavera 2006, in concomitanza di elevati tassi di umidità relativa e temperature idonee allo sviluppo di *B. lactucae*, ha trovato nella varietà Exploter un ospite moderatamente suscettibile; infatti è in questa varietà che si riscontra la maggiore percentuale di area fogliare infetta. Giove al contrario risulta la varietà più resistente. La tendenza delineata nel 2006 si mantiene pressochè costante nelle due stagioni successive. Infatti, le percentuali di infezione aumentano in ciascuna varietà, mentre la differenza nella suscettibilità di queste si mantiene costante, confermando la varietà Exploter come più suscettibile alla peronospora (Fig. 14,15 e 16).

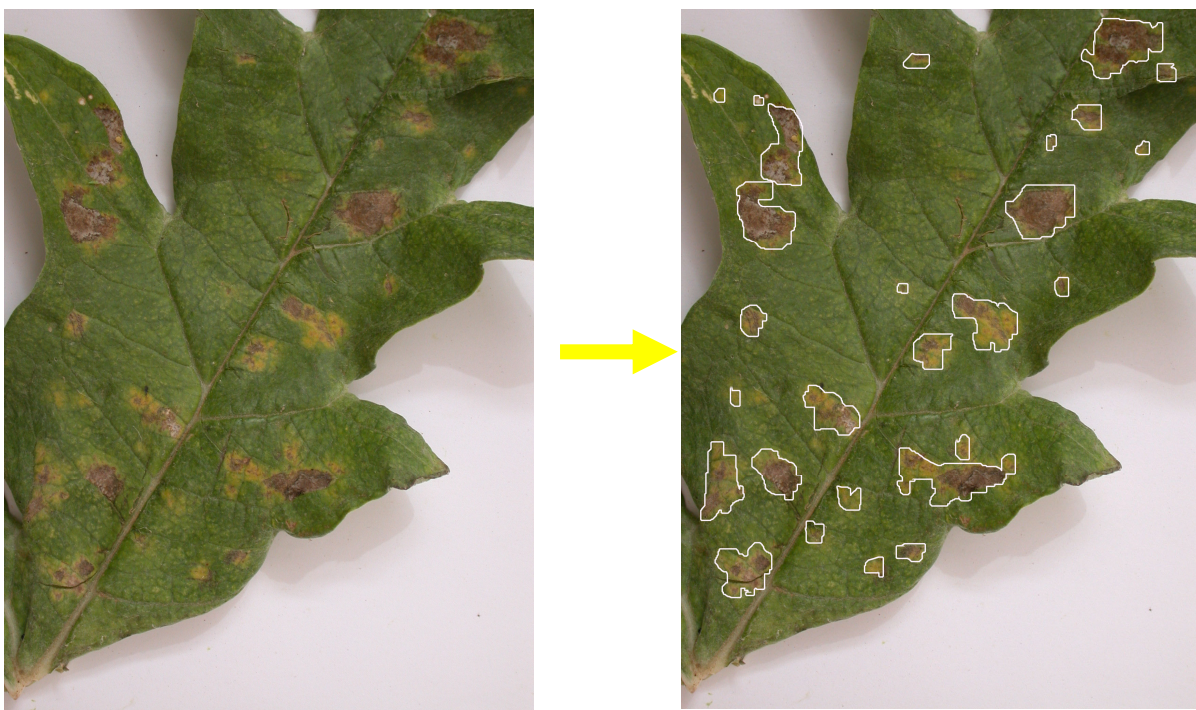


Fig. 13: Esempio di elaborazione grafica di dati relativi alle foglie di carciofo colpite da *Bremia lactucae* mediante software "Assess Image Analysis Software for Plant Disease Quantification".

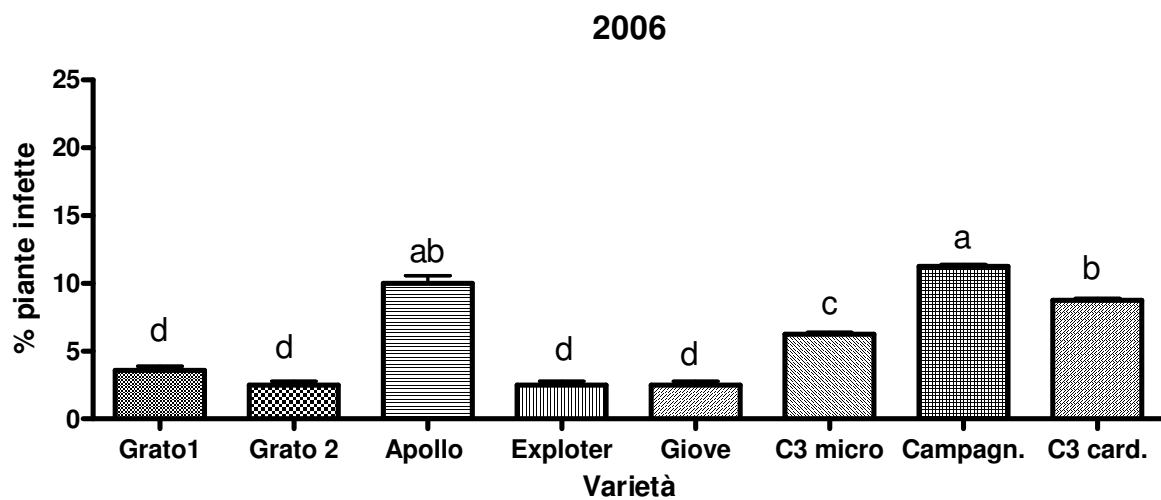


Fig. 14: Percentuale di marciumi basali rilevata sulle piante di carciofo delle 8 varietà confrontate in campo nell'anno 2006.

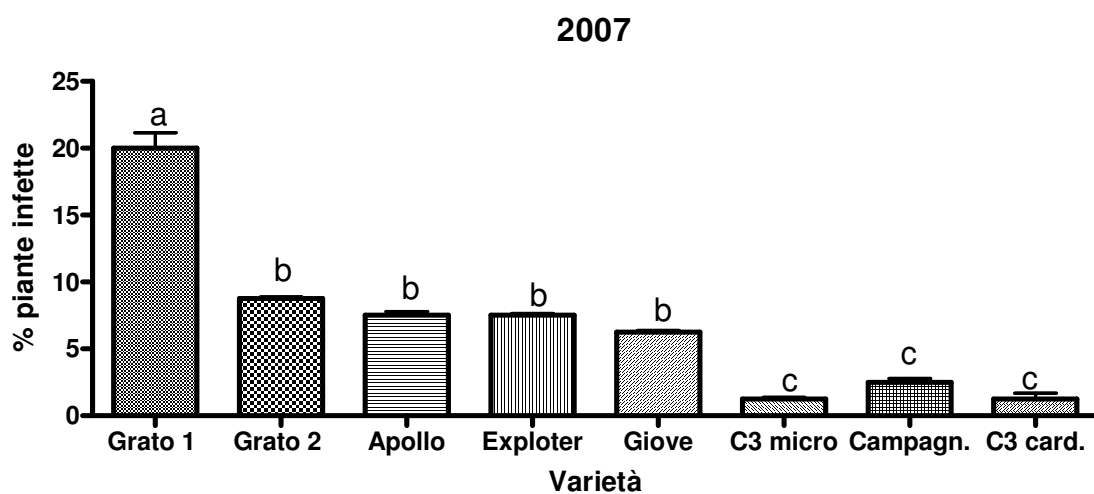


Fig. 15: Percentuale di marciumi basali rilevata sulle piante di carciofo delle 8 varietà confrontate in campo nell'anno 2007.

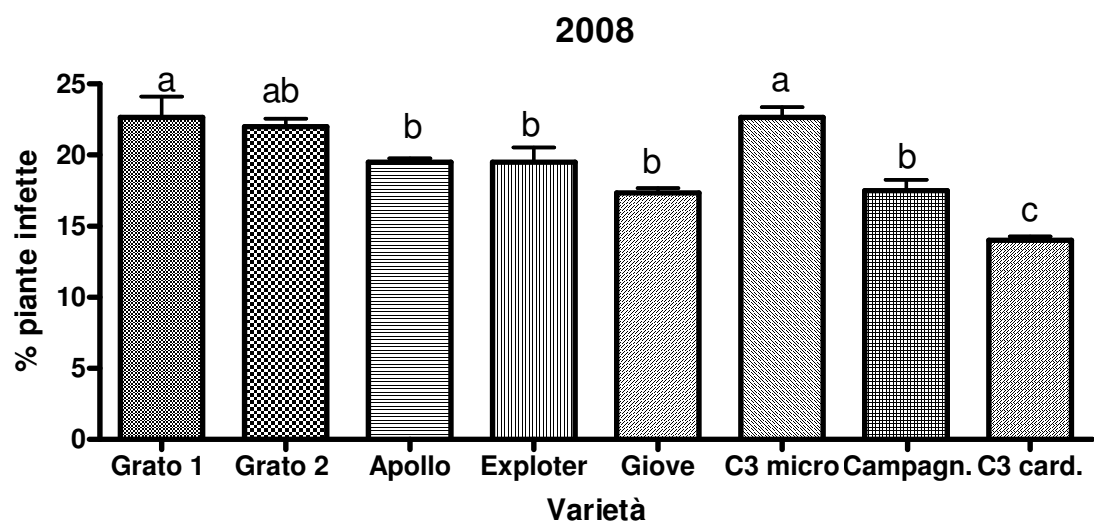


Fig. 16: Percentuale di marciumi basali rilevata sulle piante di carciofo delle 8 varietà confrontate in campo nell'anno 2008.

4.2.3 MARCIUMI DEL COLLETO

I marciumi basali osservati in campo hanno rivelato la presenza di due temibili agenti patogeni, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*. In particolare quest'ultimo ha colpito le giovani piantine messe a dimora nel settembre 2006 per rimpiazzare le fallanze, compromettendone l'attecchimento nella quasi totalità dei casi. Anche in questo caso, come per le altre patologie monitorate, si è registrato un aumento generale delle percentuali di infezione in corrispondenza della seconda stagione di rilievi (Fig. 17, 18 e 19) e da questi è emerso che, nonostante gli attacchi alle giovani piantine, tra i due patogeni il più importante, perché in grado di portare alla morte anche piante adulte, è *S. sclerotiorum*.

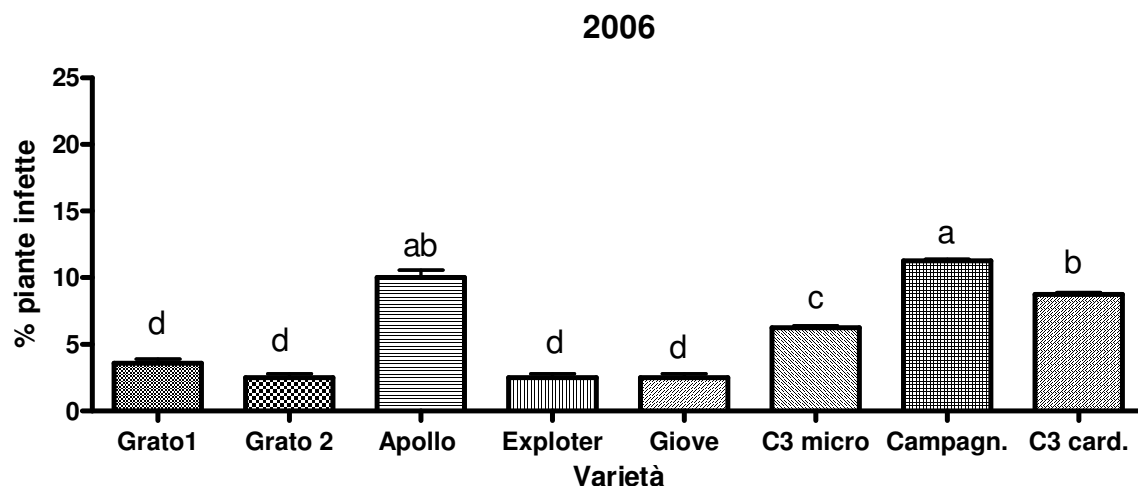


Fig. 17: Percentuale di marciumi basali rilevata sulle piante di carciofo delle 8 varietà confrontate in campo nell'anno 2006

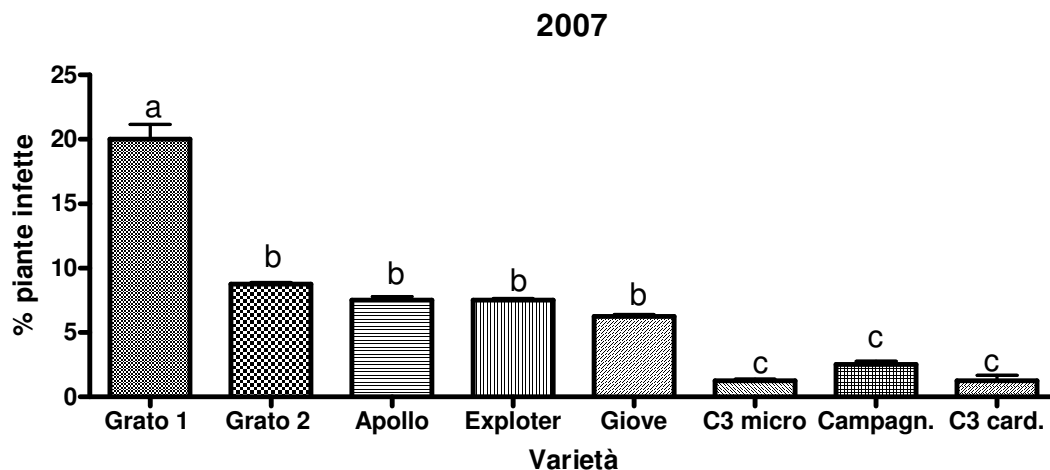


Fig. 18: Percentuale di marciumi basali rilevata sulle piante di carciofo delle 8 varietà confrontate in campo nell'anno 2006

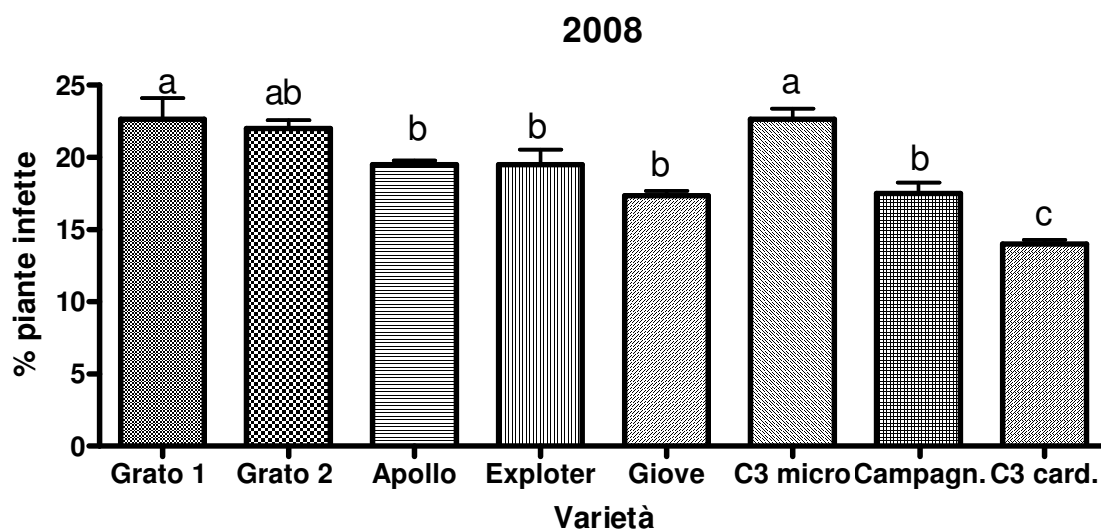


Fig. 19: Percentuale di marciumi basali rilevata sulle piante di carciofo delle 8 varietà confrontate in campo nell'anno 2008.

4.3 TRATTAMENTI CON INDUTTORI CHIMICI DI RESISTENZA

Al fine di verificare l'efficacia dei 3 induttori di resistenza presi in esame (BTH, KH_2PO_4 e BABA) nella stimolazione del sistema di difesa della pianta di carciofo contro *S. sclerotiorum* è stata analizzata l'attività di alcuni significativi enzimi coinvolti nei meccanismi di risposta della pianta all'attacco del patogeno. In particolare, sono state prese

in considerazione le seguenti proteine PR: perossidasi (PR-9), glucanasi (PR-2) e chitinasi (PR- 8). Le proteine sono state isolate, in forma nativa e funzionale, dalle foglie e gli estratti sono stati utilizzati sia per analisi di tipo quantitativo (dosaggi delle attività enzimatiche) che per quelle di tipo qualitativo (analisi delle isoforme mediante isoelettrofocalizzazione). Inoltre, per studiare le alterazioni metaboliche coinvolte nella risposta di resistenza delle piante trattate con gli induttori ad un attacco fungino, una parte delle piante di carciofo trattate è stata inoculata con l'agente patogeno *S. sclerotiorum*.

4.3.1 PEROSSIDASI

Le proteine totali estratte dalle foglie di piantine di carciofo delle varietà C3 ed Exploter, a distanza di una settimana da ciascun trattamento con gli induttori, sono state sottoposte ad analisi sia di tipo quantitativo che qualitativo.

I risultati del saggio quantitativo dell'attività perossidasi hanno mostrato una discreta efficacia degli induttori nello stimolare l'attività di tale enzima, in special modo dopo il secondo trattamento nella varietà C3 (Fig. 20).

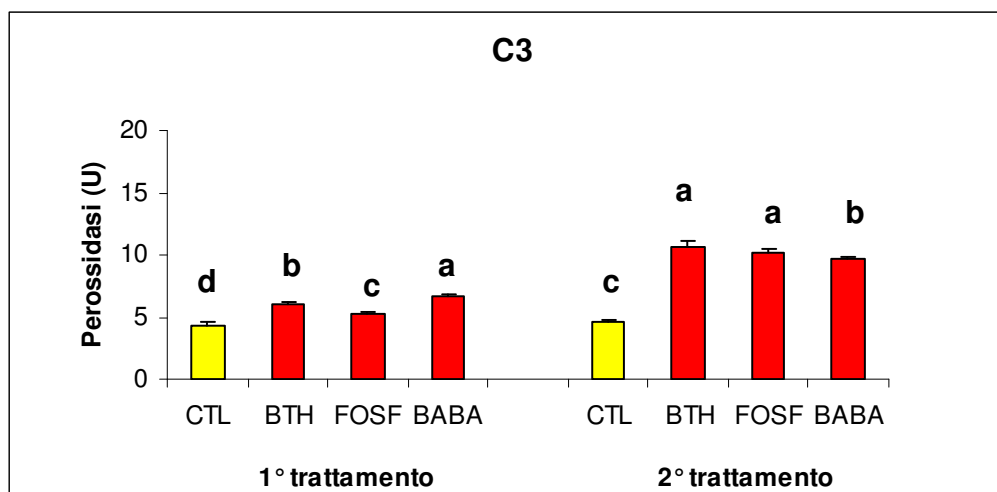


Fig., 20: Attività perossidasi presente negli estratti di foglie di carciofo della varietà C3, dopo trattamento con induttori di resistenza. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per $P \leq 0.05$.

I risultati delle analisi di natura qualitativa riguardanti le proteine con attività perossidasi, separate sfruttando il loro diverso punto isoelettrico mediante focalizzazione isoelettrica condotta in un gradiente di pH compreso tra 3,5 e 10, sono riportati in figura 21. Il profilo isoenzimatico ottenuto presenta un numero ridotto di isoforme perossidasiche. L'estratto

proteico ottenuto dalle foglie della varietà C3, dopo entrambe i trattamenti, mostra la presenza di una banda differenziale, con punto isoelettrico di 8,9, corrispondente ad una isoforma di perossidasi non presente nelle foglie controllo. Nelle foglie trattate questa isoforma basica viene indotta con uguale intensità da parte di BTH, KH_2PO_4 e BABA, e risulta più marcata a seguito del secondo trattamento. Inoltre, dopo il secondo trattamento si mette bene in evidenza anche una isoforma acida con pI pari a 4,5 che compare in corrispondenza delle tesi trattate e risulta assente in corrispondenza del controllo. Infine, il secondo trattamento sembrerebbe associato ad un aumento generale dell'attività perossidasi.

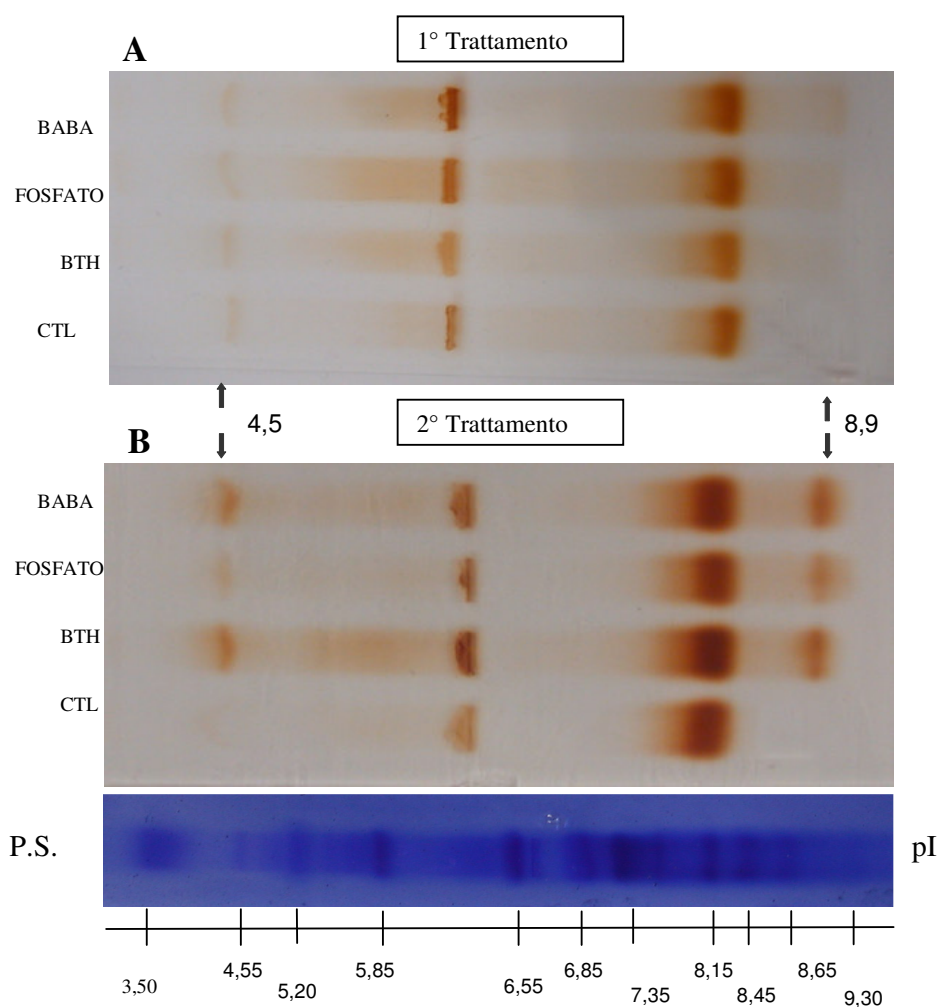


Fig. 21: Forme isoenzimatiche di perossidasi presenti negli estratti di foglie di carciofo, varietà C3. **A**, Primo trattamento. **B**, Secondo trattamento. Punti isoelettrici stimati in alto. P.S.: pI delle proteine standard

Nella varietà Exploter, in entrambi i trattamenti si assiste ad un incremento dell'attività perossidasi nelle foglie trattate rispetto al controllo (Fig. 22). In particolare BTH sembra essere il più efficace tra gli induttori saggiati.

Per quanto riguarda l'analisi qualitativa la situazione è strettamente analoga a quanto osservato nella varietà C3 con la comparsa di una nuova banda con pI pari a 8,9 (Fig. 23).

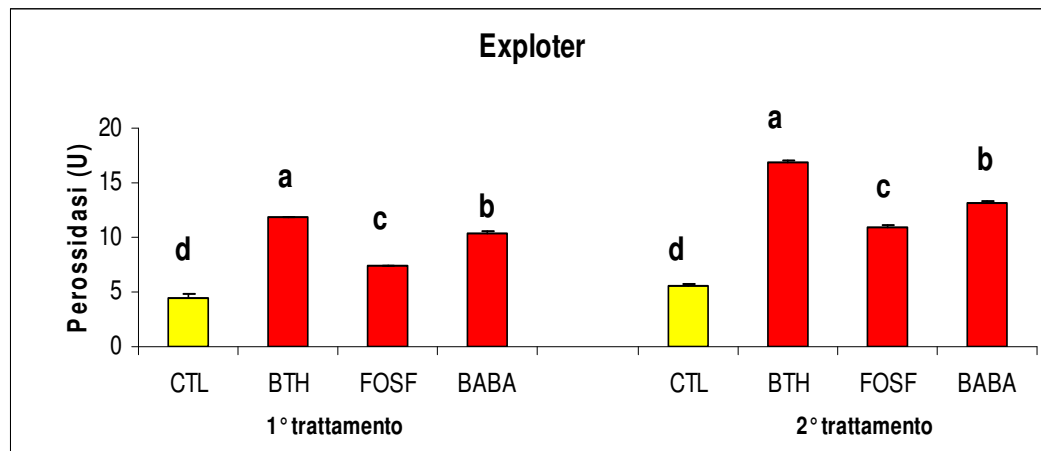


Fig. 22: Attività perossidasi presente negli estratti di foglie di carciofo della varietà C3, dopo trattamento con induttori di resistenza. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per $P \leq 0.05$.

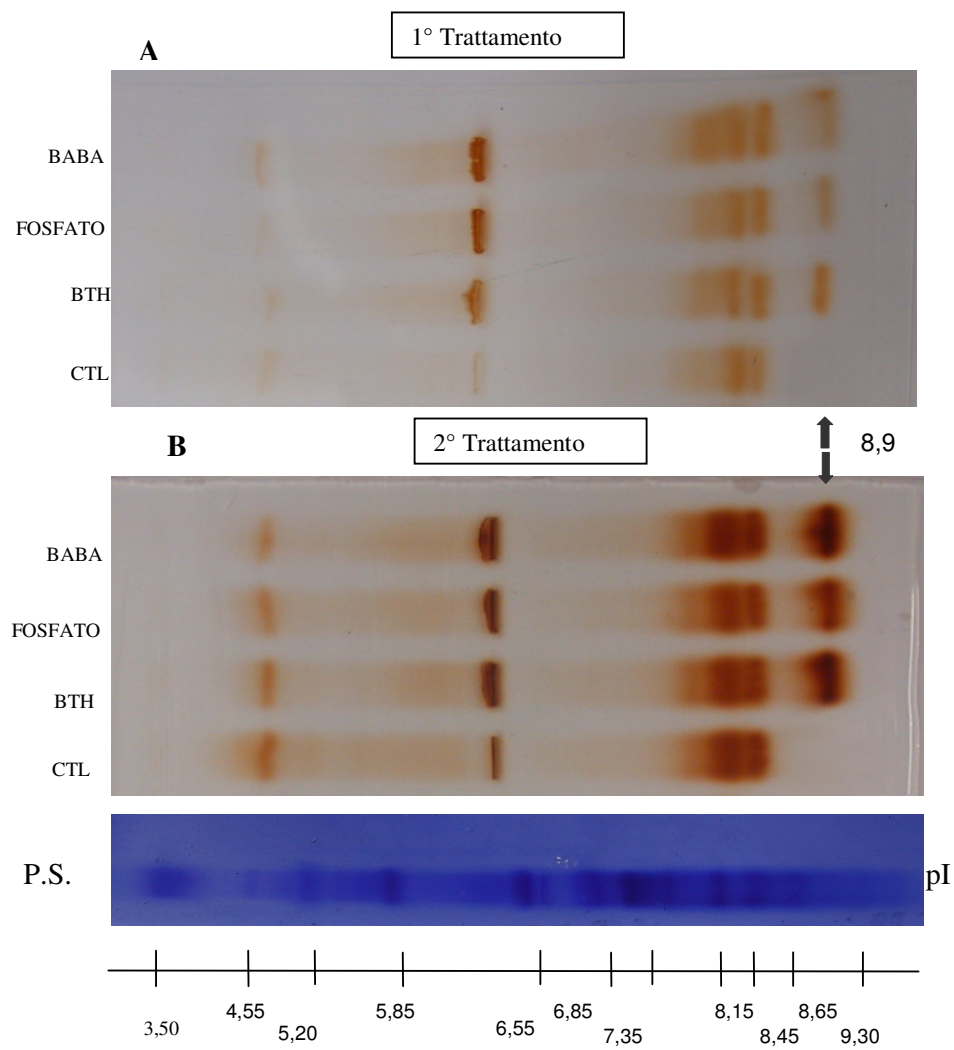


Fig. 23: Forme isoenzimatiche di perossidasi presenti negli estratti di foglie di carciofo, varietà C3. **A**, Primo trattamento. **B**, Secondo trattamento. Punti isoelettrici stimati in alto. P.S.: pI delle proteine standard.

4.3.2 GLUCANASI

Per saggiare l'attività glucanasica sono state eseguite analisi di tipo quantitativo e qualitativo, come nel caso delle perossidasi. Il dosaggio quantitativo relativo alla varietà C3 ha evidenziato uno stimolo significativo dell'attività β -1,3-glucanasica da parte degli induttori BTH e KH_2PO_4 , a seguito del primo trattamento, e di uno stimolo di tutti e tre gli induttori dopo il secondo trattamento (Fig. 24).

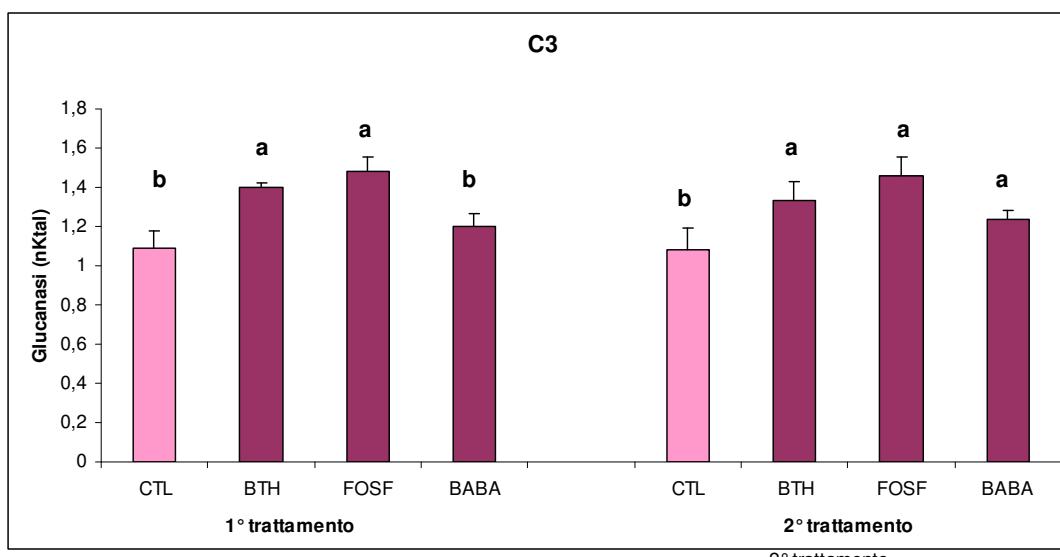


Fig. 24: Attività glucanasica presente negli estratti di foglie di carciofo della varietà C3, dopo trattamento con induttori di resistenza. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per $P \leq 0.05$.

Nel pattern isoenzimatico delle glucanasi non appare nessuna isoforma differenziale che permetta di distinguere le foglie trattate con induttori dalle foglie controllo (Fig. 25).

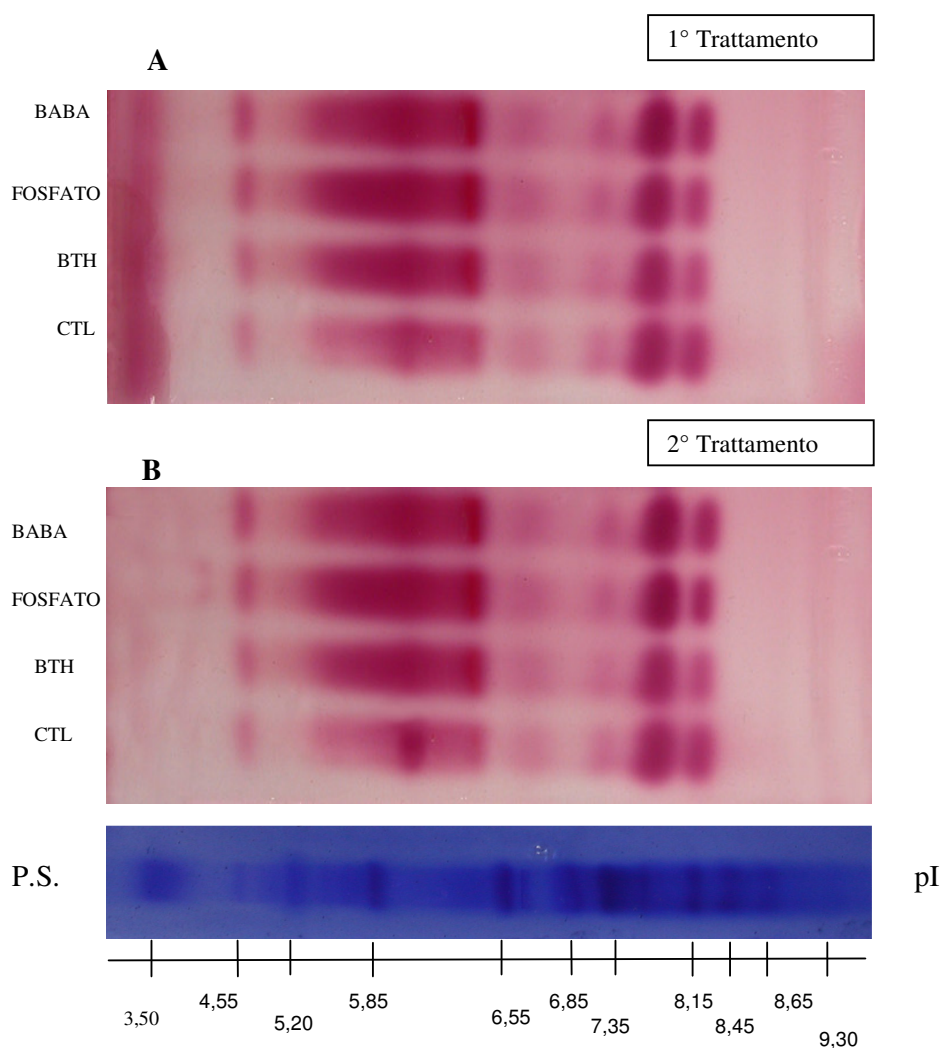


Fig. 25: Forme isoenzimatiche di glucanasi presenti negli estratti di foglie di carciofo, varietà C3. **A**, Primo trattamento. **B**, Secondo trattamento. P.S.: pI delle proteine standard.

L'analisi quantitativa effettuata sull'estratto proteico di foglie della varietà Exploter ha evidenziato un comportamento diverso nei 2 trattamenti (Fig. 26). Mentre dopo il primo trattamento non si evidenzia alcun l'incremento dell'attività glucanasica nelle tre tesi trattate, con il secondo trattamento è possibile notare una leggera induzione in corrispondenza del trattamento con fosfato.

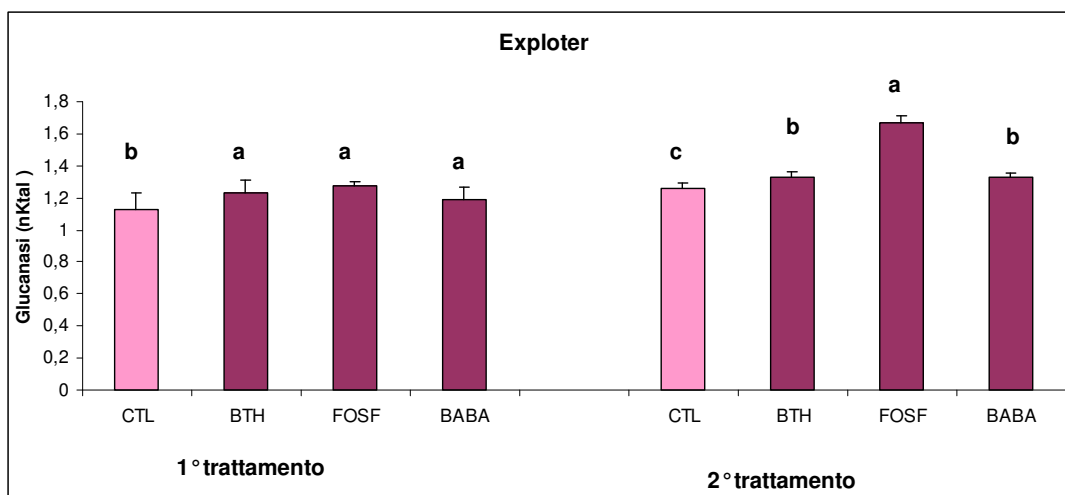


Fig.26: Attività glucanasica presente negli estratti di foglie di carciofo della varietà Exploter, dopo trattamento con induttori di resistenza. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per $P \leq 0.05$.

Per quanto riguarda invece l'analisi qualitativa degli estratti fogliari della varietà Exploter si può notare una isoforma differenziale ben definita al pI 8,80, che compare dopo il secondo trattamento soltanto nella tesi trattata con fosfato (Fig. 27), in accordo con l'analisi quantitativa.

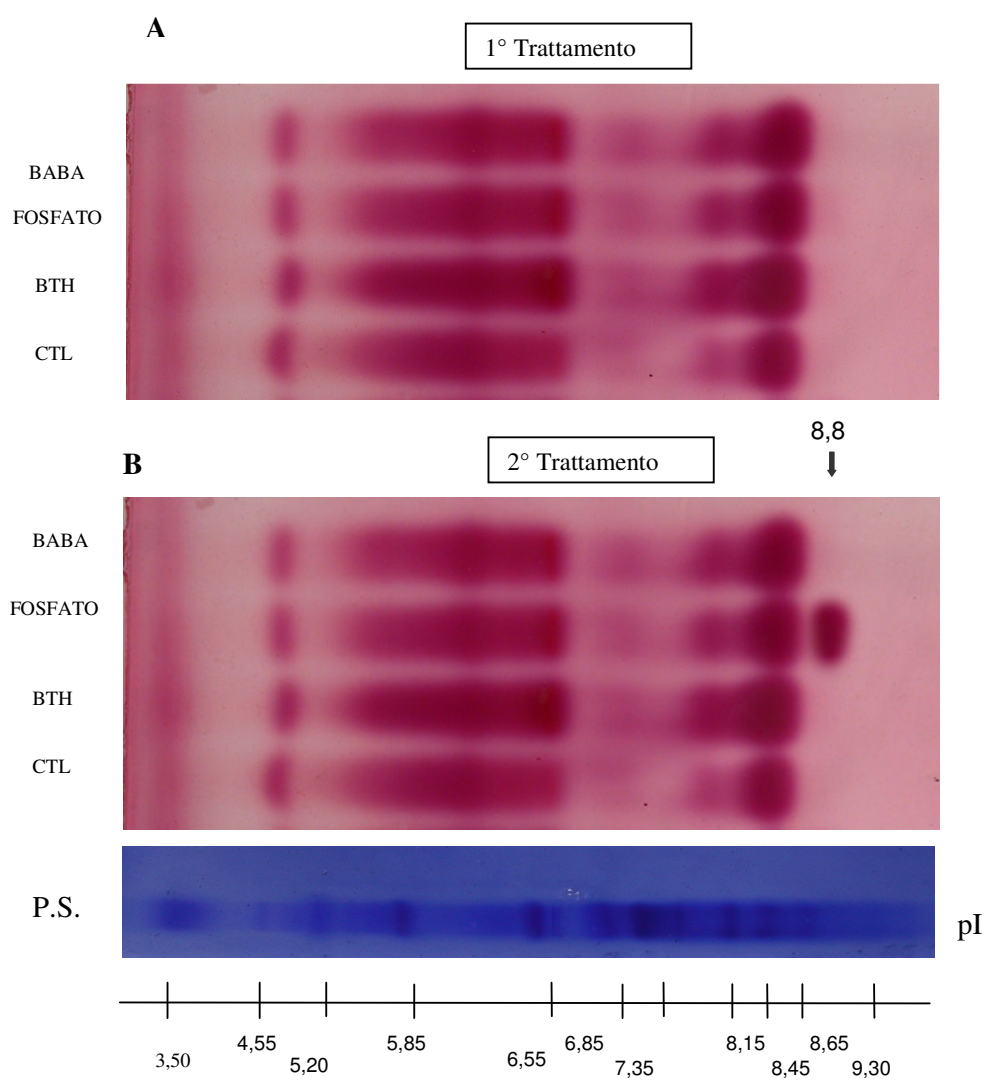


Fig. 27: Forme isoenzimatiche di glucanasi presenti negli estratti di foglie di carciofo, varietà Exploter. **A**, Primo trattamento. **B**, Secondo trattamento. Punti isoelettrici stimati in alto. P.S.: pI delle proteine standard.

4.3.3 CHITINASI

Anche per le chitinasi sono state eseguite analisi di tipo quantitativo e qualitativo, come esposto per perossidasi e glucanasi. Il saggio quantitativo eseguito sull'estratto proteico di foglie della varietà C3 ha rilevato che non ci sono differenze fra gli estratti delle foglie trattate con induttori ed il controllo, ad eccezione degli estratti delle foglie trattate 2 volte con BTH (Fig. 28).

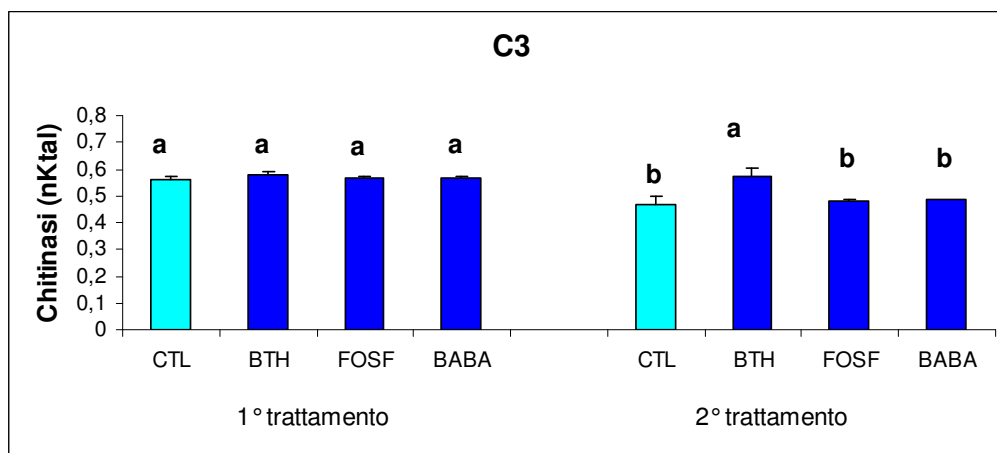


Fig. 28: Attività chitinasi presente negli estratti di foglie di carciofo della varietà C3, dopo trattamento con induttori di resistenza. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per ≤ 0.05 .

Dal prospetto riportato in Fig. 29 appare che le forme isoenzimatiche di chitinasi risultano essere espresse in modo costitutivo anche dopo i due trattamenti con induttori. Fa eccezione una nuova isoforma con pI 4,55 che viene debolmente espressa dopo il secondo trattamento nelle foglie trattate con BTH.

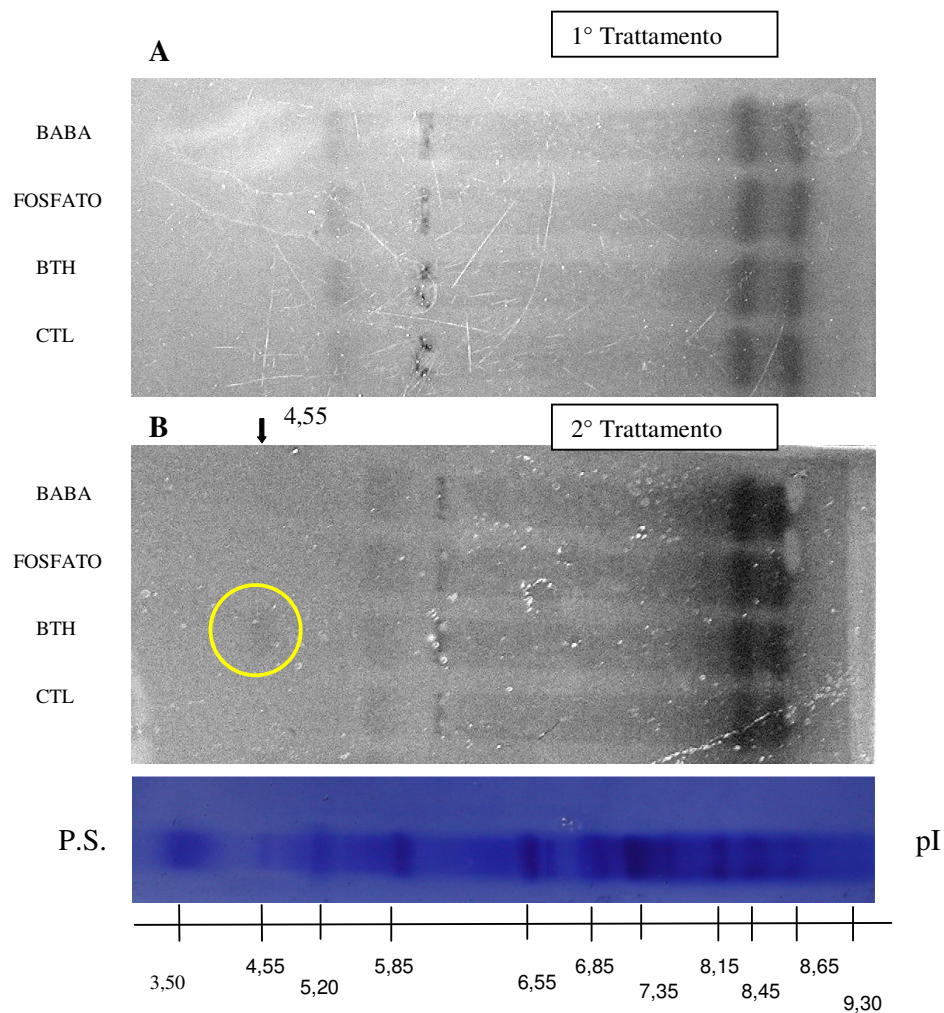


Fig. 29: Forme isoenzimatiche di chitinasi presenti negli estratti di foglie di carciofo, varietà C3. **A**, Primo trattamento. **B**, Secondo trattamento. Punti isoelettrici stimati in alto. P.S.: pI delle proteine standard.

Nella varietà Exploter si è osservato un andamento dell'attività chitinasi simile a quello rilevato nella varietà C3, caratterizzato da incrementi piuttosto bassi dell'attività saggiata (Fig.30).

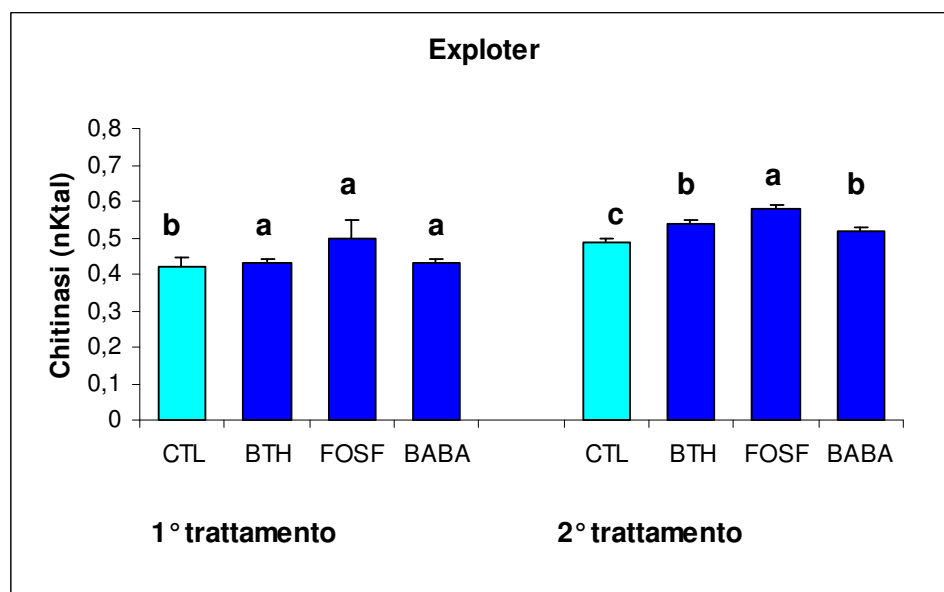


Fig. 30: Attività chitinasi presente negli estratti di foglie di carciofo della varietà Exploter, dopo trattamento con induttori di resistenza. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per ≤ 0.05 .

Il pattern isoenzimatico delle chitinasi relativo alla varietà Exploter non rivela differenze tra le tesi trattate ed i controlli, né si osservano differenze tra primo e secondo trattamento (Fig. 31).

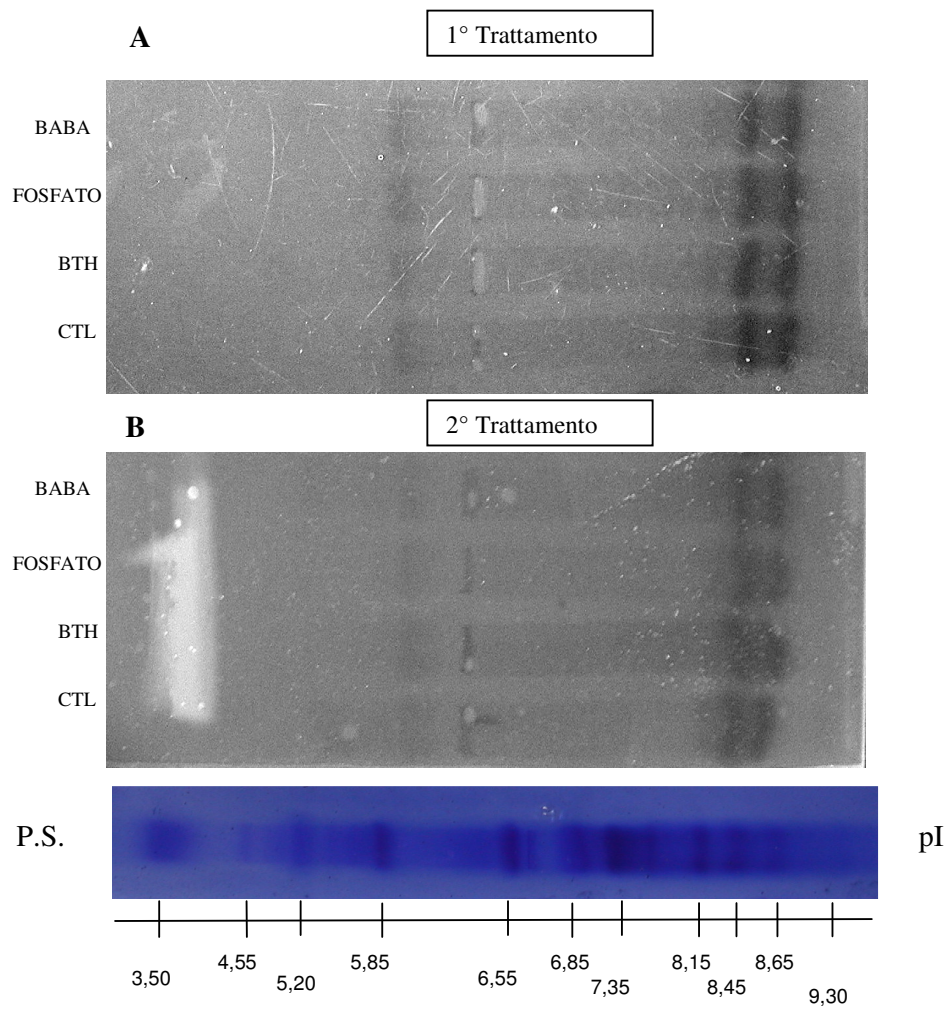


Fig. 31: Forme isoenzimatiche di chitinasi presenti negli estratti di foglie di carciofo, varietà Exploter. **A**, Primo trattamento. **B**, Secondo trattamento. P.S.: pI delle proteine standard.

4.4 INDICE DI MALATTIA IN PIANTE DI CARCIOFO TRATTATE CON INDUTTORI DI RESISTENZA E SUCCESSIVAMENTE INOCULATE CON *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

Nelle Fig. 32 e 33 sono riportati gli indici di malattia relativi alle piante di carciofo delle due varietà C3 ed Exploter che erano state precedentemente trattate con gli induttori di resistenza BTH, KH_2PO_4 e BABA ed in seguito inoculate con il fungo *S. sclerotiorum*. Si può osservare come l'applicazione degli induttori determini una riduzione degli IM in entrambe le varietà. In particolare è importante notare l'efficacia del BABA, in entrambe le varietà, nel limitare il marciume da *S. sclerotiorum*.

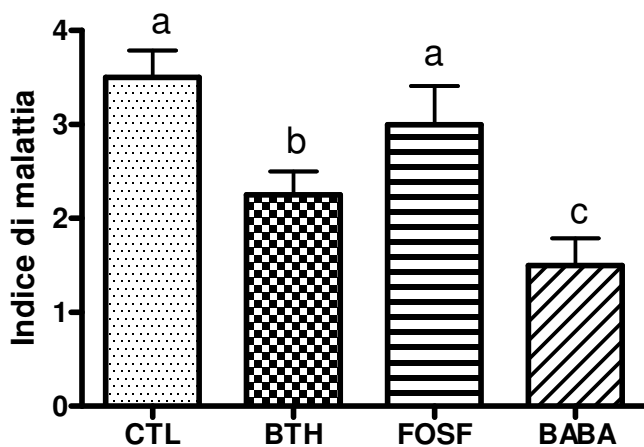


Fig. 32: Indici di malattia determinati in piante di carciofo della varietà C3 precedentemente trattate.

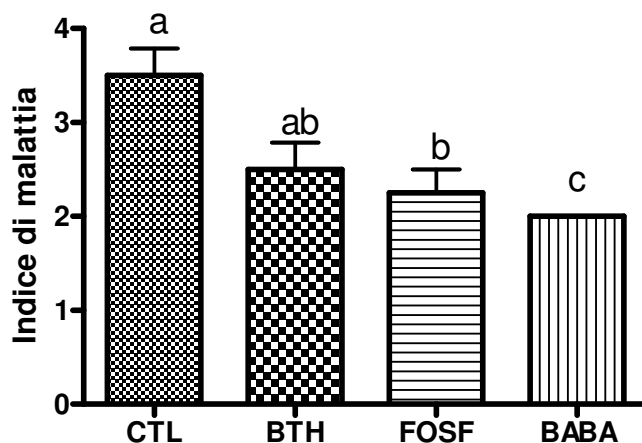


Fig. 33: Indici di malattia determinati in piante di carciofo della varietà Exploter precedentemente trattate.

4.5 ESPRESSIONE DI PROTEINE PR IN PIANTE DI CARCIOFO TRATTATE CON INDUTTORI DI RESISTENZA ED INOCULATE CON *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

- PEROSSIDASIS

Il saggio quantitativo eseguito sull'estratto proteico dei colletti appartenenti alla varietà C3 evidenzia un generale, identico incremento dell'attività perossidasi nelle piante inoculate, sia trattate precedentemente con i tre induttori che non trattate. Solo nelle piante trattate con KH_2PO_4 si osserva un incremento di attività perossidasi statisticamente significativo (Fig. 34).

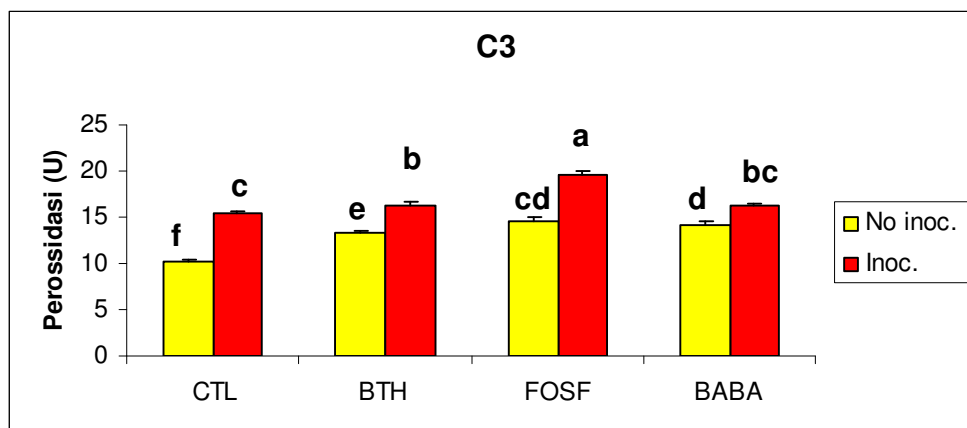


Fig. 34: Attività perossidasi presente negli estratti di piantine della varietà C3, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per $P \leq 0.05$.

I profili isoenzimatici delle perossidasi presenti negli estratti proteici ottenuti dai colletti della varietà C3 evidenziano la presenza della isoforma a pI 5, che compare in tutte le tesi inoculate ed anche sulla tesi trattata con KH_2PO_4 ma non inoculata (Fig. 35).

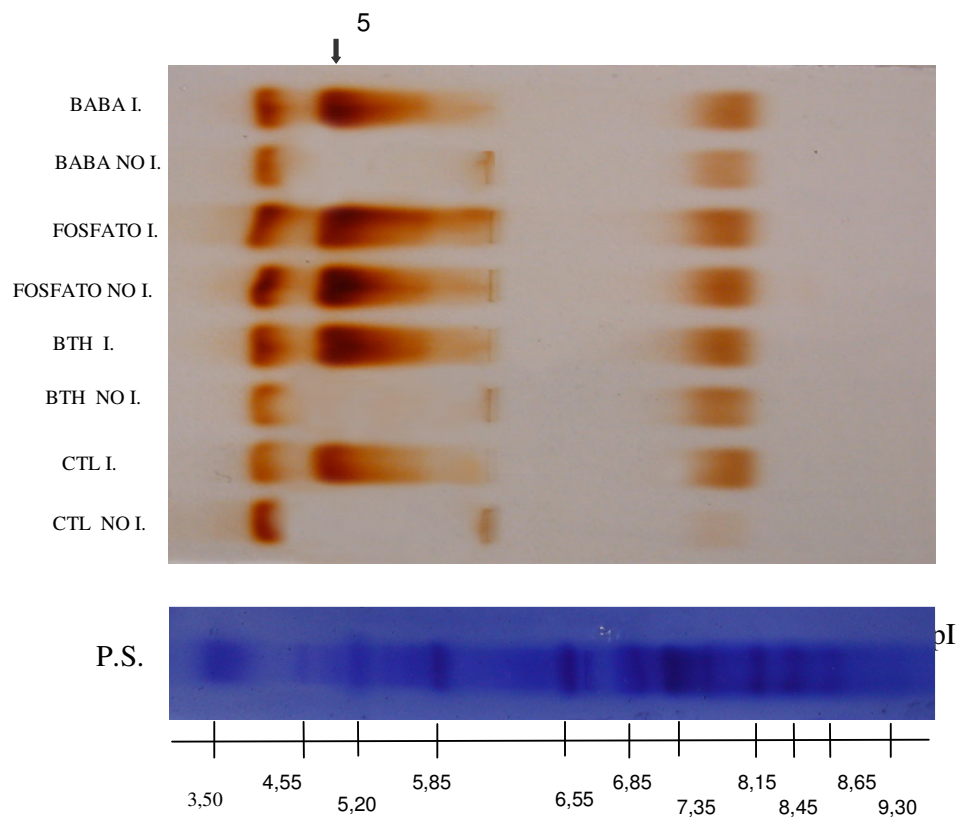


Fig. 35: Forme isoenzimatiche di perossidasi presenti negli estratti dei colletti di carciofo, varietà C3, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Punti isoelettrici stimati in alto. P.S.: pI delle proteine standard.

Per quanto concerne l'analisi quantitativa riguardante la varietà Exploter si può osservare un significativo aumento dell'attività perossidasi negli estratti dei tessuti inoculati che precedentemente erano stati trattati con KH_2PO_4 e BABA (Fig. 36).

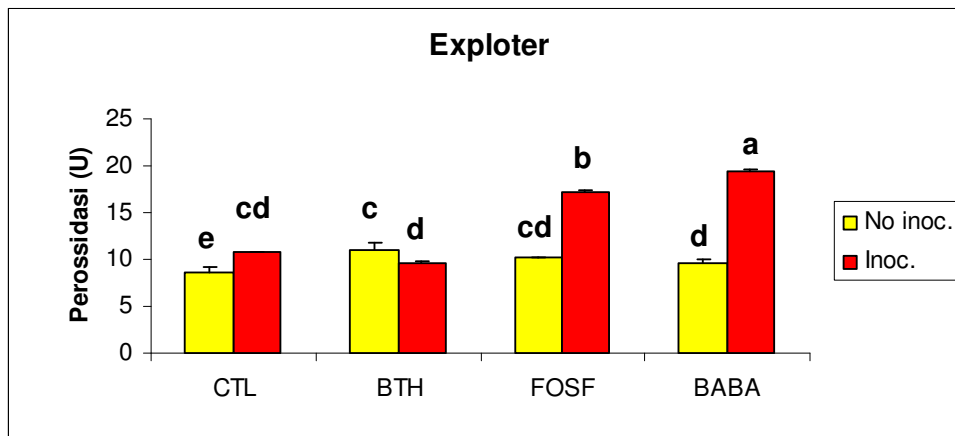


Fig. 36 Attività perossidasi presente negli estratti di piantine della varietà Exploter, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per $P \leq 0.05$.

I profili isoenzimatici delle perossidasi presenti negli estratti proteici ottenuti dalle piantine inoculate della varietà Exploter evidenziano la presenza di un'isoforma differenziale con pI 4,9 corrispondente ai campioni trattati con BABA e KH_2PO_4 e successivamente inoculati con *S. sclerotiorum* (Fig. 37).

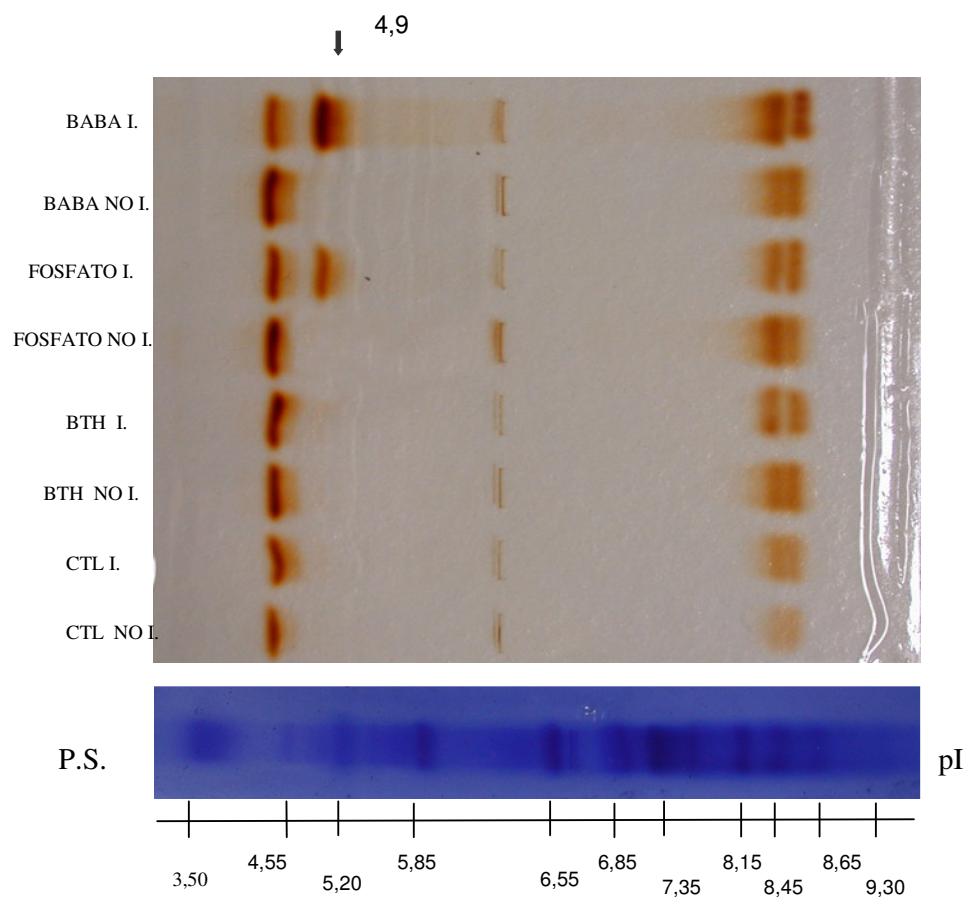


Fig. 37: Forme isoenzimatiche di perossidasi presenti negli estratti dei colletti di carciofo, varietà Exploter, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Punti isoelettrici stimati in alto. P.S.: pI delle proteine standard.

- GLUCANASI

Nel saggio quantitativo eseguito sulla varietà C3 si rileva un incremento dell'attività glucanasica nelle piante che sono state trattate con BABA e KH_2PO_4 e successivamente inoculate (Fig. 38).

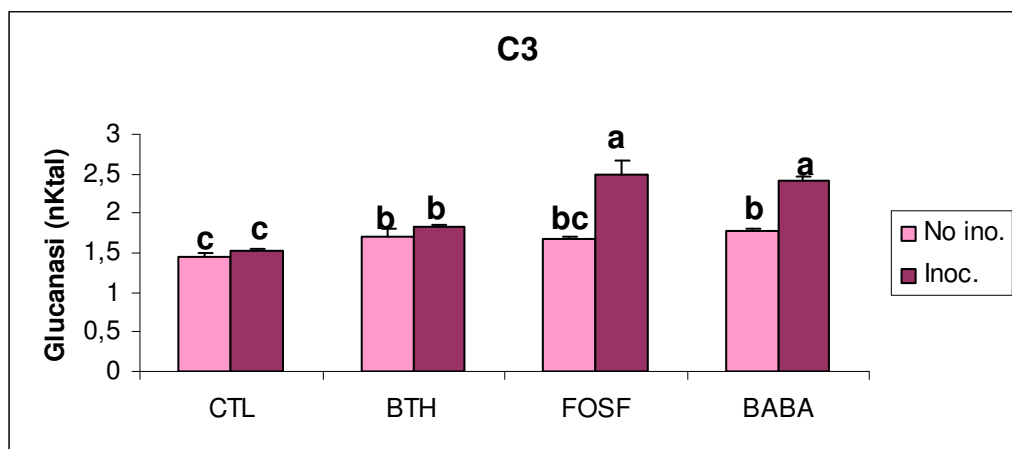


Fig. 38: Attività glucanasica presente negli estratti di piantine della varietà C3, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per $P \leq 0.05$.

Il saggio qualitativo per l'analisi delle glucanasi estratte da piantine della varietà C3 mostra la presenza delle numerose isoforme (Fig. 39). Tra esse l'isoforma con pI pari a 8,2 risulta indotta dalla presenza del patogeno.

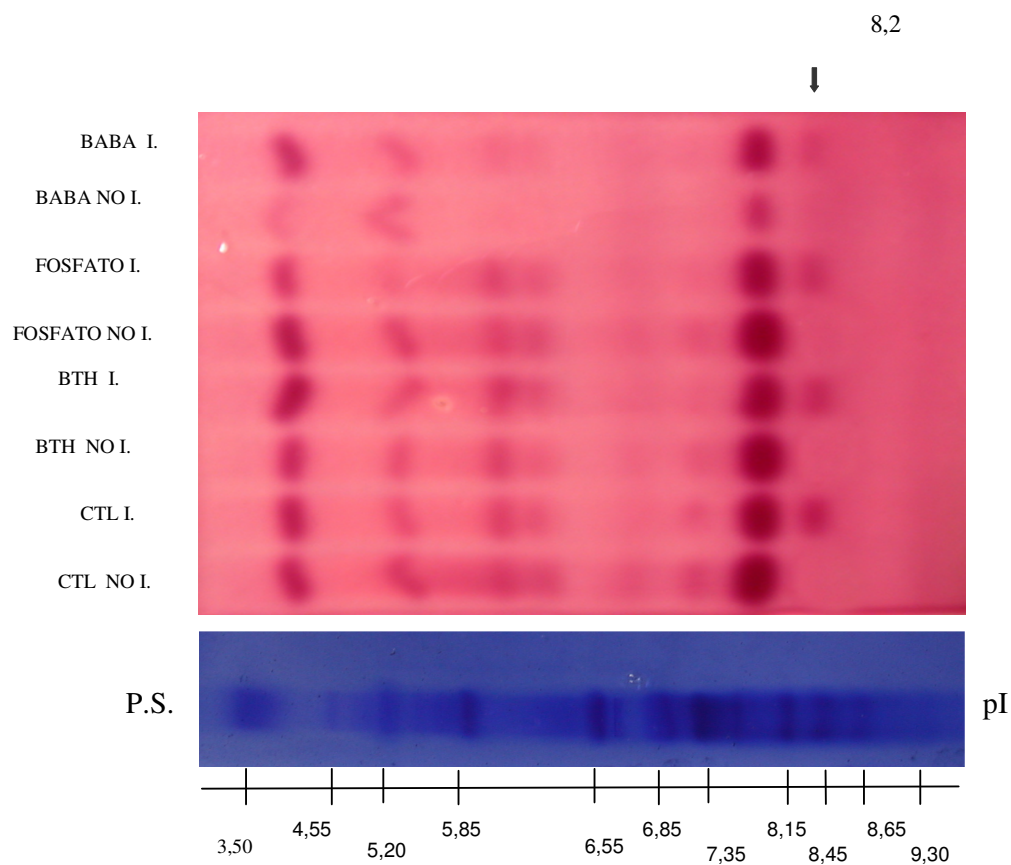


Fig. 39: Forme isoenzimatiche di glucanasi presenti negli estratti dei colletti di carciofo, varietà C3, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Punti isoelettrici stimati in alto. P.S.: pI delle proteine standard.

L'analisi quantitativa dell'attività glucanasica nella varietà Exploter dimostra un forte stimolo nelle piante di carciofo trattate con KH_2PO_4 ed inoculate; rilevanti sono pure gli incrementi di glucanasi indotti da BABA e da BABA più l'inoculo di *S. sclerotiorum*. (Fig. 40).

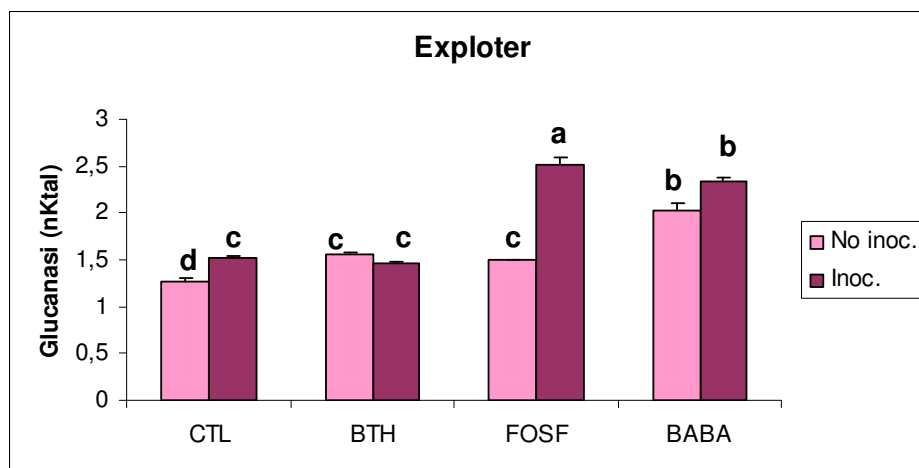


Fig. 40: Attività glucanasica presente negli estratti di piantine della varietà Exploter, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per $P \leq 0.05$.

Anche la varietà Exploter si mostra ricca di isoforme come quelle già riscontrate nelle piante C3, ed inoltre si notano le 2 isoforme con pI pari a 8,2 e 8,8 indotte dal patogeno nei campioni trattati con BABA e FOSFATO (Fig. 41).

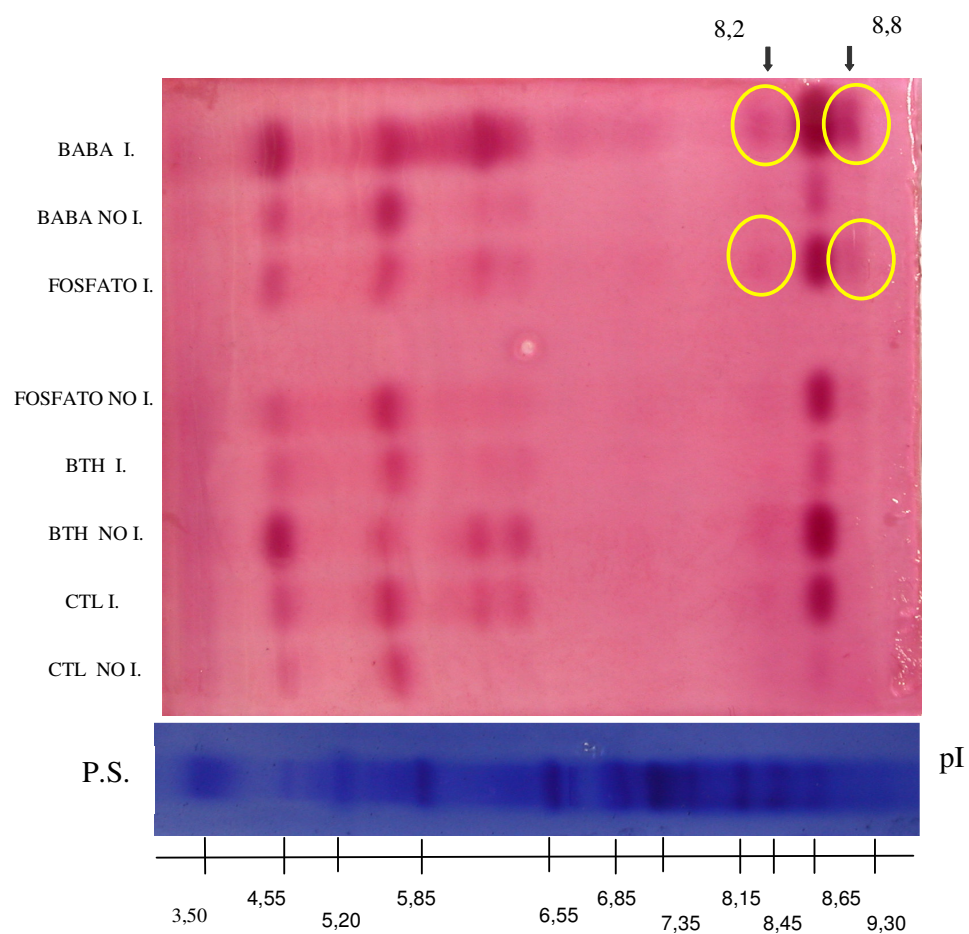


Fig. 41, Forme isoenzimatiche di glucanasi presenti negli estratti dei colletti di carciofo, varietà Exploter, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Punti isoelettrici stimati in alto. P.S.: pI delle proteine standard.

- CHITINASI

Il saggio quantitativo eseguito su piante della varietà C3 per saggiare l'attività chitinasica ha evidenziato un incremento significativo di quest'ultima negli inoculati precedentemente trattati con BABA (Fig. 42) dopo l' inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*.

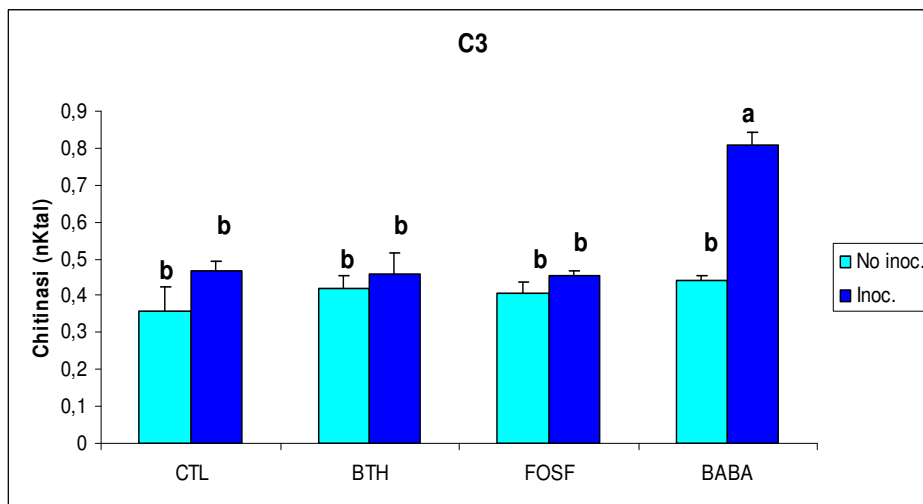


Fig. 42, Attività chitinasica presente negli estratti dei colletti della varietà C3, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per $P \leq 0.05$.

Il profilo isoenzimatico delle chitinasi nella varietà C3 presenta le quattro isoforme con pI pari rispettivamente a 5.40, 6.10, 8.65, 8.9, le prime due sono presenti solo negli estratti trattati con BABA e Fosfato e successivamente inoculati, le altre 2 isoforme invece sono presenti in corrispondenza di tutti gli estratti e perciò si tratta di isoforme costitutive della varietà C3 (Fig. 43).

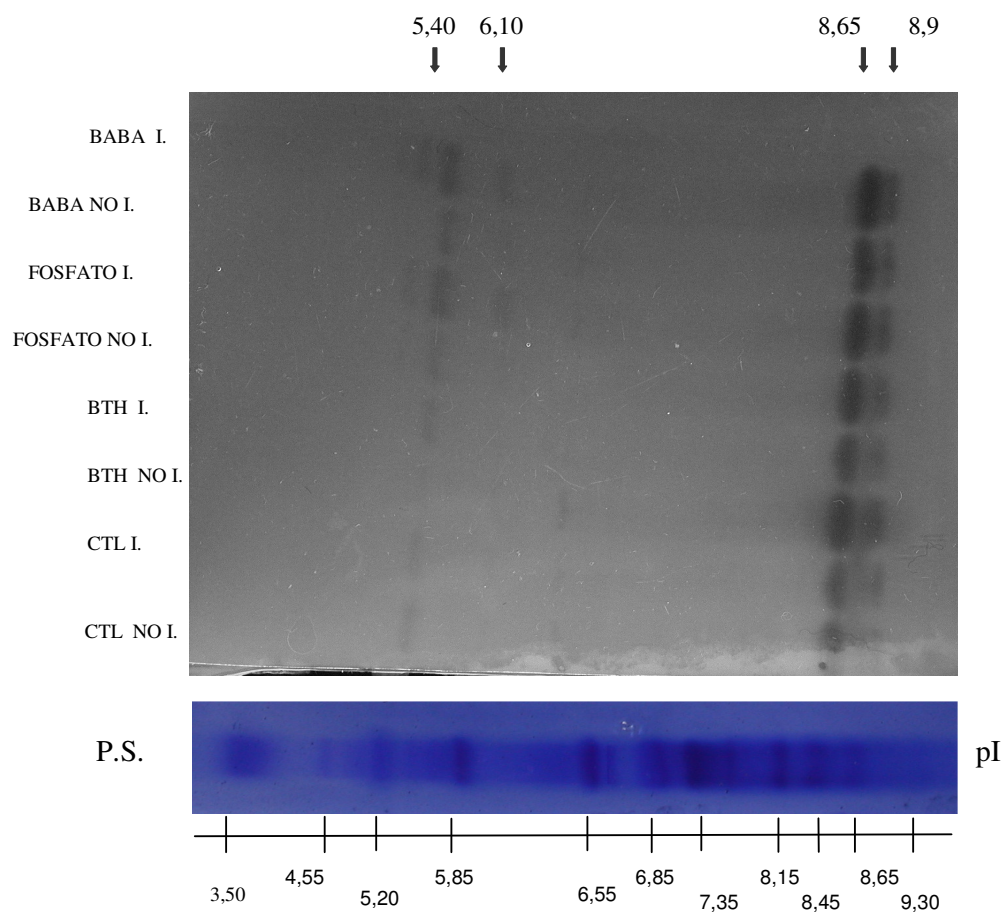


Fig. 43: Forme isoenzimatiche di chitinasi presenti negli estratti dei colletti di carciofo, varietà C3, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Punti isoelettrici stimati in alto. P.S.: pI delle proteine standard.

Nella varietà Exploter si è osservato un andamento dell'attività chitinasica simile a quello rilevato nella varietà C3, caratterizzato da incrementi piuttosto bassi (Fig. 44).

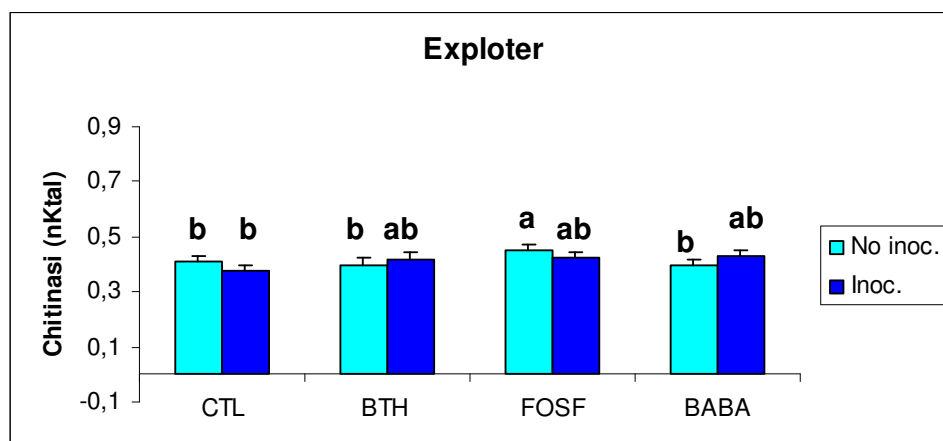


Fig. 44: Attività chitinasi presente negli estratti dei colletti della varietà Exploter, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per $P \leq 0.05$.

Le isoforme di chitinasi presenti in questo profilo isoenzimatico sono tutte costitutive in quanto presenti in corrispondenza di tutti gli estratti (Fig. 45).

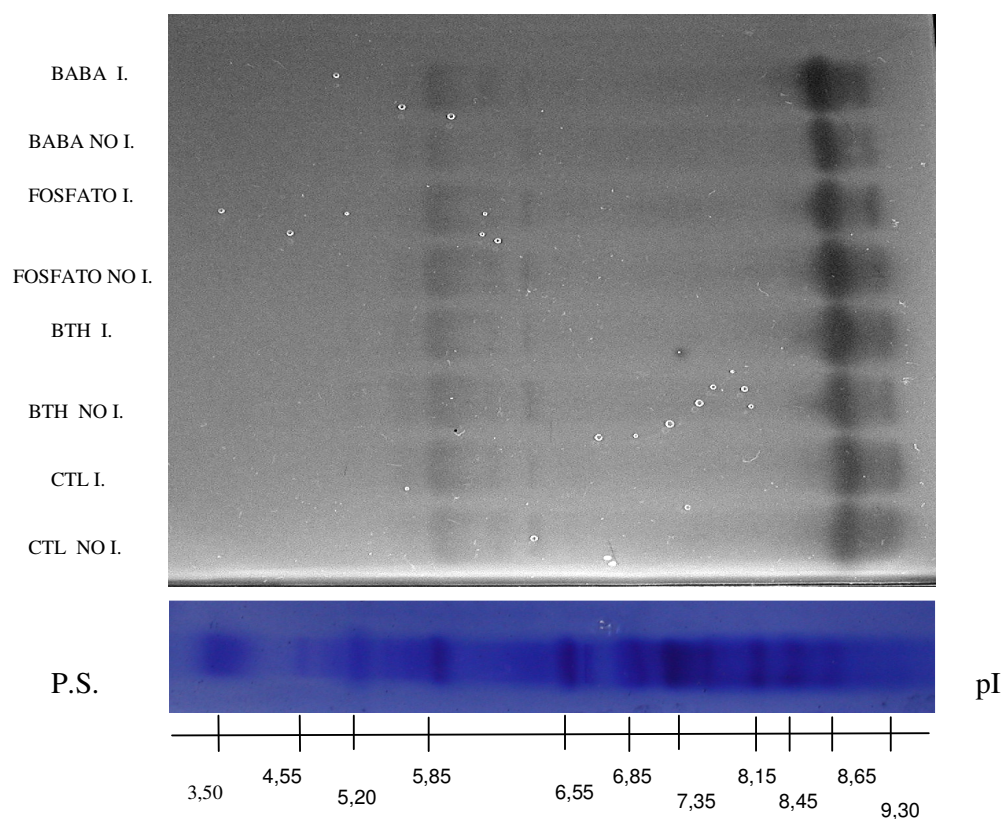


Fig. 45: Forme isoenzimatiche di chitinasi presenti negli estratti dei colletti di carciofo, varietà Exploter, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. P.S.: pI delle proteine standard.

4.6 INDUZIONE DI RESISTENZA SU PIANTE DI CARCIOFO IN CAMPO

Dopo le prove sperimentali con piantine in cella climatica sono stati saggiati gli stessi induttori, somministrati a livello fogliare su piante di carciofo direttamente in campo. Come nella prova condotta in cella climatica sono stati fatti 2 trattamenti con i 3 induttori a distanza di 2 settimane l'uno dall'altro e dopo una settimana dal secondo trattamento le foglie trattate sono state prelevate, portate in laboratorio e qui sono state inoculate con *S. sclerotiorum* (Fig. 46). Su queste sono state eseguite le stesse analisi per la determinazione delle attività enzimatiche (perossidasi, glucanasi e chitinasi). Le varietà prese in esame sono state ancora una volta C3 ed Exploter.

Il calcolo degli indici di malattia sulle 2 varietà dopo l'inoculazione ha dato i seguenti risultati (Fig. 47 e 48):



Fig. 46: Risultati dell'inoculazione delle foglie della varietà Exploter, dopo il trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. A destra 2 foglie non inoculate.

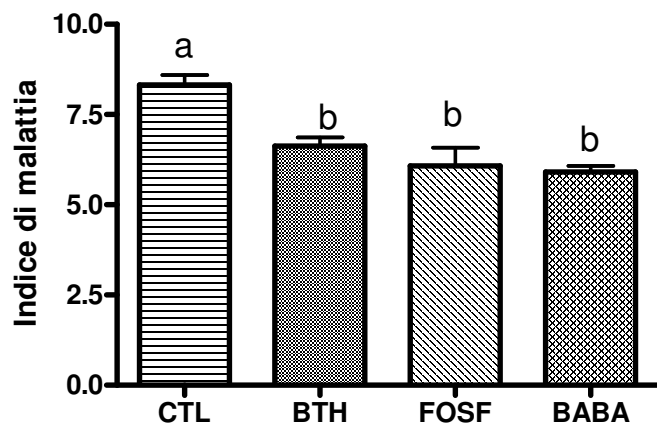


Fig. 47: Indici di malattia determinati su foglie di carciofo della varietà C3 precedentemente trattate.

Gli indici di malattia della varietà C3 indicano che tutti e tre gli induttori hanno efficacia nel contenimento della malattia e risultano significativamente diversi dal controllo. Nell'Exploter invece soltanto i valori delle tesi trattate con Fosfato e BABA sono significativamente diversi da quelli del controllo e tra i due BABA risulta il più efficace.

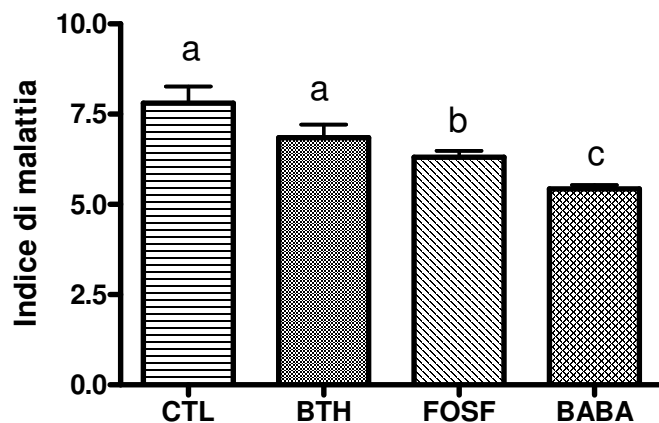


Fig. 48: Indici di malattia determinati su foglie di carciofo della varietà Exploter precedentemente trattate.

L'analisi quantitativa dell'attività perossidasi ha mostrato che l'induttore che più stimola la produzione di questo enzima, sia prima che dopo l'inoculazione, è il BTH (Fig. 49).

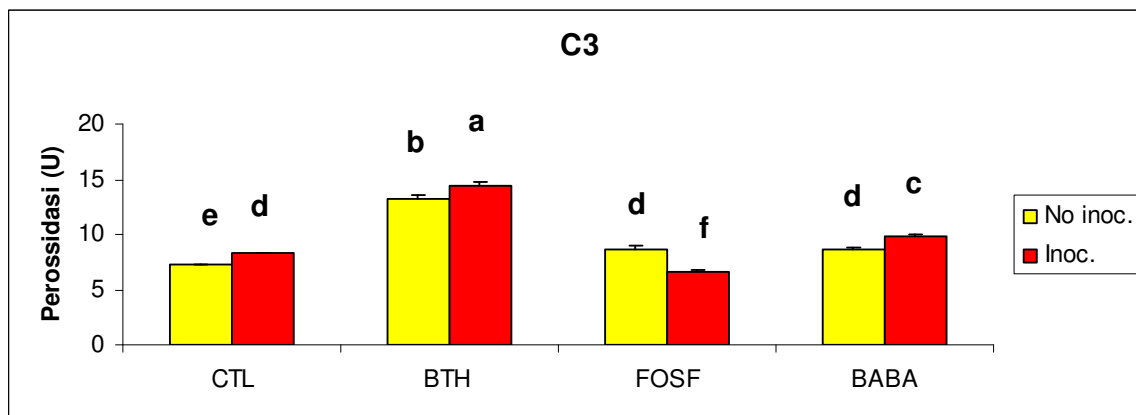


Fig. 49: Attività perossidasi presente negli estratti di foglie della varietà C3, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per $P \leq 0.05$.

Il profilo isoenzimatico delle per ossidasi nelle varietà C3 non mostra invece bande una corrispondente intensificazione nei campioni trattati con i 3 induttori ed inoculati (Fig. 50).

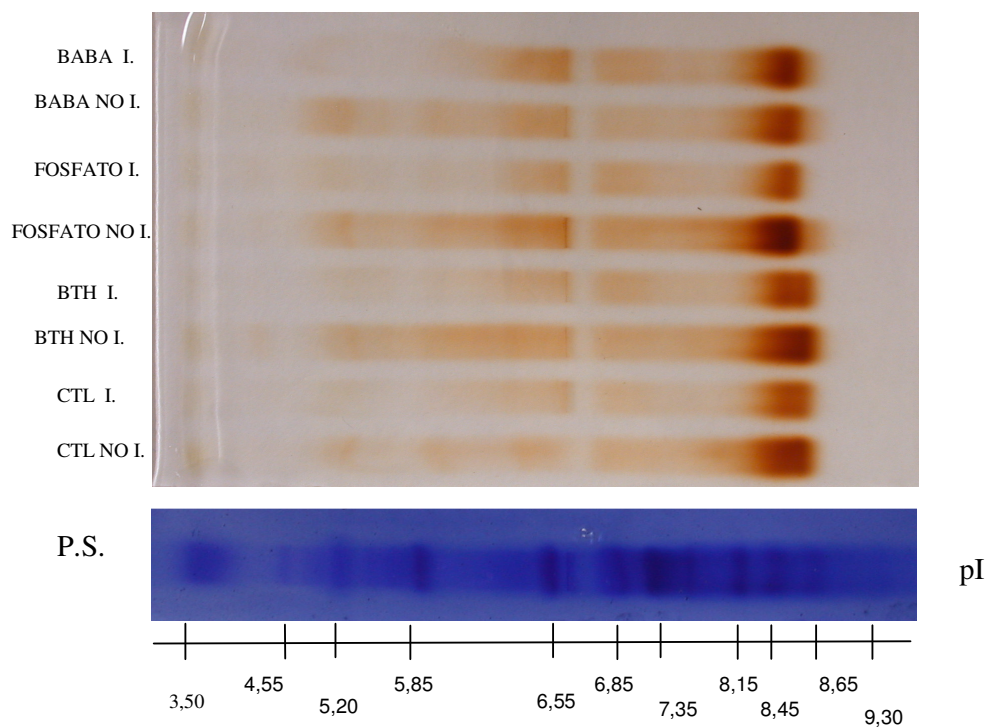


Fig. 50: Forme isoenzimatiche di perossidasi presenti negli estratti di foglie di carciofo, varietà C3, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. P.S.: pI delle proteine standard.

Nella varietà Exploter invece l'induttore che stimola la maggior produzione di perossidasi è BABA; questo dato è in accordo con l'indice di malattia osservato nelle foglie trattate con BABA dove si registrava il valore più basso (Fig. 51).

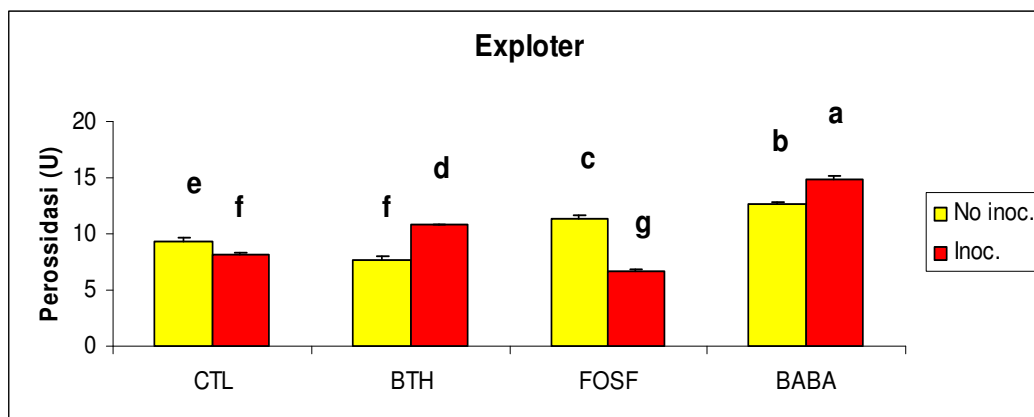


Fig. 51: Attività perossidasi presente negli estratti di foglie della varietà Exploter, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per $P \leq 0.05$.

Nel profilo isoenzimatico appare una isoforma basica avente pI pari a 8,9 in corrispondenza delle tesi trattate con BABA e con Fosfato ed inoculate; la stessa isoforma compare anche nella tesi di controllo inoculata e questo dimostra che l'isoforma è indotta esclusivamente dalla presenza del patogeno e non è correlabile con i due induttori (Fig. 52).

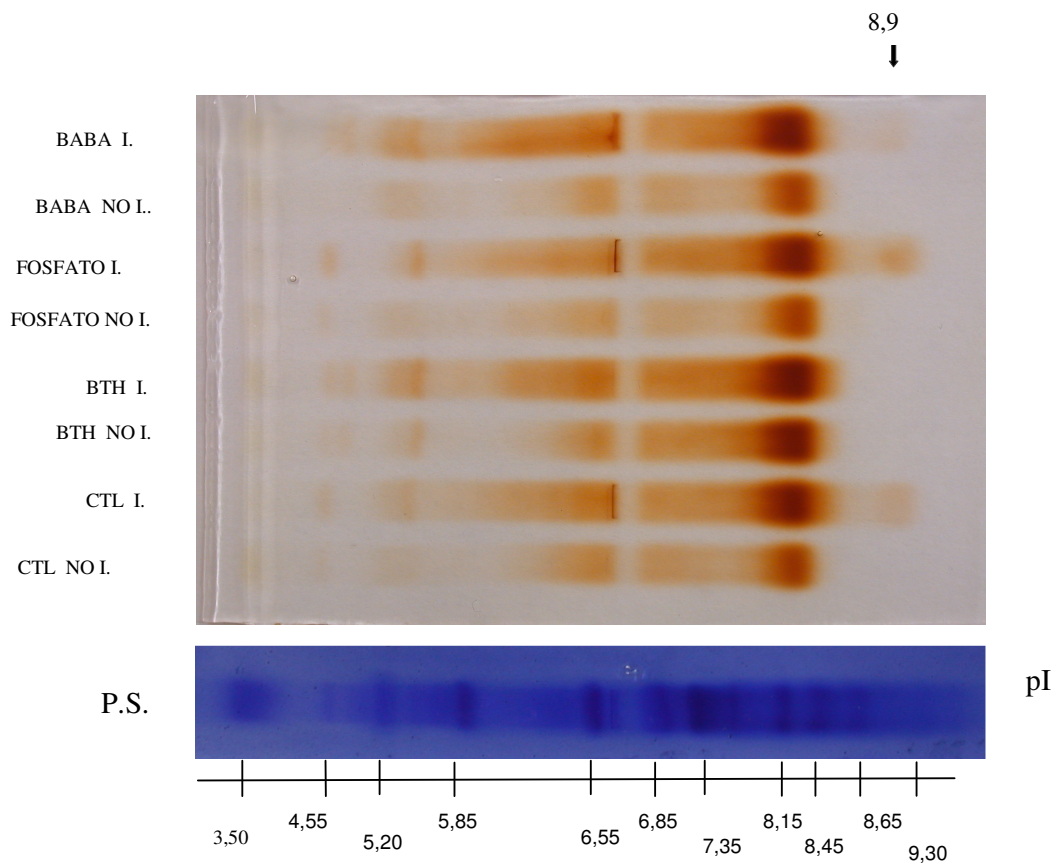


Fig. 52: Forme isoenzimatiche di perossidasi presenti negli estratti di foglie di carciofo, varietà Exploter, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Punti isoelettrici stimati in alto. P.S.: pI delle proteine standard.

Dalle analisi delle glucanasi si osserva che il BABA è l'induttore più efficace; in special modo dopo l'inoculo sulla tesi trattata con questo induttore si registrano valori di glucanasi molto elevati (Fig. 53).

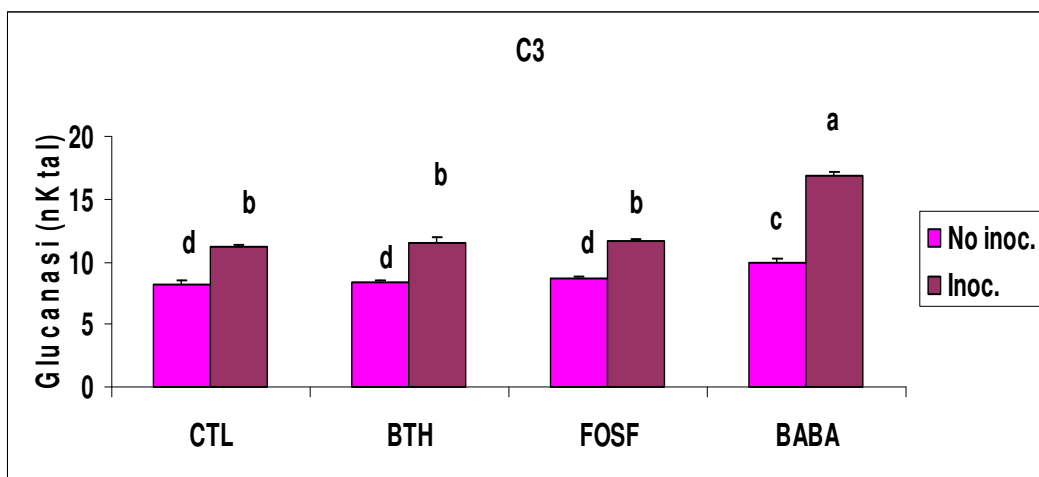


Fig. 53: Attività glucanasica presente negli estratti di foglie della varietà C3, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per $P \leq 0.05$.

Nel profilo isoenzimatico delle glucanasi si notano nuove isoforme solo nelle foglie trattate con i 3 induttori ed inoculate; queste nuove isoforme hanno rispettivamente pI pari a 4,2 ; 6,2; 6,9 e 7,5 (Fig. 54).

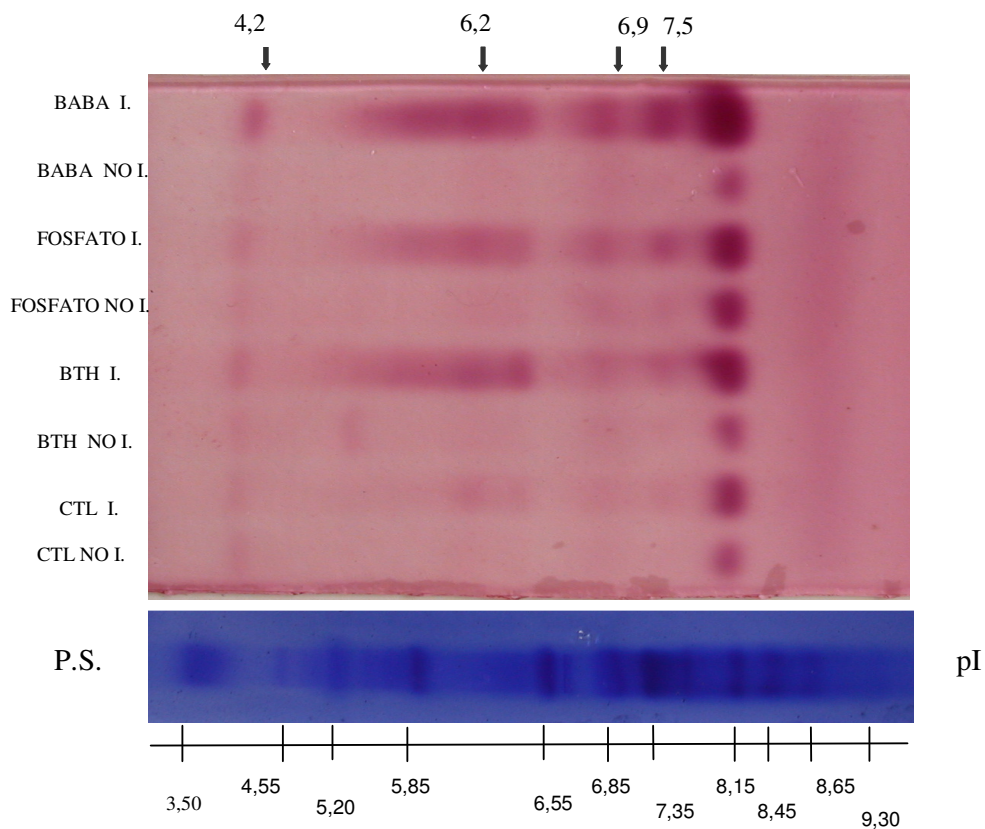


Fig. 54: Forme isoenzimatiche di glucanasi presenti negli estratti di foglie di carciofo, varietà C3, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Punti isoelettrici stimati in alto. P.S.: pI delle proteine standard.

Nella varietà Exploter gli induttori che stimolano maggiormente la produzione di glucanasi sono il Fosfato e il BABA; in particolar modo BABA dopo l'inoculazione fa registrare anche in questo caso l'incremento più elevato (Fig. 55).

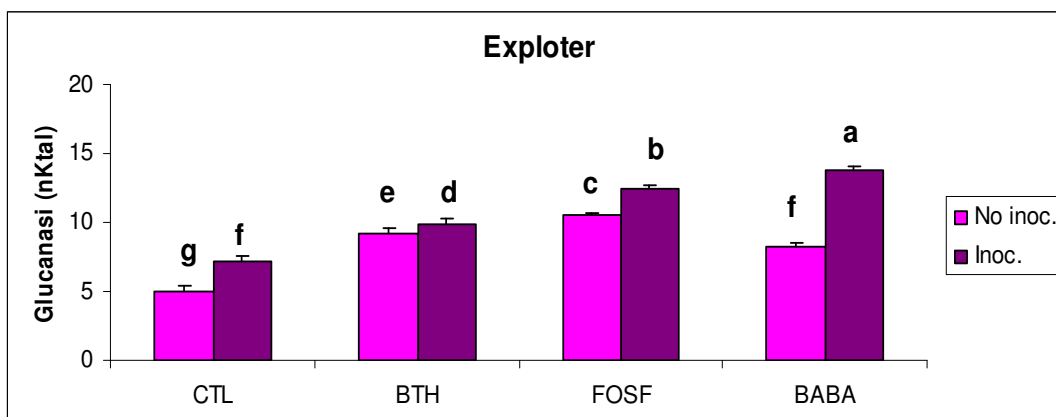


Fig. 55: Attività glucanasica presente negli estratti di foglie della varietà Exploter, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Lettere diverse indicano valori statisticamente significativi per $P \leq 0.05$.

Dall'analisi qualitativa compare una banda debolmente marcata con pI pari a 8,2 presente nel campione di foglie trattate con Fosfato e non inoculate (Fig. 56).

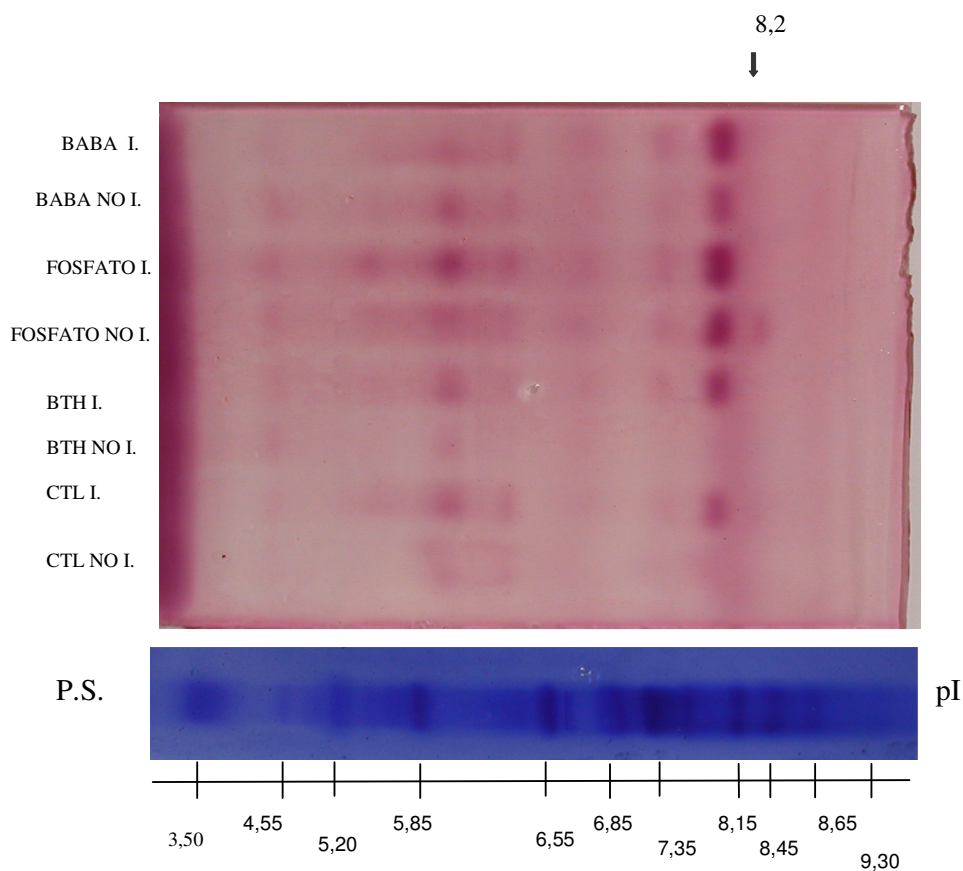


Fig. 56: Forme isoenzimatiche di glucanasi presenti negli estratti di foglie di carciofo, varietà Exploter, dopo trattamento con induttori di resistenza e successiva inoculazione con *Sclerotinia sclerotiorum*. Punti isoelettrici stimati in alto. P.S.: pI delle proteine standard.

Infine, non si riportano infine i risultati relativi alle chitinasi perché, sia all'analisi quantitativa che a quella qualitativa, non mostravano risultati importanti o significativamente diversi dal controllo.

5. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni si è assistito ad un progressivo declino della produzione del carciofo nel Lazio ed in altre regioni dell'Italia Centrale; una rivalutazione di questa importante coltura può passare attraverso proposte di innovazione tecnologica. Tra queste non può mancare il settore della difesa fitosanitaria con l'utilizzo di agro farmaci a basso impatto e di varietà resistenti nei confronti dei parassiti. Per contrastare le malattie più pericolose di questa coltura, in particolare il marciume del colletto causato da *S. sclerotiorum* (Amenduni *et al* 2006), questa tesi si è proposta di dare un contributo alla comprensione delle basi della resistenza costitutiva ed indotta per conseguire informazioni per un utilizzo razionale dei moderni mezzi di difesa. A questo proposito le azioni intraprese per arrivare ad una razionale difesa del carciofo sono state le seguenti: monitoraggio dei principali patogeni del carciofo e osservazione delle condizioni ambientali; valutazione delle caratteristiche di resistenza delle diverse varietà prese in esame; verifica dell'efficacia di 3 induttori di resistenza a basso profilo tossicologico, che permetterebbero così la realizzazione di una lotta di tipo preventivo.

Nella presente ricerca tra i patogeni fungini rilevati in campo, *B. lactucae*, agente della peronospora, sembra mostrare una diffusione in tutte le varietà. L'incidenza di malattia risulta quantitativamente più significativa nella primavera 2007; questo dato è supportato dal fatto che l'andamento climatico relativo di quell'annata (trimestre marzo-maggio), è stato caratterizzato da un elevato tasso di umidità relativa, parametro che rappresenta una condizione fondamentale per lo sviluppo e la diffusione di questo temuto parassita (Matta and Garibaldi, 1981). Nello specifico, comparando le percentuali di infezione, si evidenzia come la varietà Exploter, risulti la più colpita, seguita da Apollo, mentre al contrario Giove si dimostra la varietà più resistente. In seguito a questi rilievi possiamo ritenere che Exploter, una tra le più promettenti varietà di recente costituzione, sia anche quella più suscettibile a *B. lactucae*; fortunatamente, anche se si tratta di un patogeno che fa la sua comparsa nelle carciofaie ogni primavera, in genere non presenta massicci livelli di attacco da compromettere la produzione e quindi giustificare trattamenti chimici.

Lo stato fitosanitario della carciofaia sperimentale compromesso dalla diffusione di diverse virosi, rispecchia una situazione comune a molte carciofaie laziali (Pasquini and Barba, 2001). Già nel primo anno di vita dell'impianto si sono mostrati evidenti sintomi di virosi su tutte le varietà e questo fa dedurre che l'unico importante mezzo di difesa contro questa

patologia è l'uso di materiale sano; vista l'elevata diffusione delle virosi oggi risulta sicuro soltanto il materiale di propagazione risanato da virus, risanamento che di solito avviene per termoterapia e con tecniche di micropropagazione (Barba e Di Lernia, 2006; Gallitelli *et al.* 2004). Durante il secondo e terzo anno aumenta l'intensità d'infezione e questo è da collegarsi alla presenza di afidi e alla loro azione di vettori di virus.

Per quanto riguarda i marciumi del colletto da *S. sclerotiorum* si può notare l'incremento nei 3 anni del numero di piante colpite da questo fungo patogeno all'interno della carciofaia; ciò nonostante, non è stato possibile invece individuare una varietà particolarmente tollerante o suscettibile a questa malattia; per questo motivo e trattandosi di una delle patologie più temute è necessario contrastarla possibilmente con mezzi a basso impatto ambientale. A questo proposito è stato importante saggiare l'efficacia di 3 sostanze in grado di stimolare la pianta a difendersi dai patogeni, i cosiddetti induttori chimici di resistenza. La scelta delle varietà Exploter e C3 per la realizzazione della prova sull'induzione di resistenza, da parte di BTH, BABA e KH_2PO_4 , è stata fatta in quanto la prima è una cultivar recentemente introdotta, tra le più promettenti mentre la seconda è una varietà già collaudata, diffusa ampiamente nell'areale laziale. Gli indici di malattia calcolati su piante precedentemente trattate e poi inoculate con *S. sclerotiorum* hanno messo in evidenza che l'applicazione dei tre induttori determina un aumento di resistenza, in entrambe le cultivar, rispetto al controllo. Questo avviene in maniera più significativa nella varietà Exploter in seguito al trattamento con il BABA.

La capacità di alcuni composti, di stimolare l'attivazione delle strategie di difesa della pianta, può essere sfruttata per sviluppare nuove modalità di intervento e strategie di lotta che riducano i rischi di nocività per l'ambiente e per la salute umana (Pajot and Le Roux, 2007). Numerosi lavori in letteratura hanno mostrato l'efficacia di questi 3 induttori su diverse colture. Ad esempio BABA si è dimostrato attivo su patata (Olivieri *et al.*, 2009), vite (Slaughter *et al.*, 2008), lattuga (Pajot *et al.*, 2001); BTH nelle piante di caffè (Patricio *et al.*, 2007), pepe (Buonaurio *et al.*, 2002), melo (Bengtsson *et al.*, 2008), nella vite (Iriti *et al.*, 2004), melone (Buzi *et al.*, 2004); FOSFATO in frutti di bosco (Reuveni and Reuveni, 1995), cocomero (Hans *et al.*, 1989). Questo argomento non è stato mai trattato su piante della famiglia delle *Compositae* e a questo proposito la presente ricerca si è concentrata su una composita molto importante in agricoltura come il carciofo. Si è scelto di operare sulle due varietà C3 ed Exploter contemporaneamente per verificare se piante molto simili tra loro siano in grado di mettere in atto strategie di difesa diverse. I parametri presi in esame come criterio per giudicare l'eventuale induzione di resistenza sono state 3 proteine PR

appartenenti a classi diverse: PR-9 (perossidasi), PR-2 (β -1,3-glucanasi) e PR-8 (chitinasi) considerate tutte e tre ottimi marcatori biochimici della SAR (resistenza sistemica acquisita). Per quanto riguarda le perossidasi, si può notare che in entrambe le varietà saggiate c'è una induzione dell'attività enzimatica nelle piante trattate che aumenta significativamente dopo il secondo trattamento. In particolare, nella varietà Exploter, il BTH sembrerebbe più efficace degli altri due induttori. Al dato quantitativo si associa anche il dato qualitativo che mostra come BTH, BABA e KH_2PO_4 siano in grado di promuovere l'espressione di una isoforma basica (pI 8,9) non presente sulle piante controllo, in entrambe le varietà. In Exploter si può notare un numero maggiore di isoforme di natura costitutiva rispetto al C3. Dunque tutti e tre gli induttori sono in grado di stimolare la pianta nella produzione di perossidasi e la maggiore efficacia del BTH è confermata in letteratura da studi condotti su melone (Buzi *et al.*, 2004) e soia (Hoffmann *et al.*, 2003). E' da notare infine come la quantità di proteina PR aumenta con il secondo trattamento confermando l'effetto somma dei due trattamenti e assicurando la durata nel tempo dell'effetto avuto con il primo trattamento.

Arrivando al secondo tipo di proteine PR saggiate, le glucanasi, si può notare che nella varietà C3 gli incrementi quantitativi della proteina nelle tesi trattate con i 3 induttori sono più consistenti rispetto a quelli della varietà Exploter. Infatti in Exploter l'unico incremento rilevante risulta essere quello in corrispondenza della tesi trattata con FOSFATO e questo dato trova riscontro anche all'analisi qualitativa con la comparsa di una isoforma basica (pI = 8,8). Nel profilo isoenzimatico della varietà C3 come in Exploter sono presenti diverse isoforme, ma in questo caso si tratta di isoforme da imputare alla resistenza costitutiva.

La terza categoria di proteine PR analizzata in questa ricerca è stata quella delle chitinasi. Nessuno dei tre induttori utilizzati risulta in grado di indurre significativi incrementi di attività chitinasica e le isoforme individuate sono in numero molto ridotto. Evidentemente questa specie non risulta sensibile all'induzione di resistenza da parte dei composti saggiati per quanto riguarda la produzione di chitinasi. Anche in letteratura sono riportati casi nei quali il trattamento con BTH in piante di cotone contro *Verticillium dahliae* (McFadden *et al.*, 2001), in piante di frumento contro *Fusarium graminearum* (Yu and Muehlbauer, 2001) e di piante di cavolfiore contro *Peronospora parasitica* (Ziadi *et al.*, 2001) non ha indotto la sintesi di chitinasi.

Un'ulteriore fase di questa tesi ha riguardato lo studio degli effetti dell'infezione di *S. sclerotiorum* su piante di carciofo che erano state trattate in precedenza con BTH, BABA e KH_2PO_4 . L'obiettivo è stato quello di verificare l'efficacia degli induttori chimici di

resistenza nel contenere i marciumi del colletto, contro i quali la lotta è molto difficile per i seguenti motivi: elevata polifagia del patogeno, elevata resistenza degli sclerozi nel terreno, facilità di trasmissione del patogeno attraverso carducci e ovoli, mancanza in commercio di principi attivi efficaci per contenere questa malattia (Amenduni *et al.*, 2006).

Il saggio quantitativo eseguito sull'estratto proteico delle piante appartenenti alla varietà C3 evidenzia come la presenza del patogeno fungino sia in grado di incrementare l'attività perossidasi nei colletti infettati di tutte le tesi compreso il controllo non trattato ma inoculato. In particolare il KH_2PO_4 risulta essere l'induttore in grado di stimolare maggiormente la varietà C3 a produrre perossidasi nel momento in cui essa viene attaccata da *S. sclerotiorum*. Il profilo isoenzimatico conferma questa capacità d'induzione da parte del KH_2PO_4 , che si conferma efficace come induttore ed in grado di far comparire una nuova isoforma perossidasi anche in assenza del patogeno, questa nuova isoforma appare infatti nella tesi trattata con KH_2PO_4 sia inoculata che non inoculata.

Nella varietà Exploter si può osservare un comportamento diverso in quanto solo le piante che sono state trattate con KH_2PO_4 e BABA riescono ad incrementare in modo significativo l'attività perossidasi in presenza del patogeno fungino e questo viene confermato all'analisi qualitativa con la comparsa di 1 isoforma non costitutiva con pI pari a 4,9 in corrispondenza delle piante trattate con BABA e con KH_2PO_4 e inoculate successivamente con *S. sclerotiorum*. Al contrario di quanto si è verificato nella precedente prova su foglie, in cui l'isoforma perossidasi indotta era di natura basica, in questo caso il saggio qualitativo evidenzia l'induzione di una isoforma acida. Lo studio condotto sulle glucanasi, mediante saggio quantitativo, evidenzia la capacità degli induttori chimici di incrementare nella pianta l'attività glucanasica nel momento dell'attacco del patogeno.

In letteratura sono riportati casi in cui alcune proteine PR si accumulano maggiormente nelle foglie trattate con induttori, prima dell'attacco del patogeno, piuttosto che nei controlli pre-trattati con acqua (Suo and Leung 2002; Zimmerli *et al.*, 2000). È stato ipotizzato che il trattamento con l'induttore chimico "condizioni" la pianta nel produrre l'm-RNA di certe proteine PR più rapidamente. In entrambe le varietà questa situazione si verifica in seguito ai trattamenti con BABA e KH_2PO_4 . L'analisi qualitativa mostra la presenza di numerose isoforme anche se queste per la maggior parte sembrerebbero di natura costitutiva e solo nella varietà C3 la glucanasi con punto isoelettrico più basico (pI 8.8) appare indotta, ma dalla sola presenza di *S. sclerotiorum*.

Infine, lo studio delle chitinasi mostra un incremento quantitativo dell'attività chitinasi solo in corrispondenza delle piantine trattate con BABA ed inoculate. L'esame qualitativo

delle chitinasi mostra che nella varietà C3 il BABA e il KH_2PO_4 sono in grado di incrementare l'attività enzimatica nei colletti inoculati e di indurre due isoforme acide che hanno rispettivamente pI pari a 5,30 e 6,10. Nella varietà Exploter invece non si riscontrano dati significativamente rilevanti sia nell'analisi quantitativa che in quella qualitativa.

Una ulteriore prova affrontata in questa ricerca è stata quella di saggiare l'efficacia dei suddetti tre induttori direttamente in campo applicandoli al livello fogliare su piante adulte delle varietà C3 ed Exploter, in modo da confermare o smentire quanto riscontrato in cella di crescita su piantine giovani e in condizioni climatiche e di fotoperiodo standard.

A tal proposito i risultati dell'attività perossidasi mostrano che nella varietà C3 soltanto il BTH promuove un discreto aumento delle perossidasi dal punto di vista quantitativo; nel profilo isoenzimatico di questa varietà si notano invece unicamente isoforme costitutive. In Exploter invece l'induttore che meglio promuove l'incremento quantitativo delle perossidasi è il BABA e nell'analisi qualitativa si riscontra una banda differenziale dovuta però unicamente all'effetto del patogeno.

Per quanto riguarda le glucanasi è ancora il BABA che si dimostra l'induttore più efficace dal punto di vista quantitativo; il profilo qualitativo mostra invece isoforme nuove che compaiono in corrispondenza di tutte e tre le tesi trattate con induttori ed in quelle inoculate. Nelle analisi dell'attività chitinasi di entrambe le varietà non si evidenziano risultati significativamente rilevanti sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo.

6. CONCLUSIONI

I risultati emersi da questo lavoro hanno fornito un contributo sugli aspetti epidemiologici di alcune importanti malattie fungine del carciofo ed inoltre, hanno procurato ulteriori indicazioni circa l'utilizzo degli induttori chimici di resistenza, informazioni che per questa coltura erano ancora molto scarse. E' stato possibile dedurre che le avversità più importanti che colpiscono il carciofo nell'areale di coltivazione laziale sono: le virosi, la peronospora, l'oidio ed i marciumi del colletto. L'elevata presenza di virosi che arriva ad interessare anche la quasi totalità delle piante non provoca fortunatamente perdite produttive rilevanti e l'unico mezzo per contrastarle è ricorrere a materiale di propagazione sano e certificato. L'elaborazione e l'analisi dei dati raccolti hanno messo in evidenza la suscettibilità della varietà Exploter nei confronti dell'agente patogeno *Bremia lactucae*; ma nonostante ciò questo dato non desta preoccupazioni in quanto gli attacchi primaverili di *Bremia lactucae*, in genere, non mettono in pericolo la produzione o la durata della vita delle piante e non richiedono interventi chimici se non in annate eccezionalmente piovose. Così accade anche per l'oidio, che nel carciofo può destare preoccupazioni solo se colpisce piantine in vivaio o appena trapiantate.

E' invece da sottolineare l'importanza del marciume del colletto, di cui l'agente causale più importante è *S. sclerotiorum*, che risulta essere la patologia fungina più pericolosa per il carciofo, perché in grado di portare progressivamente a morte piante adulte e ridurre così la durata economica della carciofaia.

Relativamente ai meccanismi di resistenza indotta è stato possibile osservare come l'applicazione di alcuni dei prodotti induttori della SAR, abbia contribuito alla comparsa nella pianta di proteine di difesa. L'efficacia nell'indurre resistenza da parte dei tre induttori chimici presi in esame è stata dimostrata dalla comparsa di forme isoenzimatiche nuove nelle analisi qualitative e, per quanto riguarda i dosaggi quantitativi, dall'incremento dei valori di attività enzimatica. La risposta di difesa della pianta avviene principalmente tramite l'attivazione di alcune isoforme di perossidasi e glucanasi. L'indice di malattia riscontrato in seguito all'inoculazione con *S. sclerotiorum* è risultato più basso nelle piante indotte, in particolare in quelle trattate con BABA. Anche dalle analisi qualitative e quantitative sulla presenza delle 3 proteine PR prese in esame si riscontra una elevata presenza del BABA come migliore induttore tra i tre saggiati

Il fatto che il BABA e, in minor misura, il Fosfato siano gli induttori più efficaci per il controllo del fungo patogeno saggiato, *S. sclerotiorum*, risulta in accordo con quanto

segnalato in altri casi sperimentali; gli autori di queste ricerche concludono che il BTH, avendo un meccanismo d'azione che porta all'accumulo di H_2O_2 nelle cellule dell'epidermide, favorisce il fenomeno di risposta ipersensibile da parte della pianta fino ad arrivare a fenomeni di "morte cellulare programmata" dalla quale sarebbero svantaggiati i patogeni biotrofi in quanto obbligati a svilupparsi su cellule vive, mentre potrebbero trarne vantaggio i patogeni necrotrofi (Van Loon *et al.*, 2006; Glazebrook, 2005).

L'interazione pianta-patogeno considerata ha visto quale protagonista un patogeno spiccatamente necrotrofo come *S. sclerotiorum*, che non ha permesso di conseguire risposte significative sul fronte della resistenza indotta dal BTH; al contrario il BABA ha dimostrato di essere efficace nell'indurre resistenza contro *S. sclerotiorum* nelle piante di carciofo, stimolando nella pianta la produzione di proteine PR, che verosimilmente hanno concorso alla diminuzione dell'indice di malattia nelle piante indotte ed inoculate rispetto alle piante controllo inoculate.

Precedenti ricerche hanno dimostrato che BABA è in grado di indurre resistenza in altre specie vegetali nei confronti di agenti patogeni appartenenti ad oomiceti, funghi, batteri e virus (Hwang *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 1999; Pajot *et al.*, 2001; Slaughter *et al.*, 2008; Olivieri *et al.*, 2009). Tuttavia i meccanismi mediante i quali BABA induce resistenza nelle piante sono ancora poco noti. Infatti, non è ancora stato chiarito se la resistenza indotta da BABA coinvolga il pathway dell'acido salicilico od un altro pathway.

È noto che la stimolazione delle reazioni di difesa nelle piante coinvolge una serie di cicli metabolici tra loro interattivi. L'induzione di resistenza sistemica avviene almeno attraverso due percorsi metabolici, uno dipendente dall'acido salicilico ed un secondo che coinvolge i composti metil jasmonato/etilene come composti intermedi chiave (Thaler *et al.*, 2004; Niki *et al.*, 1998).

Alla luce di queste evidenze e speculazioni la somministrazione di BTH può dare risultati soddisfacenti solo se dosato al meglio, cioè fornendo alla pianta la quantità precisa di induttore che stimoli una produzione di H_2O_2 tale da ostacolare, nel nostro caso, *S. sclerotiorum* nella fase di penetrazione, ma allo stesso tempo non eccessiva da portare a "morte cellulare programmata" la cellula stessa della pianta ospite.

In conclusione questa ricerca ha dimostrato che l'utilizzo degli induttori chimici di resistenza rimane una strada interessante da percorrere nell'ottica di trattamenti limitati e a basso impatto ambientale, in quanto anche la pianta di carciofo è in grado di giovare della resistenza indotta, e che tra i tre induttori di resistenza saggiati quello più promettente per il carciofo è risultato BABA.

7. BIBLIOGRAFIA

- **Acquadro A., Portis E., Albertini A., Lanteri s. 2005.** M-AFLP based protocol for microsatellite loci isolation in *Cynara cardunculus* L. (Asteraceae). *Molecular Ecology Primer Notes.* 5, 272-274.

- **Acquadro A., Portis E., Lee D., Donini P., Lanteri S., 2005.** Development and characterisation of microsatellite markers in *Cynara cardunculus* L. *Genome.* 48, 217-225.

- **Agrios G. N., 2005.** *Plant Pathology* 5 ed. Elsevier Academic Press. Berlington.

- **Alexander D., Goodman R. M., Gut-Rella M., Gascock C., Weyman K., Friedrich L., Maddox D., Ahl-Goy P., Luntz T., Ward E., Ryals J., 1993.** Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. of Sci.* 90, 7327-7331.

- **Amenduni M., Marras F., Cirulli M., 2006.** Le malattie fungine più importanti del carciofo. Atti convegno “Il carciofo dal laboratorio al mercato” , 28-29. Roma.

- **Antoniw J.F., Ritter C.E., Pierpoint W.S. and Van Loon L.C., 1980.** Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal of General Virology.* 47, 79-87.

- **Arahana, V.S, G.L. Graef, J.E. Specht, J.R. Steadman, and K.M. Eskridge. 2001.** Identification of QTL's for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Crop Science.* 41,180-188.

- **Ayers, W.A., Adams, P.B., 1981.** Mycoparasitism and its application to biological control of plant diseases. *Appl. Environ. Micro- biol.* 11, 1123-27.

- **Barba M., Di Lernia g., Bades G., Citrulli F., 2004.** Produzione e conservazione di germoplasma di carciofo romanesco esente da virus. *Italus Hortus.* 11, 5-10.

- **Bengtsson M., Wulff E., Lyngs Jorgensen H. J., Pham A., Lübeck M., Hockenhull J., 2008.** Comparative studies on the effects of a yucca extract and acibenzolar-S-methyl (ASM) on inhibition of *Venturia inaequalis* in apple leaves. Eur. J. Plant Pathol. Published online.

- **Bert P. F. , Dechamp-Guillaume G. , Serre F. , Jouan I., Tourvieille de Labrouhe D. , Nicolas P. , Vear F. , 2004.** Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldi*. TAG, Theoretical and applied genetics.109, 865-874.

- **Bianco V.V. and Pimpini F., 1990.** Orticoltura. Patron editore, Bologna.

- **Bol J .F., Linthorst H. J. M., Cornelissen B. J. C., 1990.** Plant Pathogenesis-Related Proteins Induced by Virus Infection. Annual review of phitopathology. 28, 113-138.

- **Boland G.J., Hall R., 1987.** Epidemiology of white mold of white bean in Ontario. Canadian journal of plant pathology. 9, 218-224.

- **Boller, T., 1987.** Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. “Plant-microbe interactions, molecular and genetic aspects” T. Kosuge and E. W. Nester (Eds.), 385-413. Macmillan, New York.

- **Boller T., 1995.** Chemoperception of microbial signals in plant cells. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46, 189-214.

- **Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analitical Biochemistry. 72, 248-254.

- **Breiteneder H., Ebner C., 2000.** Molecular and biochemical classification af plant-derived food allergens. J. Aller. Clin. Immunol. 106, 27-36.

- **Broekaert W. F., Terras F. R. G., Camue B. P. A., Osborn W., 1995.** Plant defensin: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*. 108, 1353-1358.

- **Budge S. P., Whipps J. M., 2001.** Potential for integrated control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse lettuce using *Coniothyrium minitans* and reduced fungicide application. *phytopathology*. 91, 221-227.

- **Buonaurio R., Scarponi L., Ferrara M., Sidoti P., Bertona A., 2002.** Induction of systemic acquired resistance in pepper plants by acibenzolar-S-methyl against bacterial spot disease. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 41-49.

- **Buzi A., Chilosi G., De Sillo D., Magro P., 2004.** Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. *Journal Phytopathology* 152, 34-42.

- **Carr J. P., Klessing D. F., 1989.** The pathogenesis-related proteins of plants. *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Setlow JK ed, Plenum Press, New York, 65-109.

- **Caruso C., Caporale C., Chilosi G., Vacca F., Bertini L., Magro P., Poerio E., Buonocore V., 1996.** Structural and antifungal properties of a pathogenesis-related protein from wheat kernel. *J. Prot. Chem.* 15, 35-44.

- **Caruso C., Chilosi G., Caporale C., Leonardi L., Bertini L., Magro P. and Buonocore V., 1999.** Induction of pathogenesis related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science*. 140, 87-97.

- **Caruso C., Chilosi G., Leonardi L., Bertini L., Magro P., Buonocore V., Caporale C., 2001.** A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. *Phytochemistry*. 58, 743-750.

- **Cessna G., Sears V. E. , Dickman M. B., Low P. S., 2000.** Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. Plant Cell. 12, 2191-2200.

- **Cohen Y., Gisi U., Mosinger E., 1991.** Systemic resistance of potato plants against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. Physiol. Mol. Plant Pathol. 38, 255-263.

- **Cohen Y., Reuveni M., Baider A., 1999.** Local and systemic activity of BABA (DL-3-aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevines. European Journal of Plant Pathology. 105, 351–361.

- **Conrath U., Beckers G. J. M., Flors V., Garcia-Agustin P., Jakab G., Mauch F., Newman M-A., Pieterse C. M. J., Poinssot B., Pozo. J., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne D., Zimmerli L., Mauch-Mani B., 2006.** Priming: Getting Ready for Battle. Molecular Plant-Microbe Interactions. 19, 1062-1071.

- **Conrath U., Pieterse C. M.J., Mauch-Mani B., 2002.** Priming in plant-pathogen interaction. TRENDS in Plant Science. 7, 210-216.

- **Dann E.K. and Deverall B.J., 2000.** Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. Plant Pathology. 49, 324-332.

- **Darvill A. G., Albersheim P., 1984.** Phytoalexins and their elicitors. A defense against microbial infection in plants. Annual Review Plant Physiology . 35, 243-275.

- **De Witt P. J. G. M., 1987.** Fungal infection of plant. Pegg GF and Ayres PG eds. Cambridge University Press. 1-24.

- **Del Rio L. E. , Martinson C. A., Yang X. B., 2002.** Biological control of *Sclerotinia* stem rot of soybean with *Sporidesmium sclerotivorum*. Plant Disease. 86, 999-1004.

- **Del Río L. E. , Venette J. R. , Lamey H. A., 2004.** Impact of white mold incidence on dry bean yield under nonirrigated conditions. *Plant Disease*. 88, 1352-1356.

- **Dixon, R. A. and Lamb, C. J., 1990.** Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 339-367.

- **Durrant W.E., Dong X., 2004.** Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathol.* 42, 185-209.

- **Felix G., Meins F., 1987.** Ethylene regulation of β -1,3-glucanase in tobacco. *Planta*. 172, 386-392.

- **Flor H.H., 1971.** Current status of the gene for gene concept. *Annual Review of Phytopathology* . 9, 275-296.

- **Flott B. E., Moerschbacher B. M., Reisener H., 1989.** Peroxidase isoenzyme patterns of resistance and susceptible wheat leaves following stem rust infection. *New Phytol.* 111, 413-421.

- **Fry, S. C., 1986.** Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Rev. Plant Physiol.* 37, 165-186.

- **Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryals J., 1993.** Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*. 261, 754 – 756.

- **Gallitelli D., Rana G.L., Vovlas C., Martelli G.P., 2004a.** Viruses of globe artichoke: an overview. *J. Plant Path.* 86, 267-281.

- **Gaspar T., Penel C., Thorpe T. and Greppin H., 1982.** Peroxidase: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. University of Geneva Press, Geneva.

- **Glazebrook J., 2005.** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 43, 205-227.

- **Goellner K, Conrath U., 2008.** Priming: it's all the world to induced disease resistance. Eur. J. Plant Pathol. 121, 233-242.

- **Gozzo F., 2003.** Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. J. Agric. Food Chem. 51, 4487-4503.

- **Hammerschmidt R., 1999.** Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? Physiological and Molecular Plant Pathology. 55, 77-84.

- **Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. G., 1996.** Resistance gene-dependent plant defense responses. The Plant Cell. 8, 1773-1791.

- **Hans D. G., Kùc J. A., 1989.** Induction of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. Phytopathology. 79,176-179.

- **Hejgaard J., Jacobsen S., Bjorn S. E., Kragh K. M., 1992.** Antifungal activity of chitin-binding PR4 type proteins from barley grain and stressed leaves. FEBS Lett. 307, 389-392.

- **Hoffmann L.V., Carvalho M.T.V. and Nogueira Cardoso E.J.B., 2003.** Differential expression of peroxidase isoenzymes in soybean roots treated with the benzothiadiazole. Biologia Plantarum. 46, 451-453.

- **Hoffmann-Sommergruber K., 2002.** Pathogenesi-related (PR)-proteins identified as allergens. Biochem. Soc. transact. 30, 930-935.

- **Huang H. C., Bremer E., Hynes R. K., Erickson R. S., 2000.** Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Biological Control. 18, 270-276.

- **Huang H.C., Erickson R.S., 2008.** Factors affecting biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungal antagonists. J. Phytopathology. 156, 628-634.

- **Hwang B. K., Sunwoo J.Y., Kim Y. J., Kim B. S., 1997.** Accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- β -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 51, 305-322.

- **Iriti M., Rossoni M., Borgo M., Faoro F., 2004.** Benzothiadiazole resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4406-4413.

- **Ishii H., Tomita Y., Horio T., Narusaka Y., Nakazawa Y., Nishimura K. and Iwamoto S., 1999.** Induced resistance of acibenzolar-S-methyl (CGA245704) to cucumber and Japanese pear diseases. *European Journal of Plant Pathology*. 105, 77-85.

- **Jakab G., Cottier V., Toquin V., Rigoli G., Zimmerli L., Métraux J. P., Mauch-Mani B., 2001.** β -Aminobutyric acid-induced resistance in plant. *Eur. J. Plant Path.* 107, 29-37.

- **Jones E.E. , Whipps J.M., 2002.** Effect of Inoculum Rates and Sources of *Coniothyrium minitans* on Control of *Sclerotinia sclerotiorum* Disease in Glasshouse Lettuce. *European Journal of Plant Pathology*. 108, 527-538.

- **Kästner B., Tenhaken R. and Kauss H., 1998.** Chitinase in cucumber hypocotils is induced by germinating fungal spores and by fungal elicitor in synergism with inducers of acquired resistance. *Plant Journal*. 13, 447-454.

- **Kauffmann S., Legrand M., Geoffroy P. and Fritting B., 1987.** Biological function of “pathogenesis-related proteins”: four PR-proteins have β 1-3 glucanase activity. *EMBO Journal*. 6, 3209-3212.

- **Keen N.T., 1990.** Gene-For-Gene Complementarity in Plant-Pathogen Interactions. *Annual Review of Genetics*. 24,447-463.

- **Kerby K., Sommerville S. C., 1992.** Purification of an infection-related, extracellular peroxidase from barley. *Plant Physiology*. 100, 397-402.

- **Kim H.S. , Diers B.W., 2000.** Inheritance of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean. *Crop Science*. 40, 55-61.

- **Kim Y.J., Hwang B.K., 1994** Differential accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 45, 195-209.

- **King G. J., Turner V. A., Hussey C. E., Wurtele E. S., Lee S. M., 1988.** Isolation and characterization of tomato cDNA clone which codes for a salt-induced protein. *Plant Molecular Biology*. 10, 401-412.

- **Kolkman J. M. , Kelly J. D., 2000.** An indirect test using oxalate to determine physiological resistance to white mold in common bean. *Crop Science*. 40, 281-285.

- **Kolkman J. M. , Kelly J. D., 2003.** QTL Conferring Resistance and Avoidance to White Mold in Common Bean. *Crop Science*. 43,539-548.

- **Kauffmann S., Legrand M., Geoffroy P. and Friting B., 1987.** Biological function of “pathogenesis-related proteins”: four PR-proteins have β -1,3 glucanase activity. *EMBO Journal*. 6, 3209-3212.

- **Lamb C., Dixon R. A., 1990.** The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48, 251-275.

- **Lamb C. J., Lawton M. A., Dron M., Dixon R. A., 1989.** Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell*. 56, 215-224.

- **Lane B.G., Dunwell J.M., Ray J.A., Schmitt M.R., Cuming A.C., 1993.** Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *J. Biol. Chem*. 268, 12239-12242.

- **Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C., 1994.** H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 79, 583-593, Cell Press.

- **Linthorst, H.J.M., 1991.** Pathogenesis-related proteins of plants. Critical reviews in plant sciences. 10, 123-150.

- **Liu D., Raghothama K. G., Hasegawa P. M., Bressan R. A., 1993.** Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 1888-1892.

- **Lucas J.A., 1998.** Plant pathology and plant pathogens. Blackwell Science Ltd. (3th ed.). Oxford, England.

- **Magro P., Marciano P., 1984.** Some characteristics of cellulase system produced “in vivo” by *Sclerotinia sclerotiorum*. Annali di microbiologia ed enzimologia. 34, 1-6.

- **Magro P., Marciano P., Di Lenna P., 1984.** Oxalic acid production and its role in pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. FEMS Microbiol. Lett. 24, 9–12.

- **Marciano, P., Di Lenna, P. and Magro, P., 1983.** Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. Physiological Plant Pathology. 22, 339-345.

- **Matta A., 2000.** Morte cellulare programmata e reazione di ipersensibilità. Informatore Fitopatologico. 6, 5-10.

- **Matta A., Garibaldi A., 1981.** Malattie delle piante ortensi. Edagricole, Bologna.

- **Matta A., 1996.** Fondamenti di Patologia Vegetale. Patron editore, Bologna.

- **Matta A., Gullino M.L., 1997.** Induzione di resistenza con mezzi chimici ai funghi patogeni delle piante. Informatore Fitopatologico. 12, 3-13.

- **Matsuoka M., Ohashi Y., 1984.** Biochemical and serological studies of pathogenesis-related proteins of *Nicotiana* species. J. Gen. Virol. 65, 2209-2215.

- **Mcfadden H.G., Chapple R., De Feyter R. and Dennis E., 2001.** Expression of pathogenesis-related genes in cotton stems in response to infection by *Verticillium dahliae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 58, 119-131.

- **Métraux J.P. , Nawrath C., Genoud T., 2002.** Systemic acquired resistance. *Euphytica*. 124, 237-243.

- **Miller G.L., 1959.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 31, 426-430.

- **Molano J., Duran A. and Cabib E., 1977.** A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Analytical Biochemistry*. 83, 648-656.

- **Mordue J.E.M., Holliday P., 1976-** *Sclerotinia sclerotiorum* (sclerotial state). CMI – Commonwealth Mycological Institute. Description of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Agricultural Bureaux. Kew, Surrey, England.

- **Nelson N., 1944.** A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* .153, 375-380.

- **Niderman T., Genetet I., Bruyère T., Gees R., Stintzi A., Legrand M., Fritig B., Möisinger E., 1995.** Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol*. 108, 17-27.

- **Niki T., Mitsuhashi I., Seo S., Ohtsubo N., Ohashi Y., 1998.** Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol*. 39, 500-507.

- **Oka Y., Cohen Y., 2001.** Induced resistance to cyst and root-knot nematodes in cereals by DL- β -amino-*n*-butyric acid. *European Journal of Plant Pathology*. 107, 219–227.

- **Olivieri F. P., Lobato M. C., González Altamiranda E., Daleo G. R., Huarte M., Guevara M. G., Andreu A. B., 2009.** BABA effects on the behaviour of potato cultivars infected by *Phytophthora infestans* and *Fusarium solani*. Eur. J. Plant Pathol. 123, 47-56.

- **Oostendorp M., Kunz W., Dietrich B., Staub T., 2001.** Induced disease resistance in plants by chemicals. European Journal of Plant Pathology. 107, 19–28.

- **Pajot E., Le Corre D., Siluè D., 2001.** Phyto-gard and DL- β -amino butyric acid (BABA) induce resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa* L.). European Journal of Plant Pathology. 107, 861-869.

- **Pajot E., Le Roux M., 2007.** Induced resistance and horticultural crops protection: Need for adapting laboratory evaluation to the field reality. Atti del Joint International Workshop on: PR-proteins and induced resistance against pathogens and insects abstract pag. 109. Doorn, the Netherlands.

- **Pan S.Q., Ye X.S. and Kué J. 1989.** Direct detection of β -1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. Analytical Biochemistry. 182, 136-140.

- **Papavizas G. C., 1964.** Greenhouse control of *Aphanomyces* root rot of peas with aminobutyric acid and methylaspartic acid. Plant Dis. Rep. 48, 537-541.

- **Papavizas G. C., Davey C. B., 1963.** Effect of amino compounds and related substances lacking sulfur on *Aphanomyces* root rot of peas. Phytopathology. 53, 116-122.

- **Pasquini G., Barba M., 2001.** Il virus dell'avvizzimento maculato del pomodoro (TSWV) in carciofo 'Romanesco' nel Lazio. Petria. 11, 167-170.

- **Patricio F.R.A., Almeida I.M.G., Barros B.C., Santos A.S., Frare P.M., 2007.** Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. Annals of Applied Biology. 152, 29-39.

- **Penel C., Gaspar T., Greppin H., 1992.** Plant peroxidases 1980-1990: Topics and detailed literature on molecular, biochemical and physiological aspects. University of Geneva Press, Switzerland.

- **Perrino P., Tomaselli V.M.F., Scarascia I., Mallardi L., 2006.** Individuazione e caratterizzazione di ecotipi rari di carciofo. Atti del convegno "Il carciofo: dal laboratorio al mercato. 112-114. Roma.

- **Pollini A., 2006** - Manuale di entomologia applicata. – Edagricole, Bologna.

- **Poussereau N., Gente S., Rascle C., Billon-Grand G., Fèvre M., 2001.** *aspS* encoding an unusual aspartyl protease from *Sclerotinia sclerotiorum* is expressed during phytopathogenesis. FEMS Microbiology Letters. 194, 27-32.

- **Pozo M.J., Van Loon L.C., Pieterse C.M., 2004.** Jasmonate-signals in plant-microbe interactions. J. Plant Growth Regul. 23, 211-222.

- **Punithalingam, 1982.** *Coniothyrium minitans*. CMI – Commonwealth Mycological Institute. Description of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Agricultural Bureaux. Kew, Surrey, England.

- **Rana G.L., Martelli G. P., 1983.** Virosi del carciofo. L'Italia agricola. 1, 27-38.

- **Reeleder R.D., 2004.** The use of yeasts for biological control of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. BioControl. 49, 583-594.

- **Reimers P. J., Guo A., Leach J. E., 1992.** Increased activity of a cationic peroxidase associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice (*Oryza sativa*). Plant Physiology 99: 1044-1050.

- **Ried J. L., Collier A., 1985.** Activity stain for rapid characterization of pectic enzymes in isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels. Applied and Environmental Microbiology. 50, 615-622.

- **Reuveni M., Reuveni R., 1995.** Efficacy of foliar application of phosphates in controlling powdery mildew fungus on field-grown winegrapes: effects on cluster yield and peroxidase activity in berries. *J. Phytopathology*. 143, 21-25.

- **Ried J.L., Collmer A., 1985.** Activity stain for rapid characterization of pectic enzymes in isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels. *Applied and Environmental Microbiology*. 50, 615-622.

- **Roberts W. K., Selitrennikoff C. P., 1990.** Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1771-1778.

- **Roldán Serrano A., Luna Del Castillo J., Jorrín Novo J. , Fernández Ocaña A. , Gómez Rodríguez M.V., 2007.** Chitinase and peroxidase activities in sunflower hypocotyls: effects of BTH and inoculation with *Plasmopara halstedii*. *Biologia Plantarum*. 51, 149-152.

- **Rolando C., Schneider S., Pinson J., Lapierre C., Monties B., Catesson A. M., Goldberg R., 1991.** Mechanistic studies on the polymerization of coniferyl alcohol. In: *Biochemical, molecular, and physiological aspects of plant peroxidases*, Lobarzewski J., Greppin H., Penel C. and Gaspar T. eds. University M.Curie-Sklodowska, Lublin, Poland and University of Geneva, Switzerland, 131-147.

- **Ryan, C. A., 1992.** The search for the proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. *Plant Mol. Biol.* 19, 123-133.

- **Selitrennikoff C. P., 2001.** Antifungal Proteins. *App. Environ. Microbiol.* 67, 2883-2894.

- **Shewry P.R., Lucas J.A., 1997.** Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. *Advances in Botanical Research*. 26, 134-192.

- **Siegrist J., Orober M., Buchenauer H., 2000.** β -Aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 56, 95-106.

- **Silué D., Pajot E., Cohen Y., 2002.** Induction of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower by DL- β -amino-n-butanoic acid (BABA). Plant Pathology. 51, 97-102.

- **Slaughter A. R., Hamiduzzaman M.M., Gindro K., Neuhaus J-M., Mauch-Mani B., 2008.** Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. Eur. J. Plant pathol. 122, 185-195.

- **Sonnante G, Pignone D., Hammer K., 2007.** The domestication of artichoke and cardoon: from roman times to the genomic age. Annals of Botany. 100, 1095-1100.

- **Stadnik M. J., Buchenauer H., 2000.** Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Physiological and molecular plant pathology. 57, 25-34.

- **Staskawicz, B. J., 1996.** Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. Science. 274, 2063-2065.

- **Sticher L., Mauch-Mani B., Métraux J. P., 1997.** Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathology. 35, 235-70.

- **Suo Y., Leung D.W.M., 2002.** BTH-induced accumulation of extracellular proteins and blackspot disease in rose. Biologia Plantarum. 45, 273-279.

- **Terras F. R. G., Eggermont K., Kovaleva V., Raikhel N. V., Osborn W., Kester A., Rees S. B., Torrekens S., Van Leuven F., Vanderleyden J., Camue B. P. A., Broekaert W. F., 1995.** Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. Plant Cell. 7, 573-588.

- **Thaler J. S., Owen B., Higgins V. J., 2004.** The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. Plant Physiology. 135, 530-538.

- **Titone P., Migheli Q., Acutis M. and Garibaldi A., 1998.** Il fosfato monopotassico nella lotta al mal bianco dello zucchini. *Colture Protette*. 24, 73-79.

- **Trudel J. and Asselin A., 1989.** Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 178, 362-366.

- **Twengström E., Sigvald R., Svensson C., Yuen J., 1998.** Forecasting *Sclerotinia* stem rot in spring sown oilseed rape. *Crop protection*. 17, 405-411.

- **Vallard G.E., Goodman R.m., 2004.** Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*. 44, 1920-1934.

- **Van Loon L. C., 1985.** Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*. 4, 111-116.

- **Van Loon L.C., Pierpoint W. S. , Boller Th. , Conejero V. , 1994.** Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*. 12, 245-264.

- **Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J., 2006.** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 7.1–7.28.

- **Van Loon L., Van Strien E. A., 1999.** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 85-97.

- **Wegulo S. N. , Yang X. B. , Martinson C. A., 1998.** Soybean cultivar responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and controlled environment studies. *Plant disease*. 82, 1264-1270.

- **Wiklund A., 1992.** The genus *Cynara* L. (Asteraceae-Cardueae). *Botanica J. of the Linnean Society*. 109, 75-123.

- **Wojtaszek P., 1997.** Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence response. *Acta Physiologiae Plantarum*. 19, 581-589.

- www.sifit.org

- www.netgalaxy.it/carciofi.htm

- **Yi S. Y., Hwang B.K., 1996.** Differential induction and accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in soybean hypocotyls and leaves after compatible and incompatible infection with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 48: 179-192.

- **Yu G.-Y. and Muehlbauer G.J., 2001.** Benzothiadiazole-induced gene expression in wheat spikes does not provide resistance to *Fusarium* head blight. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 59, 129-136.

- **Yun D.J., Bressan R.A. and Hasegawa P.M., 1997.** Plant antifungal proteins. *Plant Breeding Review*. 14, 39-88.

- **Zhao J., Meng J., 2003.** Genetic analysis of loci associated with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in rapeseed (*Brassica napus* L.). *TAG, Theoretical and applied genetics*. 106, 759-764.

- **Ziadi S., Barbedette S., Godard J.F., Monot C., Le Corre D. and Silué D., 2001.** Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) - downy mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. *Plant Pathology* 50, 579-586.

- **Zimmerli L., Jakab G., Métraux J.-P. and Mauch-Mani B., 2000.** Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97, 12920-12925.