

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
VITERBO
FACOLTÀ DI AGRARIA
DIPARTIMENTO DI PROTEZIONE DELLE PIANTE

DOTTORATO DI RICERCA IN PROTEZIONE DELLE PIANTE
AGR/12
- XVIII CICLO -

**“IL PROCESSO INFETTIVO DI *FUSARIUM CULMORUM* SU PLANTULE DI FRUMENTO:
DEGRADAZIONE DELLE COMPONENTI DELLA PARETE CELLULARE, INDUZIONE DI
METABOLITI DI DIFESA E VARIAZIONE DEL pH TISSUTALE”**

Dottoranda

Dott.ssa Maria Pia Aleandri

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Naldo Anselmi

Tutore

Chiar.mo Prof. Paolo Magro

Co-Tutore

Chiar.mo Prof. Gabriele Chilosi

TRIENNIO 2003-2005

DEDICA

...a mia madre

a Germana.

RINGRAZIAMENTI

Desidero esprimere un sincero ringraziamento al Prof. Paolo Magro, Tutore di questo mio Dottorato, per i consigli, espressi sempre con grande competenza e rigore scientifico, e per l'aiuto e il sostegno che mi ha sempre offerto anche nei momenti di affrontare le inevitabili difficoltà che il lavoro ha comportato.

Ringrazio il Prof. Gabriele Chilosì, Co-Tutore, per la disponibilità dimostrata in ogni fase del lavoro sperimentale e per la supervisione al mio lavoro.

Il mio ringraziamento va anche al Coordinatore del Dottorato, Prof. Naldo Anselmi, ed ai membri del Collegio dei Docenti, per il supporto scientifico ed il lavoro di indirizzo svolto in questi tre anni.

Grazie alla Dott.^{ssa} Danila Scermino, per essere stata sempre presente, nei momenti belli e anche in quelli brutti della mia vita.

Un'espressione di gratitudine va alla Sig.^{ra} Diana Martignoni, per avermi sempre pazientemente sopportato.

Al Dott. Corrado Ciambella solo "GRAZIE".

Grazie anche alla Dott.^{ssa} Elena Luccioli, al Dott. Enrico Pompei, al piccolo Alessandro per l'amicizia che mi hanno dimostrato in tutti questi anni.

Desidero poi ringraziare il Dott. Marco Nasini, il Dott. Stefano Speranza, la Dott.^{ssa} Mariagrazia Antonelli, il Dott. Roberto Reda e il Dott. Angelo Mazzaglia per le piacevoli "pause caffè" che mi hanno fatto passare.

Esprimo infine la mia gratitudine ai miei colleghi, Dott. Danilo Bucini, Dott.^{ssa} Cristina Proietti Zolla, Dott.^{ssa} Barbara Pasquini e Dott. Giorgio Vuono con i quali ho condiviso questi tre anni di dottorato.

A Germana, Giuliano e Simone li ringrazio per il loro affetto e la loro instancabile fiducia.

Certamente molto più che un'espressione di particolare gratitudine va a mia madre, per il sostegno morale e materiale a questa mia ulteriore formazione, e per aver sempre supportato e a volte sopportato..... tutte le mie decisioni...

Indice

DEDICA _____	pag.	ii
RINGRAZIAMENTI _____	”	iii
INDICE _____	”	iv
PRESENTAZIONE _____	”	vi
1 INTRODUZIONE _____	”	1
1.1 L’ospite _____	”	1
1.1.1 Sistematica e importanza economica_____	”	1
1.1.2 Avversità _____	”	2
1.2 La malattia e il patogeno _____	”	6
1.2.1 Il ” Mal del Piede"_____	”	6
1.2.2 <i>Fusarium culmorum</i> _____	”	6
1.3 Interazione ospite- patogeno _____	”	10
1.3.1 Strumenti di patogenesi del fungo _____	”	10
1.3.2 Resistenza dell’ospite e attivazione dei meccanismi di difesa _____	”	14
I geni di resistenza ed induzione di resistenza _____	”	15
Barriere strutturali _____	”	17
La risposta ipersensibile e lo stress ossidativo _____	”	17
La via segnale degli Jasmonati_____	”	21
Composti antimicrobici e le proteine di patogenesi (PR)–	”	23
Gli inibitori proteici degli enzimi pectolitici_____	”	29
2 SCOPO DELLA TESI _____	”	32
3 MATERIALI E METODI _____	”	34
3.1 Prova di suscettibilità varietale _____	”	34
3.2 Materiale fungino _____	”	34
3.3 Materiale vegetale _____	”	35
3.4 Allevamento <i>in vitro</i> di <i>F. culmorum</i> _____	”	35
3.4.1 Allevamento <i>in vitro</i> di <i>F. culmorum</i> per la produzione di enzimi pectolitici_____	”	35
3.4.2 Allevamento <i>in vitro</i> di <i>F. culmorum</i> per la misurazione del pH e la quantità di ammonio_____	”	36
3.5 Estrazione proteica IWF (Internal Washing Fluid) _____	”	36
3.6 Estrazione enzimatica da plantule di frumento _____	”	37
3.7 Determinazione della proteina totale _____	”	37
3.8 Dosaggio quantitativo dell’attività PNL _____	”	37
3.9 Dosaggio quantitativo dell’attività PG _____	”	38
3.10 Determinazione del pH ottimale per l’attività di PNL e PG _____	”	39
3.11 Elettroforesi su gel di poliacrilamide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS) e trasferimento su membrana		

di nitrocellulosa per la determinazione di proteine PR-4	”	39	
3.12 Separazione forme isoenzimatiche attraverso IEF	”	40	
3.13 Analisi delle forme isoenzimatiche di PNL e PG	”	41	
3.14 Dosaggio quantitativo dell’attività chitinasica	”	41	
3.15 Dosaggio quantitativo dell’attività glucanasica	”	42	
3.16 Dosaggio quantitativo dell’attività perossidasi	”	42	
3.17 Determinazione del pH ottimale per l’attività chitinasica e glucanasica	”	43	
3.18 Analisi delle forme isoenzimatiche di chitinasi	”	43	
3.19 Analisi delle forme isoenzimatiche di glucanasi	”	44	
3.20 Analisi delle forme isoenzimatiche di perossidasi	”	44	
3.21 <i>Analisi delle forme isoenzimatiche degli inibitori proteici di PNL e PG</i>	”	45	
3.21.1 Inibitori proteici delle PG	”	45	
3.21.2 Inibitori proteici delle PNL	”	45	
3.22 Dosaggio dell’ammonio	”	45	
4 RISULTATI	”	46	
4.1 Prova di suscettibilità varietale	”	46	
4.2 <i>Enzimi pectolitici prodotti da F. culmorum</i>	”	46	46
4.2.1 Pectin-liasi di <i>F. culmorum</i> prodotte <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	”	46	
4.2.2 Poligalatturonasi <i>F. culmorum</i> prodotte <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	”	47	
4.3 Curva di pH degli enzimi pectolitici	”	48	
4.4 <i>Variazione del pH e del contenuto di ammonio di allevamenti in vivo e in vitro</i>	”	49	
4.5 <i>Analisi delle proteine enzimatiche</i>	”	49	49
4.5.1 Chitinasi	”	49	
4.5.2 β -1,3-glucanasi	”	50	
4.5.3 Perossidasi	”	50	
4.5.4 PR 4	”	51	
4.5.5 Inibitori proteici degli enzimi pectolitici	”	51	
4.6 <i>Curva di pH delle proteine enzimatiche</i>	”	51	
4.6.1 Chitinasi	”	51	
4.6.2 β -1,3-glucanasi	”	51	
4.6.3 Perossidasi	”	52	
FIGURE E GRAFICI	”	53	
5 DISCUSSIONE	”	91	
6 CONCLUSIONI	”	98	
7 BIBLIOGRAFIA	”	99	

1 INTRODUZIONE

1.1 L'OSPITE

1.1.1 SISTEMATICA E IMPORTANZA ECONOMICA

Il frumento è sicuramente una delle prime specie coltivate al mondo. Si pensa che esso sia stato utilizzato nella sua forma originale, il farro a partire dal 8500 a.c. nella Mezzaluna Fertile, per poi diffondersi progressivamente verso ovest, fino a raggiungere la Grecia nel 6500 a.c. ed interessare quindi tutte le aree del Vicino Oriente e dell'Europa dove progressivamente si espandeva l'agricoltura (Diamond, 1997). In tempi antichi la coltura del frumento ha interessato l'India (VII secolo a.c.) e quindi l'Etiopia. Appare chiaro quindi come tale coltura abbia accompagnato l'umanità in tutta la sua storia a partire dall'inizio del neolitico. Ad oggi, il frumento è coltivato in tutte le zone temperate del pianeta. A partire dalla sua prima coltivazione il frumento è stato sottoposto ad una intensa opera di selezione di quei fenotipi più idonei alla coltivazione.

La coltivazione del frumento ha subito nel nostro Paese un profondo cambiamento nella prima metà del 1900 a seguito della intensa attività di selezione ed incrocio operata da Nazareno Strampelli ultimata con il rilascio di varietà con caratteristiche straordinarie in termini agronomici e fitopatologici. Il miglioramento della produttività dei grani rilasciati fu ottenuta per mezzo di incroci miranti al sostanziale abbassamento della taglia e a caratteri di precocità; in tal modo le varietà risultavano maggiormente resistenti all'allettamento e alla "stretta" causata principalmente dalla ruggine nera. L'imponente serie di varietà elette selezionate da Strampelli consentì allora all'Italia di raggiungere l'autosufficienza granaria. Le varietà di Strampelli si diffusero anche in altri continenti, dall'Europa all'America meridionale alla Cina e sono state impiegate come materiale parentale in molti programmi di incrocio; ancora oggi è possibile ritrovare varietà di Strampelli nella genealogia di molti dei grani coltivati nel mondo.

Il grano tenero o *Triticum aestivum* (Lam.) è una pianta esaploide ($2n = 42$), l'infiorescenza è una spiga composta, formata da spighe sessili, poliflore. Il frutto è una cariosside, percorsa da un solco longitudinale, costituita essenzialmente dall'endosperma molto ricco di amido e di glutine. L'apparato radicale è fibroso; il culmo è formato da internodi cavi e può emettere dei germogli secondari alla base, dando luogo all'accestimento.

Il grano tenero è una pianta erbacea annuale, angiosperma, il cui inquadramento sistematico è il seguente:

Classe: *Monocotiledoni*

Ordine: *Poales*

Famiglia: *Poaceae*

Genere: *Triticum*

Specie: *Triticum aestivum*

Considerando le superfici investite il frumento rappresenta il più importante cereale al mondo. I principali produttori sono i paesi dell'UE che assorbono poco più del 18% della produzione mondiale, seguiti dalla Russia e dagli USA.

In Italia, nella decorsa annata agraria, sono stati investiti a frumento tenero circa 627000 ha, con una produzione di circa 3,3 milioni di tonnellate. Tale produzione è tuttavia inferiore alle esigenze della trasformazione che è costretta ad approvvigionarsi all'estero per una quota stimata tra il 60-70% del fabbisogno nazionale. Nell'arco delle ultime due annate agrarie, si è assistito ad un leggero incremento delle superfici coltivate a frumento tenero (+ 6%). L'aumento delle superfici è distribuito quasi uniformemente in tutte le circoscrizioni italiane (Nord, Centro e Meridione); al Nord il grano tenero ha preso il posto del mais, mentre al Centro-Sud ha sostituito una parte delle superfici che prima erano coltivate a grano duro. C'è inoltre stato un incremento produttivo dovuto al lavoro di miglioramento genetico, iniziato già ai primi del novecento. Utilizzando la tecnica dell'incrocio, sono state create varietà più produttive, di bassa taglia, resistenti all'allettamento, precoci e in grado di sfuggire agli attacchi tardivi della ruggine (Toderi e D'Antuono 2000).

1.1.2 AVVERSITÀ

Il quadro fitopatologico del frumento negli anni successivi all'opera di miglioramento della prima metà del novecento è mutato a causa dell'evoluzione in ambito varietale e delle tecniche di coltivazione. La ruggine nera non risulta più essere un problema mentre la ruggine bruna e l'oidio vengono sostanzialmente controllati per mezzo della resistenza varietale. La ruggine gialla, una volta considerata malattia marginale, è stata registrata negli ultimi anni con sempre più frequenza determinando gravi perdite soprattutto su frumento tenero. Malattie un tempo considerate un vero flagello come carie e carboni compaiono ormai solo sporadicamente in quanto controllate per mezzo della

concia. In tempi recenti si sono affacciate nuove importanti fitopatie. La frequente pratica della monosuccessione ha determinato sempre più frequentemente epidemie di “mal del piede”, manifestazione patologica complessa dovuta al concorso di una o più agenti patogeni fungini, mentre la coltivazione di varietà di frumento duro in zone poco idonee ha portato all’espandersi della fusariosi della spiga, malattia importante perché prodotta da funghi micotossigeni.

Di seguito si farà un breve cenno a quali sono gli agenti patogeni, i sintomi e i danni provocati da questi sul frumento.

L’agente patogeno dell’oidio è il fungo ascomicete *Blumeria graminis tritici* (DC.) Speer (Sin. *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*); l’infezione si manifesta su tutte le parti aeree sottoforma di una soffice muffa bianco-grigiastra. Con il progredire della malattia i tessuti tendono a decolorarsi e poi a seccare, mentre l’intera pianta subisce un rallentamento nello sviluppo vegetativo. Le prime manifestazioni possono comparire già in autunno sulle foglie delle giovani plantule, ma gli attacchi più gravi si registrano in primavera durante le fasi di levata e spigatura. Le infezioni oidiche si possono avere con valori termici compresi tra 3 e 30°C e con alta umidità relativa. Fattori favorevoli alla malattia sono: semine precoci, abbondanti concimazioni azotate, alternanza di periodi secchi con altri caldo umidi.

Septoria tritici (Rob.e Desm.) è l’agente causale della septoriosi del grano, generalmente attacca solo le foglie producendo delle macchie giallo-chiare che progressivamente tendono ad assumere una forma allungata ed un colore bruno-rossastro. Gli attacchi di septoriosi provocano un disseccamento parziale o totale delle foglie con conseguente diminuzione dell’attività fotosintetica. L’intensità dell’attacco è fortemente influenzata dall’andamento climatico, periodi primaverili molto umidi e piovosi con temperature relativamente basse (15-20°C) favoriscono la malattia. Gli attacchi di septoriosi si presentano, inoltre, con un’incidenza maggiore nei terreni pesanti e con semine fitte.

Altre gravi malattie sono rappresentate dalle ruggini che producono gravi lesioni dell’epidermide fogliare con conseguente disidratazione dei tessuti, morte della foglia e, in presenza di gravi attacchi, anche della pianta. Il grano viene attaccato da tre specie di ruggini, la cui presenza e successione è condizionata dall’andamento climatico, dalla suscettibilità varietale, dalle cure colturali e dalla presenza di ospiti secondari. *Puccinia striiformis* (West) agente causale della ruggine gialla è la prima a comparire in primavera in quanto meno esigente dal punto di vista termico. Colpisce nel periodo compreso tra la

levata e la spigatura-fioritura. Si riconosce per la presenza, sulla foglie delle piante colpite, di pustole (formate dagli uredosori) di colore giallo limone polverulente. Attacca soprattutto le foglie, ma si può ritrovare anche sulle glume, glumette e cariossidi in formazione. Sverna come uredospora e come micelio su cereali sia coltivati che spontanei. Non si conosce l'ospite secondario. Questa malattia in passato compariva in modo sporadico; a partire dal 1977, quando è stata registrata una distruttiva epidemia sulla cv Innerio in Umbria, la presenza della ruggine gialla è divenuta costante con più eventi epidemici succedutesi in più anni (Chilosi e Corazza, 1990). La malattia colpisce soprattutto le varietà di frumento tenero, mentre quelle di duro risultano possedere delle caratteristiche di resistenza durevole (Chilosi e Johnson, 1990).

La ruggine bruna o *Puccinia recondita* (Rob ex Desm) segue nel tempo la gialla, è la più comune, ed è diffusa in tutte le aree cerealicole. Particolarmente pericolosi sono gli attacchi che si verificano tra la spigatura e la fioritura. I sintomi si manifestano in primavera sulle foglie, raramente su guaine e culmi, sotto forma di pustole rotondeggianti (uredosori), di colore bruno rossastro, distribuiti irregolarmente sulla lamina fogliare. In seguito, verso fine maggio-primi di giugno, compaiono nella pagina inferiore della foglia, delle piccole pustole nerastre (teleutosori), non polverulenti. Sverna sui cereali come uredospora quiescente o come micelio. Le piante ospiti secondarie sono specie appartenenti alla famiglia delle Ranunculaceae, quali *Thalictrum* e *Isopyrum fumarioides*. In Italia svolge tutto il suo ciclo sul frumento senza passare sull'ospite secondario.

Infine abbiamo la ruggine nera il cui agente patogeno è *Puccinia graminis* (Pers.). E' la più temibile delle tre, anche se sviluppa epidemie solo in alcune annate e nelle regioni più calde ed umide e sulle cultivar più tardive. Colpisce tutte le parti aeree della pianta, con sintomi simili: pustole prima rotondeggianti poi sviluppate in senso longitudinale, inizialmente di colore rosso mattone e poi bruno-nerastro, spesso riunite in lunghe file parallele alle nervature. Gli organi colpiti con il progredire delle infezioni diventano clorotici e poi disseccano, le spighe sono più piccole, la pianta assume un aspetto sofferente. Le teleutospore consentono al fungo lo svernamento, queste in primavera passano sull'ospite secondario, rappresentato da varie specie di *Berberis*, su questo vengono prodotte le ecidiospore. Queste ultime vanno poi a infettare le graminacee dando avvio ad un nuovo ciclo della malattia. In zone dove l'inverno è mite anche le uredospore sono in grado di sopravvivere e dare origine a nuove infezioni senza passare attraverso l'ospite secondario. La ruggine nera non rappresenta più quella minaccia fitopatologica

conosciuta in passato. Le varietà di frumento oggi coltivate hanno delle caratteristiche di precocità che le consentono di sfuggire al periodo di massima pericolosità di questa malattia.

L'agente patogeno del carbone è *Ustilago tritici* (Pers. Jens.), un basidiomicete diffuso in tutte le aree cerealicole, ma ormai con manifestazioni solo eccezionali. I sintomi sono facilmente riconoscibili in quanto le spighe a maturità risultano completamente trasformate in sori nerastri, contenenti una massa polverulenta. Essa è costituita da spore che, portate dal vento al momento della fioritura, vanno a posarsi tra le glume, per poi passare, germinando nell'embrione della cariosside. Quando la cariosside infetta viene seminata e germina, anche il fungo riprende l'attività seguendo la pianta in tutte le fasi dell'accrescimento fino a raggiungere in modo sistemico la spiga per poi, al momento della fioritura, manifestarsi improvvisamente con la sostituzione delle spighe con i propri sori ripieni di clamidospore. La concia delle cariossidi effettuata con fungicidi sistemici ha ormai relegato nella marginalità questa malattia.

La carie causata da *Tilletia caries* (DC.) Tul., nel nostro paese risulta quasi scomparsa. L'infezione viene contratta dalla plantula nelle fasi immediatamente successive alla germinazione del seme, avviene ad opera delle clamidospore localizzate all'esterno della cariosside. Il micelio, una volta penetrato nella pianta attraverso il coleoptile, si diffonde negli spazi intercellulari e con andamento sistemico segue l'accrescimento della pianta fino a raggiungere la spiga, ove si localizza nell'ovario, per poi ramificarsi e anastomizzarsi abbondantemente, formando un ammasso miceliare che progressivamente si sostituisce al contenuto delle cariossidi. A maturità all'interno della falsa cariosside sono presenti milioni di clamidospore che durante la fase di trebbiatura si liberano e vanno ad infettare le cariossidi sane e il terreno. Come per il carbone, anche questa malattia ha perso importanza per merito della concia.

Infine abbiamo il "mal del piede", che verrà trattato in maniera completa nel prossimo paragrafo poiché, uno degli agenti patogeni causali sarà oggetto d'indagine della presente tesi.

1.2 LA MALATTIA E IL PATOGENO

1.2.1 IL “MAL DEL PIEDE”

Il “mal del piede” è una malattia ad eziologia complessa. Gli agenti causali più frequentemente isolati negli ultimi anni , in Italia, da porzioni basali del culmo, sono stati: *Fusarium culmorum* (W. G. Smith), *Fusarium graminearum* (Schwabe), *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels et Hallet, *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. e *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* (Walzer) (Piglioni, 1975; Corazza *et al.*, 1987; Corazza *et al.*, 1999). I sintomi possono essere diversi: mancata emergenza e/o morte prematura delle piantine appena emerse, imbrunimenti basali del culmo e del colletto, riduzione dei culmi di accostamento, spighe bianche, vuote o con cariossidi striminzite (fig. 1). In conseguenza degli attacchi si hanno danni a carico della qualità e della quantità della produzione e maggiore predisposizione all'allettamento.

1.2.2 FUSARIUM CULMORUM

Fusarium culmorum (W.G. Smith) Sacc. rappresenta uno dei principali agenti causali del “mal del piede” del frumento (fig. 2). Caratteristiche peculiari per la sua identificazione sono, la presenza di molti macroconidi raggruppati in sporodochi, l'assenza di microconidi e la presenza di clamidospore singole , a catena o in gruppo. I macroconidi sono settati (3-5 setti), piuttosto tozzi (larghi 4-7µm e lunghi 26-50µm), con cellula apicale generalmente smussata e cellula basale con piede appena accennato (fig. 3).

Il patogeno può essere presente sia all'interno che all'esterno della cariosside. Tutti gli organi della pianta possono essere colpiti. In caso di attacchi precoci, la malattia impedisce la germinazione della semente o procura imbrunimenti a carico del coleoptile e della radichetta che causano la morte immediata della plantula. Dopo l'emergenza gli attacchi possono provocare imbrunimenti basali che portano a morte la pianta, oppure determinare l'infezione completa dei tessuti interni. In questo caso lo sviluppo del fungo all'interno del culmo ostacola il trasporto dell'acqua e delle sostanze nutritive, causando così la morte della pianta o l'emissione di spighe con fiori abortiti che hanno un aspetto biancastro e un portamento eretto: a volte la pianta infetta può portare spighe con cariossidi che però risultano striminzite. Anche la resistenza meccanica del culmo può venire compromessa dalla malattia, per cui le piante risultano maggiormente soggette all'allettamento (Corazza *et al.*, 1987; Corazza e Balmas, 1994; Clement e Parry, 1998; Bateman e Murray, 2001; Champeil *et al.*, 2004).



Fig.1: sintomi tipici del “mal del piede” su piante di frumento.



Fig.2: coltura di *F. culmorum*, realizzata in piastra Petri su mezzo solido Potato Dextrose Agar (PDA).

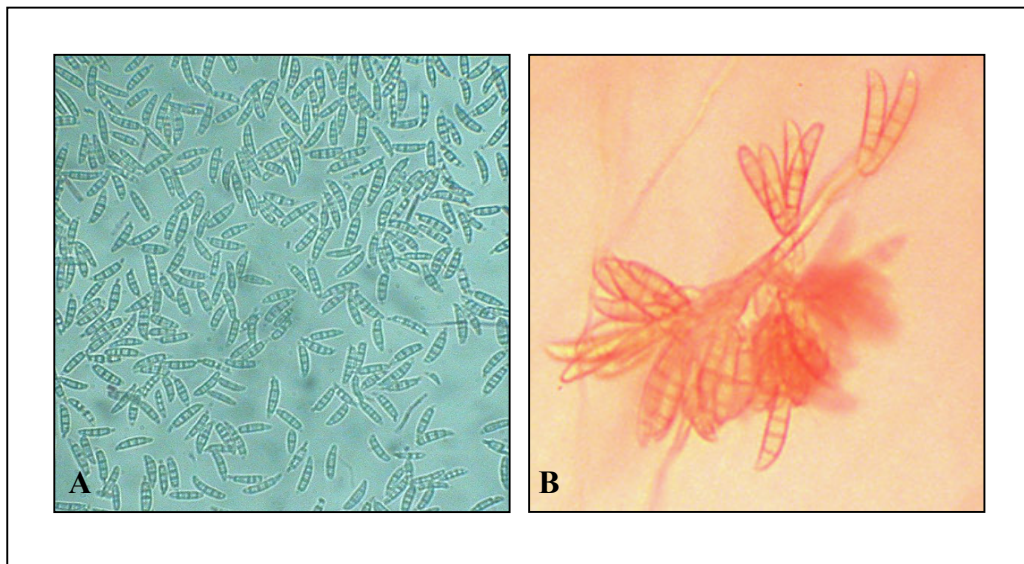


Fig. 3: osservazioni microscopiche di macroconidi di *F. culmorum* (**A:** macroconidi; **B:** macroconidi e conidiofori monofialidi).

Oltre che come clamidospora, *F. culmorum* si conserva anche su molte graminacee spontanee e sotto forma di micelio sui residui colturali rimasti nel terreno, adattandosi a vita saprofitaria.

F. culmorum produce anche delle micotossine; queste sono metaboliti secondari dei funghi, tossici per l'uomo e per gli animali. La presenza di micotossine nei prodotti di origine vegetale destinati sia all'alimentazione umana che animale è continuamente segnalata in indagini condotte in tutto il mondo, anche in concentrazioni tali da causare intossicazioni alimentare (micotossicosi) (Bottalico, 1998).

Le tossine prodotte da *F. culmorum* appartengono al gruppo dei tricoteceni, in particolare deossinivalenolo (DON). Queste micotossine destano forti preoccupazioni, sia perché si ritrovano facilmente nelle cariossidi sia perché sono dotate di notevole tossicità (Moretti *et al.*, 2002; Snijders, 2004). Il DON detto anche vomitossina, può avere nei mammiferi effetti neurotossici e immunotossici ed è responsabile di sindromi emetiche e anoressiche negli allevamenti zootecnici. Oltre ai tricoteceni, *F. culmorum* produce zerealenone. Lo zerealenone ha una azione estrogeno-simile, e la specie suina è la più sensibile (Campagna *et al.*, 2005).

Si è ipotizzato che i tricoteceni prodotti dal patogeno nell'apparato riproduttivo del frumento siano implicati nella patogenesi come fattore di virulenza attraverso un'azione diretta nei confronti dei ribosomi (Proctor *et al.*, 1995; Miller e Ewen, 1997). Inoltre le micotossine potrebbero interferire negativamente nella risposta di difesa post-infezionale (Kang e Buchenauer, 2002).

La penetrazione di *F. culmorum* nel frumento avviene attraverso il coleoptile, l'ipocotile o entrambi, per mezzo degli stomi o per via diretta o per ferita. L'evasione del fungo avviene sempre attraverso le zone lesionate o gli stomi con la formazione di sporodochi da cui i macroconidi vengono dispersi (Malalasekera *et al.*, 1973). Il patogeno si localizza essenzialmente al colletto e negli internodi, mentre le radici rimangono inalterate; il tessuto parenchimatico colpito risulta esposto a causa del disfacimento della cuticola e della epidermide (Pisi e Innocenti, 2001) ma non è indagato il meccanismo patogenetico di tali modificazioni morfologiche. Il patogeno, una volta insediatosi, ha scarse capacità sistemiche tanto che si riscontra nel primo internodo e raramente nel secondo (Clement e Parry 1998).

Come già accennato *F. culmorum* è anche in grado di colonizzare l'apparato riproduttivo del frumento producendo danni diretti in termine di resa ed indiretti come produzione di pericolose micotossine. Attraverso studi ultrastrutturali si è osservato che il

patogeno è in grado di colonizzare le glume la lemma e la palea, nonché l'ovario; durante la colonizzazione si assiste alla degenerazione del citoplasma e degli organelli delle cellule colpite; inoltre, è stato osservato che le pareti cellulari in prossimità del tubulo germinativo appaiono meno dense indicando che durante il processo infettivo intervengono enzimi litici, quali i pectolitici (Kang e Buchenauer, 2002). Risultati simili sono stati ottenuti mediante indagini ultrastrutturali condotte sull'apparato riproduttivo di frumento a seguito dell'infezione di *F. avenaceum* e *F. graminearum* (Wanjiru *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2005); tale aspetto indica come questi patogeni, implicati nella fusariosi della spiga posseggano simili meccanismi patogenetici.

1.3 INTERAZIONE OSPITE-PATOGENO

1.3.1 STRUMENTI DI PATOGENESI DEL FUNGO

La maggior parte degli studi che hanno riguardato *F. culmorum* sono stati rivolti verso quelli che sono gli aspetti epidemiologici e fitoiatrici finalizzati al controllo del patogeno. Poco è stato fatto a livello di ricerca di base per chiarire gli aspetti fisiopatologici dell'interazione ospite-patogeno e per comprendere i meccanismi responsabili dello sviluppo della malattia.

Aspetti salienti della ricerca, in merito alle interazioni ospite-patogeno, sono rappresentati dallo studio dei fattori che condizionano da un lato l'aggressività del patogeno e dall'altro la resistenza dell'ospite. Non si è indagato ancora a sufficienza sulle strategie di aggressione utilizzate da *F. culmorum*, come sui meccanismi attuati dal frumento per contrastare attivamente la sua azione. I risvolti fisiopatologici di questa interazione meritano dunque di essere investigati.

Appare quindi indispensabile esporre sinteticamente le acquisizioni su quelli che sono i fondamentali strumenti di offesa del patogeno almeno nelle prime fasi della patogenesi.

Uno degli strumenti utilizzati dal fungo per insediarsi nell'ospite ed avviare la malattia con i relativi sintomi è la produzione di enzimi degradatori della parete cellulare ed in particolare di enzimi pectolitici (Goodman *et al.*, 1986). Tali enzimi sono i primi a comparire, in sequenza temporale, durante il processo infettivo, avendo lo scopo tra l'altro di facilitare l'azione di altri enzimi degradatori come le cellulasi, le emicellulasi e le xilanasi (Kang e Buchenauer, 2002). In una ideale sequenza di azione, dopo la lisi della

cuticola si verifica quella della parete cellulare. Questa viene degradata iniziando probabilmente dai composti pectici, poi da quelli emicellulosici per finire con quelli cellulosici, riflettendo in tal modo la diversa suscettibilità fisico-chimica dei corrispondenti polimeri di parete. Il processo si conclude con la demolizione del plasmalemma ad opera di proteasi e fosfolipasi (Walton, 1994).

Fusarium culmorum produce PNL (pectin-liasi) e PG (poligalatturonasi). Tali enzimi catalizzano la degradazione dei polisaccaridi pectici, che sono i componenti principali della lamella mediana.

Le PNL rompono i legami glucosidici al carbonio in posizione 4 e simultaneamente eliminano l'idrogeno in posizione 5, col risultato di produrre oligouronidi contenenti una unità galatturonica insatura, cioè con un doppio legame tra i carboni 4 e 5, all'estremità non riducente della catena spezzata. Il pH al quale solitamente mostrano maggiore attività è alcalino (7,5-9,0) e in certi casi richiedono la presenza di ioni Ca^{2+} (Albersheim e Killias, 1963; Albersheim, 1975).

Le PG scindono idroliticamente le unità di acido poligalatturonico ed hanno solitamente un pH ottimale acido (4,0-5,0).

Questi enzimi possono essere di tipo *exo*- o di tipo *endo*-. I primi agiscono con un meccanismo di distacco terminale sulla molecola di substrato, rilasciando monomeri o dimeri; i secondi invece agiscono internamente alla molecola del polisaccaride portando alla liberazione di unità più grandi od oligomeri. Il secondo tipo può essere facilmente distinto dal primo in quanto può rapidamente ridurre la viscosità dei polimeri ad alto peso molecolare, con alcuni tagli; gli *exo*-tipi produrranno invece una gran quantità di monomeri e dimeri (Okamoto *et al.*, 1964).

Gli enzimi coinvolti nella degradazione delle sostanze pectiche hanno un'importante funzione nel collasso dei tessuti; attaccano infatti le pareti cellulari inalterate macerando i tessuti e rendendo possibile l'accesso ad altri enzimi, come ad esempio le cellulasi. Proprio per questo motivo gli enzimi pectolitici risultano essere i primi ad apparire nel processo infettivo e soltanto negli ultimi stadi le cellulasi hanno un ruolo importante. E' stato comunque osservato che in condizioni naturali gli stadi finali della degradazione della parete cellulare vegetale vedono l'intervento massiccio di attività cellulosolitiche, provenienti da organismi invasori secondari, non veri patogeni ma piuttosto opportunisti. La sequenza descritta potrebbe confermare le teorie secondo le quali la degradazione dei poligalatturonidi è un prerequisito per l'azione di altri enzimi, anche se la maggior parte di essi può anche agire indipendentemente (Keegstra *et al.*, 1973).

Un sintomo chiaro e documentato dell'azione degli enzimi pectolitici a livello microstrutturale, è il rigonfiamento e la successiva degradazione delle pareti cellulari (Baker *et al.*, 1980; Clark e Lorbeer, 1976; Hislop *et al.*, 1979). Gli enzimi pectolitici uccidono le cellule vegetali (Purkayastha, 1970), come dimostrato usando enzimi pectici purificati (Hislop *et al.*, 1979; Mount *et al.*, 1970; Stephens e Wood, 1975) e con l'abbinamento di studi istologici (Mansfield e Richardson, 1981).

Non è ancora stato pienamente accertato se la morte cellulare avvenga prima della macerazione (Movahedi e Heale, 1990/b) o sia causata indirettamente dall'effetto tossico dei prodotti rilasciati dalla componente pectica della parete degradata (Cooper, 1984). Molte prove hanno suggerito in passato che la morte cellulare possa derivare dal danneggiamento del plasmalemma a causa della parete cellulare oramai indebolita, che non può a lungo contenere la pressione di turgore del protoplasto (Basham e Bateman, 1975). Alla luce di alcuni studi ultrastrutturali, questa interpretazione è sembrata una eccessiva semplificazione, visto che il danneggiamento della parete non si è mostrato così evidente da avere significativi riflessi sul protoplasto. L'ipotesi di Bateman (1976) riguardo lo scoppio del protoplasma per shock osmotico, a seguito del danneggiamento della parete, sembra a molti oramai superata, anche se tale fattore non è da escludere completamente (Hislop *et al.*, 1979).

Anche *in vitro* la produzione di enzimi pectolitici sembra avere una sua sequenza temporale, determinata dai cambiamenti nell'età della coltura e nel pH del mezzo, che di volta in volta favorirebbe l'una o l'altra attività enzimatica (Chilosi e Magro, 1997). Per ciò che riguarda l'attacco *in vivo* si dà importanza a tutti quei fattori che fanno abbassare il pH a livello delle lesioni, anche a causa della secrezione di acido ossalico che, chelando il calcio, rende il poligalatturonide più suscettibile alla degradazione (Bateman e Beer, 1965). L'abbassamento del pH col progredire dell'attacco è quasi sempre rilevabile, passando da valori di subacidità (~ 6) a decisa acidità (~ 3,5) (Marciano *et al.*, 1983; Movahedi e Heale, 1990/a).

Un ottimo esempio di tali meccanismi è fornito dalle PG. Per molti funghi agenti di malattie litico-necrotiche, le *endo*-PG sembrano essere le prime ad apparire *in vitro* quando il mezzo di coltura è costituito da estratti di parete come unica fonte di carbonio e che agiscono come forti induttori della sintesi (Cooper, 1977); è chiara la relazione tra crescita del fungo su tali prodotti e produzione di PG (Leone e Van den Heuvel, 1986). Esse sono responsabili della penetrazione, rendendo vulnerabili alla degradazione le pareti,

facilitando l'avanzamento delle ife e avviando la catena di produzione di altri isoenzimi con il rilascio di frammenti pectici (Leone, 1992; Leone *et al.*, 1990).

Le *endo*-PG sono presenti spesso nei conidi non germinati di diversi funghi (Verhoeff e Liem, 1978), rimanendo così coinvolte nei primi stadi d'infezione e confermando il possibile loro carattere tanto costitutivo che induttivo (Leone e Van den Heuvel, 1986; Verhoeff e Liem, 1978).

PNL e PG fanno, quindi parte del corredo enzimatico costitutivo, oltre che inducibile, di molti funghi (Chilosi e Magro, 1998; Zhang e Bruton, 1999).

Sembra oramai chiaro che alla comparsa di *endo*-PG aspecifiche, segue quella di *endo*-PG specifiche che attaccano solo alcuni settori della molecola pectinica; gli oligomeri così prodotti inducono il rilascio di *eso*-PG. In tal modo la loro azione combinata degrada i polisaccaridi pectici fornendo carbonio al fungo fitopatogeno.

Nella sequenza degradativa, dopo le *endo*-PG, si assiste all'attività delle *endo*-PL e successivamente a quella delle PME (Movahedi e Heale, 1990/b). Su questo argomento però i dati sono piuttosto scarsi, soprattutto per quanto riguarda il coinvolgimento dell'attività PL nel processo patogenetico. Le investigazioni su tale argomento suscitano interesse, confortate dalla probabile maggiore capacità delle PL di favorire l'elicitazione delle difese attive della pianta grazie ad una loro attività più lenta e meno distruttiva, rispetto alle PG, che rende possibile la formazione di prodotti di degradazione della parete in grado di esplicare la loro eventuale azione elicitoria (Broglie *et al.*, 1993).

Nell'ambito della regolazione nella produzione di isoenzimi pectolitici, molti cataboliti evidenziano azione repressiva sulla loro sintesi, anche se non tutti esibiscono tale capacità (Leone e Van den Heuvel, 1986).

La presenza di molte isoforme pectolitiche nei tessuti vegetali infetti è stata relazionata ad uno stato avanzato di infezione, quando il materiale vegetale è oramai degradato dal fungo. Questo potrebbe suggerire come diversi funghi parassiti si siano evoluti da ancestrali saprofitici la cui nicchia ecologica era il riciclaggio di materiale vegetale morto.

Anche l'approccio molecolare è stato usato nello studio di geni che codificano gli enzimi pectolitici (Annis e Goodwin, 1997). Attraverso tecniche di clonazione genica e di trascrizione del RNA messaggero, è stato osservato che le diverse forme isoenzimatiche di PG e PNL possono essere codificate da geni multipli e possono subire modificazioni proteiche post-trascrizionali (Bussik *et al.*, 1992; Templeton *et al.*, 1994; Bowen *et al.*, 1995). Attraverso questi studi è stato quindi possibile capire, che la capacità posseduta dal

patogeno di produrre molteplici forme isoenzimatiche è garanzia di un'elevata flessibilità fisiologica durante la patogenesi (Keon, 1990). Inoltre, le osservazioni relative alla regolazione della produzione di tali enzimi è stata confermata attraverso studi sui promotori dei geni codificanti tali enzimi (Bussik *et al.*, 1992).

Gli enzimi pectolitici, oltre ad essere coinvolti nella patogenesi (Chilosi e Magro, 1997-1998; Magro *et al.*, 1997), rilasciano oligosaccaridi pectici che, come dimostrato in altre associazioni ospite-patogeno (Broglie *et al.*, 1993; Côté e Hahn, 1994; Côté *et al.*, 1998; Palva *et al.*, 1992), possono avere un ruolo nell'elicitazione di sostanze di difesa, quali fitoalessine e proteine di patogenesi, entrambi riconosciuti quali fattori di resistenza (Magro *et al.*, 1997).

1.3.2 RESISTENZA DELL'OSPITE E ATTIVAZIONE DEI MECCANISMI DI DIFESA

Durante l'evoluzione le piante sono state sottoposte a svariati tipi di stress ambientali che hanno portato allo sviluppo di numerosi meccanismi di difesa per rispondere alle condizioni avverse.

Nel loro habitat naturale le piante possono subire danni da una enorme varietà di agenti patogeni quali funghi, batteri, virus, alcuni dei quali possono essere simbiotici o parassiti.

Ci sono tre tipi di relazioni che la pianta può stabilire con i microrganismi: la prima, che è anche la più comune, è la cosiddetta “interazione neutrale” o non interazione, la seconda è una “interazione di tipo benefica”, la terza è una “interazione dannosa” per la pianta. Nel primo tipo di interazione, né la pianta né il patogeno hanno la capacità di interagire e quindi probabilmente entrambi i soggetti non dispongono di meccanismi che permettono il loro riconoscimento.

Nel secondo tipo di interazione la pianta e l'agente microbico hanno la capacità di riconoscersi ed interagire in un mutualismo benefico stabilendo interazioni simbiotiche estremamente importanti; queste includono, ad esempio, le interazioni fra i batteri fissatori di azoto e le radici di alcune leguminose, le associazioni di funghi con le radici di alcune piante con la formazione di micorrize che in alcuni casi determinano l'aumento della capacità di adsorbire nutrienti dal suolo (Beringer *et al.*, 1984).

Il terzo tipo di interazione è molto più frequente e dannoso per la pianta; la gravità del danno è determinata dalla capacità del patogeno di riconoscere, entrare nei tessuti e parassitare il suo ospite e dall'abilità della pianta di contenere la sua attività. Il risultato

finale dell'interazione (resistenza o suscettibilità) è controllato dalle caratteristiche genetiche dell'ospite e del patogeno e anche dalle condizioni ambientali.

I geni di resistenza ed induzione di resistenza

La resistenza, in molte combinazioni ospite-patogeno, è la conseguenza di una interazione molecolare complementare (Keen, 1990). 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.*, 1995): a geni per la resistenza (*R*) dell’ospite corrispondono geni per l’avirulenza (*Avr*) del patogeno, e ciò determina uno specifico riconoscimento. I geni *Avr* conferiscono al patogeno un fenotipo avirulento se interagiscono con una pianta dotata dei geni di resistenza *R*. Questi geni segregano quasi sempre come singoli caratteri dominanti o semidominanti. Nelle interazioni “gene per gene” l’induzione delle risposte di difesa delle piante, durante le fasi iniziali del processo patogenetico è determinata dal riconoscimento da parte dell’ospite di specifiche molecole segnale del patogeno (elicitori), escrete o localizzate sulla superficie e codificate direttamente o indirettamente dai geni *Avr*; i geni *R* si ritiene che codifichino per i recettori di membrana di tali elicitori (Cervone *et al.*, 1997; Ebel, 1998; Knogge, 1996; Lucas, 1998; Nurnberger *et al.*, 1994; Staskawicz *et al.*, 1995; Unemoto *et al.*, 1997).

Oltre 20 geni *R* con specificità di riconoscimento per definiti geni *avr* sono stati isolati da sette specie vegetali, tra mono- e dicotiledoni. Questi geni sono efficaci nei confronti di patogeni fungini, batterici e virali, ed in un caso (gene *Mi* da pomodoro) anche contro insetti e nematodi (Martin, 1999). È stato proposto che i geni *R* codifichino per proteine, di cui molte citoplasmatiche (Scofield *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996), che riconoscono un elicitore prodotto direttamente o indirettamente dal gene *Avr* del patogeno, e che inizino la via di trasduzione del segnale che conduce alle risposte difensive della pianta; tuttavia non risultano ancora del tutto chiariti i meccanismi molecolari che sono alla base del riconoscimento da parte delle proteine *R* e di trasduzione del segnale per dare inizio alle risposte di difesa (Dangl e Holub, 1997; Martin, 1999; Staskawicz *et al.*, 1995). Oggi sono riconosciute cinque classi di geni *R*, tra cui geni codificanti per proteine chinasiche intra- ed extracellulari, alcune con ripetizioni ricche di leucina, altre extracellulari con siti di legame alle membrane cellulari (Martin, 1999). Talvolta sono state riscontrate due proteine *R*, appartenenti a due classi differenti di geni *R*, che agiscono contemporaneamente nei meccanismi di riconoscimento; esse potrebbero rappresentare due stadi della via di segnalazione e utilizzare gli stessi segnali per attivare simili risposte di

difesa. I vari prodotti dei geni *R* potrebbero dunque attivare simili meccanismi di difesa. (Martin, 1999). Il modello “recettore-elicitore” sembra dunque spiegare le basi genetiche di questa teoria.

La teoria “gene per gene”, con il coinvolgimento della risposta ipersensibile, è servita per descrivere patosistemi riguardanti patogeni intracellulari obbligati (virus e fitoplasmi) e patogeni intercellulari obbligati e facoltativi (funghi biotrofi, funghi e batteri necrotrofi, ma anche nematodi) (Cervone *et al.*, 1997; Knogge, 1996). Questi patosistemi suggeriscono come potrebbero intervenire sistemi di riconoscimento comuni o simili, ma anche meccanismi simili di trasduzione del segnale coinvolti in differenti vie di segnale di tipo “gene per gene” (Keen, 1990; Staskawicz *et al.*, 1995). Accanto a sistemi di riconoscimento specifici, ne esistono di aspecifici, con rilascio di svariati elicitori che inducono o amplificano i meccanismi di difesa (Fritig *et al.*, 1998).

La teoria “gene per gene” ha fornito la base per importanti studi molecolari, condotti su piante modello, come *Arabidopsis thaliana* (Baker *et al.*, 1997; Glazebrook, 1999). Gli studi genetici condotti su questo argomento ipotizzano per i geni *R* alcuni ruoli: oltre a rendere la pianta capace di rilevare specifiche molecole patogeniche *Avr*-specifiche (recettori), attivano la trasduzione del segnale per l’attivazione delle difese ed hanno la capacità di evolvere rapidamente nuove specificità per i geni *R*.

Gli studi in questo campo e più in generale sui geni che controllano l’espressione delle risposte di difesa possono aprire interessanti prospettive sulla loro funzione ed evoluzione, e condurre allo sviluppo di nuove strategie per il loro utilizzo ai fini del controllo delle malattie (Bent, 1996; Crute e Pink, 1996; Glazebrook, 1999; Hammond-Kosack e Jones, 1997).

Tra i meccanismi di difesa delle piante un fenomeno largamente osservato è la restrizione dell’area di propagazione del patogeno al sito immediatamente adiacente a quello di infezione; in alcuni casi, questa reazione è caratterizzata dalla necrosi delle cellule ospiti, ed è generalmente definita “risposta locale”. In aggiunta a questa risposta primaria molte piante attivano una serie di meccanismi generali di difesa che coinvolgono tutti i tessuti vegetativi; questa resistenza sistemica acquisita (Systemic Acquired Resistance, SAR), si manifesta come un aumento della resistenza ad una seconda infezione, che può avvenire anche in altre parti della pianta, ad opera dello stesso od altri agenti patogeni (Kuc, 1987).

Queste risposte consistono nell'attivazione di molti geni inducibili con il conseguente accumulo di nuove molecole che non sono normalmente presenti o lo sono solo a bassi livelli nelle piante non stressate.

Barriere strutturali

In aggiunta a questa gamma di difese attive, la pianta possiede delle barriere fisiche passive come la cuticola e la parete cellulare che, però, non sono ugualmente efficaci contro tutti i tipi di patogeni. La cuticola protegge tutte le superfici e le parti aeree della pianta formando uno strato impermeabile che le protegge dall'essiccamento e inoltre agisce come una barriera che impedisce almeno parzialmente l'entrata di alcuni patogeni. La parete cellulare è una elaborata matrice extracellulare che circonda ogni cellula vegetale ed è costituita da robuste fibre di cellulosa immerse in una matrice polisaccaridica composta da pectine, emicellulosa e glicoproteine (Fry, 1986). La parete cellulare oltre ad esplicare funzioni di scheletro e di trasporto svolge anche un importante ruolo di protezione (McNeil *et al.*, 1984). Infatti, in seguito all'infezione da parte di batteri o funghi, le cellule vegetali rinforzano la loro parete cellulare aumentando la deposizione di callosio (polimero costituito da unità β -1,3-glucosio), lignina (Vance, 1980), e proteine ricche di idrossiprolina (estensine) (Collinge, 1987). Affinchè l'infezione sia efficace molti patogeni producono enzimi in grado di depolimerizzare la parete cellulare vegetale (McNeil, 1984), nel contempo vengono rilasciati prodotti di demolizione che possono funzionare anche da tempestivi segnali di allarme per la cellula ospite (Darvill e Albersheim, 1984).

La risposta ipersensibile e lo stress ossidativo

La risposta di ipersensibilità (HR) è la forma più efficiente con la quale un genotipo di pianta resistente si oppone all'aggressione di un potenziale patogeno. Essa viene definita come una necrosi di rapida formazione, localizzata nel punto di contatto del patogeno ed è in grado di manifestarsi in risposta a funghi, oomiceti, batteri e virus. La HR è limitata ad un numero ristretto di cellule e, nella maggior parte dei casi è stata osservata a seguito di interazioni ospite-patogeno di tipo "gene per gene" (Greenberg, 1997). E' stato ipotizzato inoltre, che la HR sia una forma di morte cellulare programmata in quanto esistono alcune similitudini tra HR e l'apoptosi nei mammiferi (Greenberg, 1996; Heath, 1998). In tali condizioni il patogeno non è in grado di completare la fase di penetrazione e viene quindi confinato nell'ambito di un numero limitato di cellule (Van Loon, 1997). La HR è caratterizzata inoltre da una intensa alterazione metabolica nelle cellule circostanti le

lesioni necrotiche, che determina l'attivazione di geni di difesa. Tale effetto viene indicato con il termine di “resistenza acquisita localizzata” (Localised Acquired Resistance, LAR) e contribuisce alla compartimentazione del potenziale patogeno. La HR spesso attiva un tipo di resistenza non specifico che si manifesta in zone diverse da quelle di contatto del patogeno, in grado di assicurare una protezione durevole nei confronti dell'infezione di diversi patogeni. Questo tipo di resistenza viene definito “resistenza acquisita sistemica” (Systemic Acquired Resistance, SAR) (Ryals *et al.*, 1996; Sticker *et al.*, 1997). La risposta di ipersensibilità viene considerata una tipica reazione di resistenza nei confronti di funghi biotrofi, in quanto mediante essa le cellule di contatto necrotizzate non offrono nessun supporto trofico; è stato osservato tuttavia che essa rappresenta un mezzo di contenimento efficace anche nei confronti di funghi necrotrofi. La possibilità che un patogeno geneticamente virulento su una determinata pianta possa soggiacere ad una limitazione nella sua patogenicità attraverso la formazione di lesioni necrotiche può essere legata alle condizioni ambientali nelle quali l'interazione ospite-patogeno si esprime (Dann e Deverall, 2000) oppure alla composizione dell'inoculo nel caso di infezioni artificiali. È stato infatti osservato la possibilità di ottenere lesioni necrotiche e quindi reazioni di resistenza per mezzo di inoculazioni di funghi necrotrofi virulenti su piante suscettibili derivava dall'utilizzo di un inoculo composto da un numero limitato di spore (Sutton e Deverall, 1984; Chilosi e Magro, 1997; Buzi *et al.*, 2000). Inoltre, l'inoculazione artificiale di *Botrytis cinerea* è possibile solo se presenti nella sospensione conidica determinati elementi nutritivi (Leone, 1990). Al contrario, è stato recentemente osservato che la comparsa di HR a seguito d'infezioni di *A. thaliana* con *B. cinerea* e con *Sclerotinia sclerotiorum* non solo non è legata a fenomeni di resistenza, ma invece consente l'inizio della colonizzazione del patogeno (Govrin e Levin, 2000). Un altro caso particolare è quello relativo alla interazione ospite-patogeno pomodoro-*Phytophthora infestans*. Nel caso di resistenza l'infezione si risolve con la rapida comparsa di HR in grado di bloccare l'infezione dell'oomicete. Tuttavia, occasionalmente il patogeno è in grado di superare la barriera della HR ed iniziare la colonizzazione biotrofica (Vleeshouwers *et al.*, 2000). La HR pertanto può considerarsi come un mezzo fondamentale con il quale le piante si oppongono al tentativo d'infezione dei patogeni, anche se il suo manifestarsi è condizionato da diversi elementi, principalmente il tipo di interazione ospite-patogeno e le condizioni ambientali. La reazione di HR è preceduta da risposte rapide e transitorie a livello della superficie cellulare che prendono il via a partire da elementi preformati. Tali

risposte sono essenzialmente flussi ionici, cambiamenti nel livello di fosforilazione, variazioni nel livello di pH apoplastico e del potenziale di membrana e lo stress ossidativo.

Una delle prime risposte delle piante nei confronti di potenziali patogeni è la produzione nella superficie esterna della cellula di composti di ossigeno attivo (Reactive Oxygen Intermediates, ROI, indicati anche con il termine Active Oxygen Species, AOS e Reactive Oxygen Species, ROS), come ad esempio il superossido (O_2^-) ed il perossido d'idrogeno (H_2O_2). Questo processo viene indicato come “stress ossidativo” (oxidative burst) e risulta possedere un ruolo chiave nei fenomeni di resistenza (Levine *et al.*, 1994; Lamb e Dixon, 1997; Alvarez *et al.*, 1998; Jabs, 1999). E' stato constatato che i ROI vengono accumulati a seguito di infezioni con isolati avirulenti di funghi, batteri e virus, da elicitatori specifici e non e da oligogalatturonidi di natura endogena (Apostol *et al.*, 1989; Baker *et al.*, 1993a, 1993b; Kauss e Jeblick, 1996; Levine *et al.*, 1994; Mehdy, 1994; Nünberger *et al.*, 1994; Rustérucchi *et al.*, 1996; Jabs *et al.*, 1997). Inoltre, la produzione di ROI viene espressa nell'ambito di pochi minuti dal momento del contatto fra ospite e patogeno e viene indicata come la prima fase della HR (Levine *et al.*, 1994). I ROI vengono generati a livello della membrana plasmatica o extracellularmente nell'apoplasto. L'enzima NADPH ossidasi della membrana plasmatica viene indicato come la principale fonte di ROI durante lo stress ossidativo (Lamb e Dixon, 1997). Sono state tuttavia proposte altre vie di formazione di H_2O_2 nell'apoplasto che implicano l'azione di perossidasi dipendente da pH alcalino e dalla presenza di un riducente (Bolwell *et al.*, 2002), da ossalato ossidasi (WoJtaszek, 1997), ammino ossidasi (Bolwell e WoJtaszek, 1997). La H_2O_2 viene indicata come il segnale diffusibile nella induzione di geni di difesa e come molecola segnale localizzata nel sito di tentata infezione (Levine *et al.*, 1994). Tale molecola è anche implicata nella trasmissione sistemica del segnale in altri tessuti (Alvarez *et al.*, 1998). Tuttavia, a causa del fatto che la H_2O_2 ha vita estremamente breve, viene escluso che essa possa rappresentare il segnale mobile di trasmissione per via sistemica alla base del fenomeno della induzione di resistenza. E' stato proposto che la trasmissione avvenga attraverso la formazione per via sistemica di microscopiche lesioni necrotiche o micro-HR (microburst), generate dalla progressiva produzione di H_2O_2 via NADPH ossidasi (Alvarez *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1998). L'amplificazione del segnale in tale modello verrebbe assicurata dalla produzione di acido salicilico e dalla sua attività antagonistica sull'attività della catalasi (Van Camp *et al.*, 1998). Inoltre, è stato suggerito che anche O_2^- e i suoi derivati siano in grado di funzionare come molecola segnale e che tale azione possa avvenire indipendentemente dalla H_2O_2 (Vranová *et al.*, 2002).

La H_2O_2 è implicata in diversi aspetti legati alla difesa. Promuove la formazione di legami incrociati di natura ossidativa nella parete cellulare della pianta (Brisson *et al.*, 1994), costituisce il substrato per la perossidasi nelle fasi iniziali del processo di lignificazione (Halliwell, 1978). Presenta inoltre attività protettiva diretta nei confronti dei microrganismi fitopatogeni, in quanto possiede attività antimicrobica (Peng e Kuc, 1992; Wu *et al.*, 1995). A seguito del riconoscimento del patogeno, le cellule interessate al tentativo d'infezione, presentano una modificazione dei flussi ionici transmembrana, con un aumento del influsso di ioni Ca^{++} e H^+ e del deflusso di ioni K^+ (Atkinson *et al.*, 1990). Non è chiaro quale sia il rapporto causale di questo evento e lo stress ossidativo e quale meccanismo preceda l'altro (Levine *et al.* 1994; Levine *et al.* 1996; Jabs *et al.*, 1997). La produzione di ROI è al centro del sistema di difesa di tipo ossidativo, ma non sembra rappresentare il segnale specifico per l'insorgenza della HR (Glazener *et al.*, 1996; Jabs *et al.*, 1997; Dorey *et al.*, 1999). L'insorgenza della HR potrebbe essere promossa dalla produzione di ROI in sinergismo con quella di ossido nitrico (NO) (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998), molecola già conosciuta come importante segnale nel sistema immunitario dei vertebrati (Schmidt e Walter, 1994). La morte cellulare durante la HR viene messa in relazione con la perdita di struttura e funzionalità delle membrane mediante dei meccanismi causali allo stress ossidativo, attraverso la degradazione degli acidi grassi grassi linoleico e linolenico, importanti costituenti delle membrane vegetali (Adam *et al.*, 1989; May *et al.*, 1996; Mitler *et al.*, 1996; Rustérucci *et al.*, 1996). La rapida e cospicua produzione di ROI è in grado di intervenire sulle membrane iniziando la perossidazione dei lipidi di membrana attraverso la produzione di radicali liberi di acidi grassi. Il processo in seguito può essere propagato per autossidazione (Porter *et al.*, 1995). La perossidazione lipidica risulta essere un processo finale della HR e coincide spesso con la fase di necrosi. Poiché la produzione di ROI precede la perossidazione lipidica, si reputa che i ROI siano implicati nella attivazione del danno alla membrana e conseguentemente della HR (Adam *et al.*, 1989; Tenhaken *et al.*, 1995; Jabs *et al.*, 1997). Il processo di perossidazione a carico di lipidi di membrana, acido linoleico e linolenico viene anche catalizzato attraverso la produzione di lipossigenasi (LOX) (Croft *et al.*, 1990; Kondo *et al.*, 1993; Rustérucci *et al.*, 1999; Maccarrone *et al.*, 2000) con un ruolo di primaria importanza durante la HR (Rustérucci *et al.*, 1999). L'importanza delle lipossigenasi durante la HR è stata messa in rilievo da esperimenti condotti utilizzando l'interazione tabacco-*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* con piante transgeniche esprimenti un gene lipossigenasi-antisense (Rancé *et al.*, 1998); in questo lavoro si è osservato che le piante transgeniche risultavano

suscettibili contrariamente a quelle non trasformate che invece offrivano una reazione di incompatibilità al patogeno. Tuttavia, non è chiaro quanto la perossidazione dei lipidi di membrana durante la HR sia indotta dai ROI e dai radicali liberi o dalla LOX. I due meccanismi potrebbero operare in parallelo od essere esclusivi (Rustérucci *et al.*, 1999). La produzione di tale enzima è stata messa in relazione con diversi processi metabolici legati alle difese della pianta (Porta e Rocha Sosa, 2002). Il contributo delle lipossigenasi alla resistenza è dovuto anche al fatto che la cascata metabolica determinata da tali enzimi porta alla formazione di composti quali, gli idroperossidi, alcheni ed aldeidi con proprietà tossiche nei confronti sia della cellula vegetale, ma anche del patogeno (Croft *et al.*, 1993; Farmer, 1994; Farmer *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 1999). L'azione delle lipossigenasi porta inoltre alla sintesi di importanti e potenti regolatori biologici, gli jasmonati (JAs), acido jasmonico (JA) e metil jasmonato (MeJA) (Creelman e Mullet, 1997).

La via segnale degli jasmonati

Gli JAs regolano funzioni fisiologiche quali, crescita, senescenza, reazioni da ferita e risposte di difesa nei confronti di microrganismi fitopagani (Weber, 1997; Siedow, 1991). Gli jasmonati sono stati ottenuti inizialmente come sostanze volatili presenti nell'olio essenziale *Jasminum grandiflorum* e *Rosmarinus officinalis* e sono stati quindi oggetto di molti studi a causa del loro valore commerciale nella industria dei profumi (Creelman e Mullet, 1997). Lo JA è il prodotto terminale della via metabolica degli acidi octodecanoidi che comprende la produzione di numerosi composti intermedi attivi dal punto di vista biologico (Turner *et al.*, 2002). Le risposte mediate dallo JA possono essere attivate da stress biotici ed abiotici così come da elicitori (Doares *et al.*, 1995; Kramell *et al.*, 1995; Parchmann *et al.*, 1997; Vijayan *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1999; Leon *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2002; Buzi *et al.*, 2004). Lo JA rientra come molecola segnale delle risposte di difesa a seguito di ferita (Farmer e Ryan, 1992). E' stato osservato che, in foglie di pomodoro sottoposte a ferita sono in grado di trasmettere in modo sistemico il segnale di ferita e questo segnale porta alla produzione di proteine di difesa tra cui gli inibitori di proteinasi (PR6) (Pearce, 1991; Farmer e Ryan, 1992). Il segnale di ferita viene mediato attraverso la produzione a partire dalle cellule interessate allo stress, di un polipeptide di 18 aminoacidi denominato sistemina a partire da una molecola precursore denominata pro-sistemina (Farmer e Ryan, 1992). La sistemina ed è in grado di attivare una cascata metabolica a livello intracellulare che determina il rilascio di acido linolenico dalle

membrane e la relativa conversione di tale composto in oxylipine, viene rilasciata nel sistema vascolare dove attiva la biosintesi di acido jasmonico nelle cellule del parenchima e conseguentemente la sintesi di geni preposti alla difesa, tra cui una poligalatturonasi, ulteriore prosistemia, lipossigenasi e ROI (Bergey *et al.*, 1999; Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001). L'attività catalitica delle poligalatturonasi porta alla produzione di oligogalatturonidi i quali sono in grado di stimolare la produzione di H₂O₂ (Stennis *et al.*, 1998) che è in grado di diffondersi attraverso i fasci vascolari nelle cellule del mesofillo dove attiva l'espressione di proteine PR e altri composti di difesa, fra cui la PR6 e la polifenolossidasi (Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001). Recentemente è stato osservato che anche lo stesso JA è in grado di comportarsi come molecola segnale (Li *et al.*, 2000). Tale molecola verrebbe prodotta a partire dalla metabolismo della membrana cellulare unitamente alla sistemina nel sito di ferita e verrebbe trasportata in modo sistemico. Il processo di segnalazione nelle cellule del mesofillo avverrebbe per un processo di amplificazione del segnale ad opera dell'azione della sistemina. Il processo si conclude per intervento di enzimi in grado di inibire l'azione della sistemina (Ryan e Moura, 2002).

La produzione di JAs conduce all'induzione di determinati geni e proteine di difesa, la tionina (Epple *et al.*, 1995; Vignutelli *et al.*, 1998), defensina (Penninckx *et al.* 1998). Lo JA inoltre induce la trascrizione dei geni che regolano la sintesi dello stesso JA (Heitz *et al.*, 1997; Laudert e Weiler 1998; Mussig *et al.*, 2000; Ishiguro *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2001). Osservazioni effettuate per mezzo di un analisi di microarray ha confermato la presenza di un sistema "feedback" per la biosintesi di JA (Sasaki *et al.*, 2001). Tali composti infatti hanno la capacità di agire come molecole segnale nell'attivazione di diversi processi metabolici tra cui quelli intervengono nelle risposte di difesa. L'attività dello JA, il suo precursore l'acido 12-octo-phytodienoico (OPDA) ed altre oxylipine come segnali di difesa indicano come le risposte di difesa possano essere regolate da un complesso di segnali (Krumm *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 1997; Bate e Rothstein, 1998). In particolare, è stato osservato che anche OPDA risulta essere un segnale di difesa, in grado di indurre resistenza anche in assenza di JA (Stintzi *et al.*, 2002).

Composti antimicrobici e le proteine di patogenesi (PR)

Le cellule delle piante attaccate da un agente patogeno sintetizzano un gran numero di composti in grado di svolgere un ruolo protettivo nella difesa delle piante; fra queste citiamo:

a) le fitoalessine, molecole di basso peso molecolare (5 kDa) dotate di proprietà antimicrobiche e tossiche nei confronti di alcuni funghi e batteri patogeni (De Witt, 1987, Darvill e Albersheim, 1984);

b) gli inibitori di proteasi, che agiscono contro batteri ed insetti probabilmente inattivando i loro enzimi digestivi (Ryan, 1992);

c) le proteine "pathogenesis-related" (PR) , così definite perchè vengono sintetizzate in seguito a svariati tipi di stress biotici ed abiotici (Van Loon, 1985; Boller, 1987; Carr e Klessing, 1989; Bol *et al.*, 1990; Dixon e Lamb, 1990; Linthorst, 1991).

Particolare interesse destano alcune classi di composti proteici appartenenti alle "Pathogenesis-Related (PR) proteins" (indicate genericamente come PR), prodotte dalla pianta ospite ed indotte solo in situazioni patologiche o ad esse correlate *sensu lato* (Antoniw *et al.*, 1980). Le proteine di patogenesi sono state ritrovate in varie specie appartenenti a differenti famiglie, sia angio- che gimnosperme (es. amarantacee, chenopodiacee, composite, crucifere, cucurbitacee, graminacee, malvacee, papilionacee, pinacee, rutacee, solanacee, ombrellifere, vitacee) (Casacuberta *et al.*, 1991; Jung *et al.*, 1993; Shewry e Lucas, 1997; Van Loon, 1985-1999). Esse sono state identificate per la prima volta nelle foglie di tabacco, in un caso di induzione a seguito di reazione di ipersensibilità, causata da infezioni con virus del mosaico TMV (Gianinazzi *et al.*, 1970; Van Loon e Van Kammen, 1970).

Recentemente le proteine PR sono state suddivise in 14 famiglie in base ad omologie strutturali e a correlazioni sierologiche e funzionali (Van Loon e Van Strien, 1999). All'interno di ciascuna famiglia di proteine PR esistono sia isoforme extracellulari che intracellulari (Kauffmann *et al.*, 1987; Shinshi *et al.*, 1990); esistono, inoltre, sia isoforme basiche che acide. Di solito le isoforme acide vengono secrete nell'ambiente extracellulare (apoplasto) mentre i loro omologhi basici mostrano una localizzazione vacuolare (Van den Bulcke *et al.*, 1989). Questo riflette, probabilmente, l'esigenza per la pianta di possedere due linee difensive attive distinte; la linea più esterna, rappresentata dallo spazio extracellulare, sarebbe mirata all'indebolimento del patogeno prima che questo possa superare le barriere passive, mentre quella più interna, rappresentata dal vacuolo, costituirebbe un'ulteriore difesa in caso di ingresso all'interno della cellula.

Proteine PR-1. Le proteine PR-1 sono state ampiamente caratterizzate dal punto di vista molecolare, ma la funzione biologica è tuttora sconosciuta. Le proteine che appartengono a questa famiglia sono le più abbondanti in quanto si accumulano nei tessuti infettati fino a raggiungere una concentrazione pari anche all'1-2% delle proteine totali (Alexander *et al.*, 1993). Queste proteine mostrano un peso molecolare di 15-17 kDa ed esistono sia isoforme acide che basiche (Antoniw *et al.*, 1980; Mastuoka e Ohashi 1984). Tutte le isoforme acide possiedono un peptide segnale N-terminale di 30 residui amminioacidici responsabile della traslocazione attraverso il reticolo endoplasmatico. La caratteristica di essere fortemente indotte in risposta ad infezioni da parte di patogeni e a trattamenti con SA ed etilene (Van Loon, 1985), indica che queste proteine svolgono un ruolo centrale nei meccanismi di difesa delle piante. Questa ipotesi è avvalorata dal fatto che proteine PR-1 isolate da tabacco e pomodoro possiedono attività antifungina in vitro (Nidermann *et al.*, 1995), inoltre, l'espressione di una di tali proteine in piante transgeniche di tabacco rende queste ultime più resistenti contro due funghi oomiceti (Alexander *et al.*, 1993).

Proteine PR-2. Le proteine appartenenti a tale famiglia sono largamente distribuite nel regno vegetale e rappresentano una delle prime famiglie di proteine PR di cui è stata nota l'attività enzimatica, si tratta infatti di β -1,3-glucanasi (Boller, 1987; Kauffmann *et al.*, 1987). Le proteine PR-2 esistono in svariate isoforme che differiscono nel peso molecolare, punto isoelettrico, struttura primaria, localizzazione cellulare e regolazione genica. Sulla base dell'identità di sequenza sono state classificate in tre classi strutturali (Payne *et al.*, 1990). Tali proteine all'interno di ciascuna classe mostrano una identità di sequenza molto elevata (circa il 90%), ma tale identità si abbassa al 50% tra le varie classi.

Le β -1,3-glucanasi si accumulano durante molti processi fisiologici quali: la germinazione del seme (Høj *et al.*, 1989), la crescita dell'ipocotile e del coleoptile in mais (Huber e Nevins, 1980), la regolazione del trasporto nel floema, la mobilitazione del callosio (Abeles e Forrence, 1970), la fioritura (Neale *et al.*, 1990), la crescita del tubetto pollinico (Roggen e Stanley, 1969), la maturazione dei frutti (Hinton e Pressey, 1980) oltre che in seguito all'attacco dei patogeni (Linthorst, 1991).

I geni codificanti questa famiglia di proteine sono regolati in maniera differenziale nei tessuti e durante lo sviluppo, inoltre, la loro espressione è indotta anche da stress, ormoni (Felix e Meins, 1987) ed elicitori fungini (Lamb *et al.*, 1989). E' stato inoltre

proposto un ruolo diretto di questi enzimi nei meccanismi di difesa delle piante in quanto il substrato di queste proteine è uno dei maggiori componenti delle pareti delle ife fungine.

Parecchi esperimenti di attività antifungina *in vitro* mostrano che solo gli enzimi di classe I sono capaci di lisare l'apice ifale e di inibire la crescita del fungo *Fusarium solani* (Sela-Burlange *et al.*, 1993).

Tali enzimi possono inoltre rilasciare oligosaccaridi dalla parete cellulare del patogeno che possono agire come elicitori delle reazioni di difesa della pianta (Boller, 1993).

Proteine PR-3, PR-8, PR-11. Le proteine appartenenti a queste classi sono caratterizzate da attività chitinasi.

Le chitinasi sono enzimi che idrolizzano la chitina, un polimero costituito da unità di N-acetilglucosammina unite da legami glicosidici β -1,4. Queste famiglie enzimatiche mostrano un peso molecolare che varia tra 25 e 35 kDa; tutte le chitinasi delle piante fino ad ora isolate mostrano una attività endochitinasi, e differiscono nella struttura primaria, punto isoelettrico e localizzazione cellulare.

Sulla base della struttura primaria esse vengono raggruppate in 5 classi. La classe I comprende proteine basiche caratterizzate da un dominio N-terminale ricco in cisteina capace di legare la chitina, ed un dominio catalitico C-terminale altamente conservato dotato di attività chitinolitica. Tale dominio è presente anche in altre proteine quali l'agglutinina di germe di grano, le lectine e nelle proteine codificate dai geni "win" di patata (Wright *et al.*, 1984; Shinshi *et al.*, 1990; Stanford *et al.*, 1989).

Gli enzimi di classe II sono privi del dominio N-terminale legante la chitina, ma mostrano una notevole identità di sequenza con il dominio catalitico delle chitinasi di classe I.

Gli enzimi di classe IV mostrano una identità di sequenza compresa tra il 41-47% rispetto alla classe I, tali chitinasi presentano un peso molecolare minore per effetto di tre delezioni nel dominio N-terminale e una delezione nel dominio C-terminale (Rasmussen *et al.*, 1992; Nielsen *et al.*, 1994).

Le chitinasi di classe I, II e IV vengono riunite nella famiglia delle PR-3. Gli enzimi di classe III sono caratterizzati da una attività chitinasi-lisozima e non mostrano identità di sequenza con le altre classi di chitinasi, per questo motivo sono state raggruppate nella famiglia PR-8.

Infine, le chitinasi di classe V mostrano una identità di sequenza con le esochitinasi batteriche; tali proteine dotate di attività antifungina sono state raggruppate nella famiglia delle proteine PR-11 (Melchers *et al.*, 1994).

La sintesi di chitinasi è fortemente indotta in risposta ad agenti abiotici quali etilene e SA, e fattori biotici quali funghi, batteri, virus e viroidi, e da elicitori di origine fungina o endogena. Spesso l'induzione delle chitinasi è accompagnata dall'accumulo di β -1,3-glucanasi e di altre proteine PR. Saggi di attività antifungina in vitro hanno dimostrato che le chitinasi inibiscono la crescita di diversi funghi patogeni, ed inoltre, presentano un effetto sinergico con le β -1,3-glucanasi (Sela-Burlange *et al.*, 1993), confermando il ruolo importante che queste idrolasi svolgono nei meccanismi di difesa delle piante. Tali risultati sono stati ulteriormente confermati dall'evidenza che piante transgeniche di tabacco e pomodoro che esprimono costitutivamente alti livelli di chitinasi e β -1,3-glucanasi mostrano una maggiore resistenza contro funghi patogeni (Jach *et al.*, 1995).

Proteine PR-4. Le proteine che appartengono a questa famiglia mostrano pesi molecolari che variano tra i 13 e i 20 kDa.

Tali proteine vengono classificate nelle classi I e II, sulla base della presenza o assenza di un dominio N-terminale ricco in cisteina. Al gruppo I appartengono le proteine codificate dai geni “win” isolati da foglie di patata sottoposte a ferite meccaniche (Stanford *et al.*, 1989). Successivamente sono stati isolati da foglie di *A. thaliana* altri due geni omologhi a “win1” e “win2” (Broekaert *et al.*, 1990; Potter *et al.*, 1993). Le proteine PR-4 codificate da questi geni sono caratterizzate dalla presenza di un peptide segnale idrofobico N-terminale responsabile del passaggio attraverso il reticolo endoplasmatico, e da due domini; un dominio N-terminale di 5 kDa ricco in cisteina e un dominio C-terminale di 13-14 kDa.

Molte proteine PR-4 sono state isolate da cereali, tra queste troviamo la CBP N isolata da semi di orzo, CBP 4 e CBP 5 isolate da foglie di orzo infettate con *Erysiphe graminis* (Hejgaard *et al.*, 1992). Sia la proteina purificata da orzo (barwin) che le proteine purificate da frumento (wheatwin1 e wheatwin2), sono dotate di spiccata attività antifungina nei confronti di svariati funghi fitopatogeni (Hejgaard *et al.*, 1992; Caruso *et al.*, 1996).

Proteine PR-5. 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), tre proteine indotte da stress osmotici e da infezioni fungine in tabacco, pomodoro e mais.

Le proteine appartenenti a questa famiglia sono suddivise sulla base del punto isoelettrico (pI) in tre classi: acide, neutre e basiche (Koiwa *et al.*, 1994). Le isoforme basiche in analogia a quelle delle altre famiglie PR, presentano una estensione al C-terminale di 22 residui amminoacidici coinvolta nella localizzazione vacuolare.

Le proteine PR-5 possiedono una spiccata attività antifungina nei confronti di un largo spettro di funghi fitopatogeni che si esplica nell'inibizione dell'allungamento ifale e della germinazione delle spore. Piante transgeniche di patata che esprimono costitutivamente alti livelli di osmotina mostrano una maggiore resistenza nei confronti di *Phytophthora infestans* (Liu *et al.*, 1993). Esperimenti condotti sull'osmotina indicano che il meccanismo di inibizione consiste nella permeabilizzazione della membrana plasmatica attraverso la formazione di pori, tale effetto dipende dall'interazione specifica tra la proteina e la parete/membrana del patogeno. Ulteriori esperimenti condotti su mutanti di lievito indicano che l'osmotina interferisce nelle vie di trasduzione del segnale che attivano il programma di apoptosi; questi dati indicano che l'osmotina può rappresentare un segnale che attiva la morte cellulare programmata (Yun *et al.*, 1998).

Proteine PR-6. Le PR-6 raggruppano gli inibitori di proteinasi; questi sono proteine di difesa regolate durante lo sviluppo della pianta e indotte in risposta ad attacchi di patogeni e insetti. Le proteinasi sono largamente distribuite nel regno vegetale e possono essere suddivise in 4 classi in base al meccanismo di azione: proteinasi a serina, a cisteina, aspartico-proteinasi e metallo proteinasi (Ryan, 1973).

Proteine PR-9. Le PR-9 comprendono le perossidasi, che nel regno vegetale sono state estensivamente studiate e ben caratterizzate dal punto di vista biochimico.

Questi enzimi sono ossidoreduttasi contenenti gruppi eme che utilizzano il perossido di idrogeno per l'ossidazione di substrati organici e inorganici (fenoli, indoli, lipidi e ioni metallici coordinati ad altre proteine).

Le perossidasi delle piante sono implicate in una grande varietà di processi fisiologici quali il metabolismo dell'auxina, la biosintesi dell'etilene, la formazione della lignina, nonché nei meccanismi di crescita e senescenza (Gaspar *et al.*, 1982).

Inoltre, in questi ultimi anni si è rafforzata l'idea che anche le perossidasi possano svolgere un ruolo attivo nei meccanismi di difesa delle piante. La parete cellulare rappresenta una prima linea di difesa contro gli organismi patogeni e le perossidasi giocano un ruolo chiave nei processi di costruzione e rafforzamento della parete (Vance *et al.*, 1980; Fry, 1986). Questi processi includono l'ossidazione dei fenoli, la lignificazione, la suberificazione e il cross-linking dei monomeri di estensina (Gaspar *et al.*, 1991; Rolando *et al.*, 1991), perciò, è stato proposto che isoforme acide extracellulari di perossidasi libere o legate alle pareti possano aumentare la resistenza mediante la costruzione o il rafforzamento delle barriere fisiche.

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). Tali reazioni sono invece ritardate o, addirittura, non indotte in interazioni di suscettibilità.

Inoltre, l'induzione in attività enzimatica è stata correlata con la SAR in piante di cetriolo (Smith *et al.*, 1991). La superfamiglia delle perossidasi delle piante è suddivisa in tre classi; alla classe I appartengono isoforme intracellulari, la classe II include le perossidasi fungine, mentre la classe III include molte isoforme extracellulari.

Sebbene le piante possiedano un numero molto elevato di geni che codificano per le perossidasi, solo alcuni di essi sono espressi in risposta a patogeni. Ad esempio, nel riso, solo 2 geni su 4 analizzati sono indotti da patogeni, nel frumento di 6 geni altamente omologhi solo 2 sono indotti da patogeno (Chittoor *et al.*, 1997; Rebmann *et al.*, 1991; Baga *et al.*, 1995). La presenza di copie multiple omologhe con differente espressione può riflettere un adattamento evolutivo della pianta a vari stimoli al fine di evitare una inappropriata espressione genica.

Ulteriori studi condotti sui geni di riso e orzo durante infezioni fungine forniscono l'evidenza che questi geni sono indotti più rapidamente e ad alti livelli nelle interazioni di resistenza che in quelle di suscettibilità (Chittoor *et al.*, 1997; Thordal-Cristensen *et al.*, 1992).

Proteine PR-12. Le proteine che appartengono a questa famiglia, dette anche defensine, sono state isolate da 13 specie vegetali; la comparazione delle sequenze amminoacidiche mostra che queste proteine 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).

Parecchie evidenze indicano che le defensine sono componenti importanti dei sistemi di difesa della pianta, essenzialmente nella protezione del seme nei primi momenti della germinazione. Parecchi membri di questa famiglia inibiscono infatti la crescita di funghi fitopatogeni (Terras *et al.*, 1995). Semi di rafano infettati con un fungo patogeno rilasciano una defensina dotata di attività antifungina, inoltre, piante transgeniche che esprimono alti livelli di questa proteina mostrano una maggiore resistenza al patogeno fogliare *Alternaria longipes* (Terras *et al.*, 1995).

Proteine PR-13. Le tionine sono proteine basiche ricche in cisteina di basso peso molecolare (5 kDa) che sono state identificate in dicotiledoni e monocotiledoni. Sulla base della sequenza amminoacidica le tionine sono raggruppate in 4 classi strutturali sulla base dei residui di cisteina e del pattern dei ponti disolfuro (Bohlmann *et al.*, 1994).

Tutte le tionine mostrano una elevata attività antifungina in vitro; alcune presentano, inoltre, sinergismo con le proteine lipid transfer (LTP) e le albumine di riserva 2S (Molina *et al.*, 1993; Terras *et al.*, 1993).

Le conoscenze al riguardo delle rimanenti famiglie di proteine PR rimangono tuttora scarse e frammentarie.

Gli inibitori proteici degli enzimi pectolitici

Esistono inoltre gli inibitori proteici delle poligalatturonasi (polygalacturonase-inhibiting protein, PGIP). Si tratta di composti di difesa prodotti dalla pianta che sono in grado di bloccare l'attività endo-poligalatturonasica dei funghi fitopatogeni. Biochimicamente queste sono glicoproteine localizzate nella parete cellulare vegetale e rappresentano una classe di proteine ad attività difensiva caratterizzate, dalla presenza di domini LRR (Leucine-Rich repeat). I geni codificanti le PGIP sono organizzati in famiglie multigeniche (De Lorenzo *et al.*, 2001), e potrebbero essere utilizzati in programmi di miglioramento genetico, per aumentare la resistenza delle piante ai funghi fitopatogeni che usano le PG come armi di patogenesi.

Le prime prove sperimentali sull'esistenza di proteine in grado di inibire l'attività poligalatturonasica, sono state condotte fin dagli anni sessanta, a partire da estratti acquosi di patata americana (Uritani e Stahmann, 1961). In seguito sono stati descritti numerosi

inibitori da altre dicotiledoni come: cetriolo, pisello peperone, pomodoro, mela, pera. Ci sono invece poche segnalazioni disponibili su PGIP provenienti da monocotiledoni; finora sono state ritrovate solo in specie ricche in sostanze pectiche quali *Allium cepa* e *Allium porrum* (Favaron *et al.*, 1993; Favaron, 2001).

Le PGIP sono tipicamente efficaci contro le *endo*- PG e non contro altri enzimi pectolitici, sia di origine microbica che fungina (Cervone *et al.*, 1990).

Alcune osservazioni suggeriscono l'idea di una correlazione tra la presenza di PGIP e la resistenza delle piante ai funghi. Si è infatti visto, che c'è un aumento della suscettibilità a *Botrytis cinerea* nelle pere mature correlato, alla diminuzione della concentrazione di PGIP (Powell *et al.*, 2000). Inoltre su lampone si è visto che il livello di PGIP era massimo nei frutti verdi, i quali erano più resistenti all'attacco fungino, mentre diminuiva nei frutti maturi, più suscettibili al suddetto attacco (Johnston *et al.*, 1993).

C'è una specificità di inibizione poichè PGIP provenienti da piante diverse presentano spesso spettri di inibizione diverso nei confronti di PG.

L'inibitore proteico della poligalatturonasi (PGIP) è quindi una proteina in grado di modulare l'attività delle *endo*-PG fungine e favorire l'accumulo di oligogalatturonidi.

A tal proposito è risultato estremamente interessante osservare che le catene degli oligogalatturonidi con una lunghezza compresa tra i 10 e 15 monomeri, che sono transitoriamente prodotte dall'azione delle PG sugli omogalatturonidi, sono induttori di difesa da parte della pianta; oligomeri più corti hanno poca o nessuna attività induttrice (Hahn *et al.*, 1989; Darvill *et al.*, 1992).

Nel riconoscimento che ci dovrebbe essere tra pianta e potenziale patogeno, le *endo*- PG e le PGIP possono comportarsi rispettivamente come molecola segnale ed il suo recettore proteico.

I geni codificanti per la PGIP da pero e da pomodoro danno luogo alla formazione di polipeptidi con rispettivamente 330 e 327 aminoacidi. La sequenza aminoacidica da pero è apparsa approssimativamente simile per un 65% a quella di *Phaseolus vulgaris*. La sequenza di PGIP clonata da soia è risultata per un 77% ed un 60,3% omologa a quella di fagiolo e di pero (Favaron *et al.*, 2000).

Nelle interazioni incompatibili, l'accumulo di mRNA di PGIP a è localizzato a livello dei siti di infezione. Questi dati indicano che l'espressione della PGIP avviene fin dai primi eventi di riconoscimento razza-specifici, analogamente a quanto osservato per le altre proteine di difesa. Inoltre, è stato osservato che l'induzione dell'espressione della

PGIP rappresenta un meccanismo attivo di difesa delle piante (Yao *et al.*, 1999; Favaron *et al.*, 2000).

L'induzione dell'espressione della PGIP durante l'infezione può essere considerata un'evidenza indiretta delle endopoligalatturonasi fungine nella patogenesi. Un'evidenza diretta di questo fatto potrebbe essere fornita dall'analisi di piante transgeniche che sovra-esprimono la PGIP (Ferrari *et al.*, 2003).

L'espressione costitutiva e la localizzazione nella parete cellulare fanno ritenere che le PGIP siano molecole di grande rilevanza nella difesa contro l'invasione fungina.

Quindi il ruolo delle PGIP è quello di aumentare la resistenza delle piante ai patogeni, migliorando la capacità della pianta di riconoscere il patogeno e interferendo con i meccanismi della patogenesi.

Poche e frammentarie sono, invece, le ricerche fatte sugli inibitori dell'attività pectin-liasica.

Sono stati estratti inibitori dell'attività pectin-liasica da piante di cipolla, fagiolini, paprica dolce, cavolo bianco e zucchini (Bock *et al.*, 1975).

Inoltre è stata purificata, da pareti cellulari di barbabietola da zucchero, una proteina in grado di inibire l'attività pectin-liasica di *Rhizoctonia solani*, *Phoma betae* ed *Aspergillus japonicus*. Questa proteina ha un peso molecolare di 57.500 daltons ed un punto isoelettrico (pI) di 9,9 (Bugbee, 1993). Non sono state condotte ulteriori ricerche sul ruolo di questa proteina.

2 SCOPO DELLA TESI

Indagini ultrastrutturali di Pisi e Kang suggeriscono il coinvolgimento degli enzimi in grado di degradare i polisaccaridi di parete nel binomio frumento-*F. culmorum*. Allo stato attuale non esistono informazioni riguardanti l'abilità di *F. culmorum* di produrre enzimi pectolitici.

Nell'ambito del curriculum "Interazione ospite-patogeno e resistenza delle piante e del tema "Il processo infettivo di *F. culmorum* su plantule di frumento: degradazione delle componenti della parete cellulare, induzione di metaboliti di difesa e variazione del pH tissutale", è stata intrapresa una ricerca focalizzata sull'approfondimento delle conoscenze riguardo agli aspetti fisiopatologici dell'interazione *Triticum aestivum*-*F. culmorum*.

Le indagini sono state rivolte allo studio degli strumenti di aggressione, quali produzione di enzimi pectolitici, pectin-liasi (PNL) e poligalatturonasi (PG), utilizzati dal fungo durante l'evento patogenetico; sono stati saggiati i tempi e le modalità con cui il fungo produce questi enzimi, sia *in vitro* che *in vivo* e negli spazi intercellulari ed intracellulari. Sono state inoltre studiate le variazioni del pH intra- e intercellulare che l'evento patogenetico produce.

Inoltre sono stati avviati gli studi per indagare sulla risposta della pianta all'infezione, attraverso l'espressione in sede apoplastica e simplastica di composti di difesa quali chitinasi, glucanasi, perossidasi e proteine PR-4, nonché sulla attività di tali enzimi in funzione della variazione del pH.

Tali aspetti, nel binomio *T. aestivum*-*F. culmorum*, sono in gran parte inesplorati e meritevoli di approfondimento.

Pertanto il lavoro si è articolato nelle seguenti fasi:

- 1) misura del grado di suscettibilità di diverse varietà di frumento tenero a seguito di infezione con *F. culmorum*
- 2) determinazione quantitativa e qualitativa degli enzimi pectolitici prodotti da *F. culmorum* *in vitro* e *in vivo* in sede apoplastica e simplastica
- 3) studio della variazione di pH, del mezzo di allevamento e dei tessuti vegetali infetti, determinato da *F. culmorum*

- 4) indagine sulla presenza di proteine difesa costitutivamente espresse nel frumento e indotte da inoculazione con *F. culmorum* in sede apoplastica e simplastica
- 5) indagine sulla variazione di attività di proteine enzimatiche di difesa, in funzione del pH ambientale

3 MATERIALI E METODI

3.1 PROVA DI SUSCETTIBILITÀ VARIETALE

La prova di suscettibilità varietale è stata eseguita per valutare la risposta di differenti varietà di grano tenero all'attacco di *F. culmorum*.

Le varietà di frumento tenero usate sono state: Pandas, Bolero, Abbondanza, Colfiorito e Centauro. Le cariossidi, preventivamente sterilizzate con ipoclorito di sodio al 3% per 5 minuti, ripetutamente sciacquate con acqua sterile fino alla completa eliminazione dell'ipoclorito, sono state seminate in vaschette di plastica di dimensioni 30x30 cm riempite con circa 4 Kg di sabbia sterile. In ogni vaschetta sono state seminate circa 400 cariossidi e ciascuna vaschetta è stata inoculata con 150 grammi di cariossidi su cui era stato fatto crescere il fungo per una settimana.

A una settimana dalla semina sono state prelevate le plantule e sono stati rilevati i sintomi di malattia sulla base di quattro classi di malattia fissate su una scala di valutazione da 0 a 10 e dove:

classe 0, cariossidi sane del tutto simili al controllo;

classe 1, cariossidi germinate con coleoptile lungo 2,5 cm, apparentemente sano ma con apparato radicale meno sviluppato del controllo sano;

classe 5, cariossidi germinate con coleoptile lungo un centimetro, apparato radicale poco sviluppato e con necrosi;

classe 10, cariossidi non germinate o con coleoptile appena accennato, apparato radicale inesistente o completamente necrotizzato.

L'indice di malattia è stato calcolato elaborando i dati secondo la formula di McKinney.

3.2 MATERIALE FUNGINO

L'isolato F.c. 57 del fungo fitopatogeno *Fusarium culmorum*, utilizzato nelle prove descritte in questa tesi, è stato fornito dall'Istituto Sperimentale per la Patologia vegetale-Roma. Il fungo è stato allevato su agar patata-destrosio (PDA) (OXOID, Unipath Ltd., Basingstoke, England). Per ottenere un'abbondante produzione di conidi le colonie fungine sono state poste in camera di crescita a 25°C e fotoperiodo di 12 ore con luce fredda bianca fornita da tre lampade fluorescenti da 40 W e da luce NUV fornita da lampade da 40 W

(Philips TL-RS F40 BLB). La sporificazione è stata osservata al microscopio Zeiss Axioscope a forte ingrandimento (40X10).

3.3 MATERIALE VEGETALE

Le cariossidi di frumento tenero, varietà Bolero, sono state sterilizzate con ipoclorito di sodio al 3% per 5 minuti, sono state ripetutamente sciacquate con acqua sterile fino alla completa eliminazione dell'ipoclorito, e poi seminate su uno strato di 5 mm di spessore di agar acqua (1,2% w/v), previa sterilizzazione e stratificazione dello stesso in vaschette di alluminio di cm 30x25; in ogni vaschetta sono state seminate circa 400 cariossidi, che sono state poste a germinare al buio ad una temperatura di 20°C.

A 24 ore dalla semina, ciascuna cariosside è stata inoculata con 20 µl di sospensione conidica ($1,5 \times 10^6$ spore per ml) di *F. culmorum*. La sospensione conidica è stata ottenuta mediante lavaggio superficiale con acqua distillata sterile della colonia fungina in attiva sporulazione su PDA in scatole Petri. Il conteggio delle spore è stato effettuato mediante cella ematocitometrica (Thoma). Nella tesi di controllo è stata usata acqua distillata sterile.

3.4 ALLEVAMENTO IN VITRO DI *F. CULMORUM*

3.4.1 ALLEVAMENTO IN VITRO DI *F. CULMORUM* PER LA PRODUZIONE DI ENZIMI PECTOLITICI

Per ottenere la produzione di enzimi pectolitici *F. culmorum* è stato allevato *in vitro* su substrato liquido di Czapek (Dox) opportunamente modificato (*) con pectina come unica fonte di carbonio. Inoltre è stato fatto un allevamento su Czapek (Dox), contenente glucosio come unica fonte di carbonio.

Il fungo è stato fatto crescere in beute da 250 mL, contenenti ciascuna 50 mL di mezzo liquido Czapek (Dox), chiuse con cotone idrofobo e sterilizzate a vapore fluente per 15 min. Ciascuna beuta è stata poi inoculata con un tondello di PDA del diametro 4 mm (mantenuto sospeso sul liquido mediante bacchetta di vetro ricurva), ricavato da colonie di *F. culmorum* in piastre Petri, di 7 gg. di età. L'allevamento in condizioni statiche ed in mezzo liquido è stato portato avanti per 15 gg., al buio ed a 25°C.

Il liquido di crescita di *F. culmorum* è stato sottoposto a misurazione del pH, successiva centrifugazione a 25000 g (Beckman J2-21M/E) per 30 minuti e dialisi per 24

ore contro tre cambi di acqua distillata a 4°C per l'ottenimento di un filtrato usato nelle analisi degli enzimi pectolitici.

(*) Composizione del mezzo liquido Czapek (Dox) modificato

NaNO₃ (2 g L⁻¹), KH₂PO₄ (1 g L⁻¹), MgSO₄·7H₂O (0,5 g L⁻¹), KCl (0,5 g L⁻¹), FeSO₄·7H₂O (0,01 g L⁻¹), ZnSO₄·7H₂O (0,01 g L⁻¹) e 10 g L⁻¹ di pectina da *Citrus* spp. (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) come unica fonte di carbonio, pH 5,0.

3.4.2 ALLEVAMENTO *IN VITRO* DI *F. CULMORUM* PER LA MISURAZIONE DEL pH E LA QUANTITÀ DI IONI AMMONIO

La variazione di pH e la quantità di ammonio prodotta da *F. culmorum* sono state determinate su filtrati colturali ottenuti facendo crescere il fungo su estratto di lievito. L'allevamento è stato realizzato in beute da 250 ml, contenenti 50 ml di estratto di lievito (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 1%, pH 4,0.

Le beute, previa sterilizzazione, sono state inoculate con una sospensione conidica di *F. culmorum* (1,0x10⁶ conidi per beuta), ottenuta dal lavaggio di colonie di *F. culmorum* in piastre Petri. L'allevamento in mezzo liquido è stato realizzato per 15 gg., al buio, a 25°C e in agitazione continua (150 rpm). Il liquido di crescita di *F. culmorum* è stato poi sottoposto a misurazione del pH, successivamente filtrato e centrifugato a 25000 g (Beckman J2-21M/E) per 30 minuti. Su tale filtrato è stata determinata anche la quantità di ammonio prodotto dal fungo.

3.5 ESTRAZIONE PROTEICA IWF (INTERNAL WASHING FLUID)

Le plantule sono state campionate a 24, 48, 72 e 96 ore dall'inoculo e da esse, dopo separazione mediante un bisturi sterile degli epicotili dalle radichette e dai residui delle cariossidi, i tessuti ipocotilici sono stati raccolti, pesati, tagliati in pezzettini lunghi circa 4 cm e messi in beker con acqua deionizzata sterile degassata con un rapporto peso volume 1/10. Nei beker è stato poi creato il vuoto, questo è stato poi tolto violentemente, richiamando così acqua negli spazi intercellulari. Sono stati fatti tre cicli di vuoto da 15 minuti ciascuno. Successivamente il materiale vegetale, previa asciugatura, è stato centrifugato a 12000 g per 15 minuti a 5°C, il surnatante è stato ritenuto e rappresenta il "fluido intercellulare di lavaggio" o IWF (Internal Washing Fluid).

3.6 ESTRAZIONE ENZIMATICA DA PLANTULE DI FRUMENTO

I tessuti ipocotilici, preventivamente sottoposti ad estrazione enzimatica dell'IWF (come descritto precedentemente), sono stati congelati, finemente polverizzati in mortaio freddo con azoto liquido e quindi sottoposti 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 riposta 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 scartato ed il surnatante ritenuto e dializzato contro acqua distillata a 4°C, con almeno tre cambi d'acqua e per non meno di 24 ore.

3.7 DETERMINAZIONE DELLA PROTEINA TOTALE

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 in soluzione acquosa l'estratto da saggiare ed il colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate), è stata letta a 595 nm. Per la determinazione della retta standard di riferimento è stata utilizzata BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma®).

La proteina totale è stata espressa in mg·mL⁻¹, utilizzando come riferimento la retta di taratura. 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.

3.8 DOSAGGIO QUANTITATIVO DELL'ATTIVITÀ PNL

L'attività PNL è stata saggiata spettrofotometricamente secondo la metodologia proposta da Albersheim (1964). Il metodo si basa sulla stima della quantità di uronidi insaturi rilasciati durante la reazione di depolimerizzazione della pectina ad opera dell'attività pectin-*trans*-eliminasi. Tali uronidi insaturi liberi presentano il massimo assorbimento a 235 nm. L'aumento della loro concentrazione nella miscela di reazione è proporzionale all'incremento di assorbanza a 235 nm.

Il substrato di reazione è risultato composto da pectina da *Citrus* (Sigma®) 0,25%, in tampone TRIS-HCl 0,1 M, pH 8,0 e CaCl₂, 1 M. L'incubazione è stata effettuata a 35°C.

Un incremento di assorbanza di 1,73 indica la formazione di 1 μ mole di uronide insaturo (Zucker e Hankin, 1970). Una unità di attività enzimatica (UPNL) è definita come quella quantità di attività PNL che catalizza la formazione di 1 μ mole di uronide insaturo $\times$ min^{-1} .

Le UPNL sono state poi espresse come U specifiche, riferite ai mg di proteina totale presenti nell'estratto saggiato.

3.9 DOSAGGIO QUANTITATIVO DELL'ATTIVITÀ PG

L'attività PG è stata determinata valutando il rilascio nel tempo di gruppi riducenti terminali, con il metodo colorimetrico di Nelson (Nelson, 1944).

Tale saggio colorimetrico degli 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 poi rilevato colorimetricamente con il reagente arseniomolibdato. Il metodo è utile per una misura specifica degli esouronici nelle porzioni terminali riducenti di alcuni oligosaccaridi, come avviene nella degradazione enzimatica di polisaccaridi pectici.

Per ogni campione sono state preparate 5 miscele di reazione contenenti acido poligalatturonico 0,25% in tampone Na-acetato 0,1 M, pH 5,5. Tre di esse (repliche) sono state addizionate di 30 μ l di preparato enzimatico ed incubate a 30°C per 1 ora in agitazione (200 oscillazioni $\times$ min^{-1}), mentre alle altre due (controllo) sono stati aggiunti 30 μ l di estratto enzimatico denaturato. Alla fine dell'incubazione tutti i campioni sono stati addizionati di 300 μ l di reagente "1" (soluzione rameica⁽¹⁾), bolliti per 20 min., raffreddati ed addizionati di 200 μ l di reagente "2" (arseniomolibdato⁽²⁾) e di 1,5 ml di acqua distillata. Questa miscela finale è stata lasciata riposare per qualche ora fino a che eventuali precipitati si sono depositati e successivamente si è proceduto al saggio spettrofotometrico, a lunghezza d'onda di 540 nm.

I risultati sono espressi come unità riducenti (UR o UPG) equivalenti alla quantità di enzima necessaria per liberare 1 μ mole di zuccheri riducenti in 1 ora, a 30°C.

Considerando: l'assorbanza della miscela di reazione a 540 nm (A_{540}), il peso molecolare dell'acido galatturonico (212,36), il fattore di proporzionalità (0,0678) che tiene conto dell'assorbanza esibita da una soluzione di acido poligalatturonico allo 0,001% ottenuta tramite un'apposita retta di taratura, il tempo di incubazione (60 min.) e la quantità

di enzima grezzo utilizzato (0.03 ml), la formula utilizzata per calcolare le UPG è stata la seguente:

$$UPG = A_{540} \cdot 0,0678 \cdot 1000 \cdot (60 \cdot 0,03 \cdot 212,16)^{-1} = A_{540} \cdot 0,1775.$$

Si riporta di seguito la composizione dei reagenti di Nelson.

⁽¹⁾Reagente "1" (soluzione rameica): 280 g di solfato di sodio anidro e 40 g di cloruro di sodio, vengono sciolti a caldo ed in agitazione vigorosa in 750 ml di acqua distillata. La solubilizzazione completa si ha quando vengono aggiunti alla soluzione salina 100 ml di tampone acetato 2 M (pH 5,1) e 65 ml di solfato di rame 0,32 M, a circa 60°C. Il pH del reagente deve essere 4,8; se necessario esso può venire aggiustato con HCl 10 N o con NaOH. Portare poi il volume a 1 litro. Il reagente può essere conservato a 37°C per massimo 2 mesi.

⁽²⁾Reagente "2" (arseniomolibdato): 25 g di molibdato ammonico, 450 ml di acqua distillata, 21 ml di H₂SO₄ conc. e 3 g di NaHSO₄·7H₂O in 25 ml di acqua distillata, incubato a 27°C per 24 ore e conservato poi a 4°C in bottiglia scura.

3.10 DETERMINAZIONE DEL pH OTTIMALE DELL'ATTIVITÀ PNL E PG

Il pH ottimale per l'attività degli enzimi pectolitici è stato individuato attraverso il saggio quantitativo (descritto precedentemente), ma con miscele di reazione nel range di pH da 5,0 a 8,0. Per l'intervallo pH 5,0-6,0 è stato utilizzato tampone Na-acetato 0,1 M, per l'intervallo 7,0-8,0 è stato utilizzato il tampone Tris-HCl 0.1 M.

3.11 ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE IN PRESENZA DI SODIO DODECIL SOLFATO (SDS) E TRASFERIMENTO SU MEMBRANA DI NITROCELLULOSA PER LA DETERMINAZIONE DI PROTEINE PR-4

Tale analisi è stata eseguita su lastrine per elettroforesi (10,2x8,3 cm) in accordo con la procedura di Laemmli (1970). La concentrazione dell'acrilammide nella soluzione del gel è del 15%. Il tampone di corsa (pH circa 9,0) contiene Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1%. la corsa elettroforetica viene effettuata ad intensità di corrente costante (10-12 mA) per circa 2h o, alternativamente, a voltaggio costante (200 Volts) per circa 1h. Le proteine di riferimento impiegate sono: fosforilasi b (106 kDa), BSA (80 kDa), ovoalbumina (49,5 kDa), anidrasi carbonica (32,5 kDa), inibitore di tripsina da soia (27,5

kDa) e lisozima (18,5 kDa). Quando la corsa elettroforetica è giunta a termine è stato effettuato il trasferimento sulla membrana di nitrocellulosa.

Il tampone di trasferimento contiene Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanolo 20%. Il trasferimento è effettuato ad intensità di corrente costante: 150 mA per 2 ore per un gel o 200 mA per 2 ore e 30 minuti per due gels. Quando il trasferimento si è concluso si equilibra la membrana di nitrocellulosa per 30 minuti in “Phosphate Buffer Triton” (PBT), una soluzione che contiene “Phosphate Buffer Salino” (PBS) ^(*), Triton X100 0,5% e BSA 3%.

Successivamente è stata aggiunta l'appropriata quantità di anticorpo primario, incubando a temperatura ambiente ed in lenta agitazione. Come antisieri per la famiglia PR-4 sono stati utilizzati anticorpi policlonali (RA-wheatwin 1) prodotti in coniglio contro wheatwin 1 (PR-4) purificata da cariossidi di frumento tenero (Caruso et al., 1996) gentilmente forniti dalla Prof.^{ssa} Carla Caruso del Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università degli Studi della Tuscia.

Terminato il periodo di incubazione è stato rimosso l'anticorpo primario e sono stati effettuati due lavaggi in PBS a concentrazione 1X, della durata di 5' ciascuno.

Il passaggio successivo è consistito nell'incubazione della membrana di nitrocellulosa con l'anticorpo secondario, opportunamente diluito in PBT. Come anticorpo secondario è stato utilizzato “goat anti rabbit-horse radish peroxidase” (GAR-HRP) (Kappel, Germany). In seguito, dopo aver effettuato di nuovo due lavaggi in PBS 1X, è stato aggiunto Triton X-100 allo 0,5 % in PBS 1X per 15 minuti. Dopo la rimozione del Triton X-100 è stato effettuato un lavaggio con tampone Tris 0,05 M, pH 6,8, per 5'. Successivamente la membrana di nitrocellulosa viene sottoposta ad un trattamento che permette di rilevare le bande positive. È possibile utilizzare un substrato cromogeno della perossidasi come il 4-Cl-naftolo. La soluzione per lo sviluppo è costituita da Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8 contenente H₂O₂ 0,03% e 4-Cl-naftolo 0,06% in metanolo; quando la nitrocellulosa viene immersa in questa soluzione lo sviluppo è per lo più immediato, quasi subito appaiono alcune bande colorate in corrispondenza delle zone in cui l'anticorpo si è legato alla proteina specifica.

(*) Preparazione del PBS a concentrazione 20 X

Na₂HPO₄·12 H₂O 46 g L⁻¹, KH₂PO₄ 4 g L⁻¹, KCl 4 g L⁻¹, NaCl 160 g L⁻¹. Il pH, si è attestato intorno a 7,4, non necessitando di essere aggiustato.

3.12 SEPARAZIONE DELLE FORME ISOENZIMATICHE MEDIANTE IEF

L'analisi qualitativa delle forme isoenzimatiche dei diversi enzimi è stata eseguita mediante la tecnica dell'isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (Ried e Collmer, 1985), utilizzando il sistema Multiphor II 2117 con cella Pharmacia LKB.

Sono stati utilizzati gel di poliacrilammide sottili (0,8 mm di spessore, dimensione 10x12,5 cm) contenenti: 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 (N,N,N',N'-tetrametilenediamina, ultra PURE, BRL Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg) 0,1%, Ampholine Pharmacia Biotech AB (pH di 3,5-10,0) al 5%, caricando in media 30 µl per pozzetto. La prefocalizzazione, avente lo scopo di distribuire le Ampholine nel gel, è stata eseguita a 4W costanti per circa 30 minuti. La corsa elettroforetica è stata eseguita a 5°C, 5 W costanti, 15 mA e 1500 V di limite. Come soluzione anodica (+) è stato utilizzato acido aspartico 0,04 M, mentre come soluzione catodica (-) NaOH 0,1 M.

3.13 ANALISI DELLE FORME ISOENZIMATICHE DI PNL E PG

L'analisi qualitativa delle forme isoenzimatiche di PNL e PG è stata eseguita mediante la tecnica dell'isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF), come precedentemente descritto, e susseguente colorazione secondo il metodo di Ried e Collmer (1985), utilizzando il sistema per elettroforesi orizzontale Multiphor II 2117 (Pharmacia LKB).

Dopo IEF, i gel vengono messi in contatto con un gel di saggio contenente agarosio 1% e composti pectici (pectina o acido poligalatturonico).

Per la determinazione delle isoforme di PNL il gel di agarosio contiene una soluzione di pectina da *Citrus* 0,1% (Sigma®) in tampone Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e CaCl₂ 1 M.

Per la determinazione delle isoforme di PG il gel di agarosio contiene invece, una soluzione di acido poligalatturonico al 0,1% in tampone Na-acetato 50 mM, pH 5,0.

Dopo l'incubazione a 30°C con umidità relativa prossima alla saturazione per 2 ore, i gel di agarosio sono stati sottoposti a colorazione con rosso rutenio (Sigma®) allo 0,05%, sostanza in grado di colorare la pectina e l'acido poligalatturonico e non le zone dove essi sono stati depolimerizzati. Le bande chiare corrispondenti all'attività degradatoria di PNL

e PG, risultano evidenti su sfondo rosso. I punti isoelettrici sono stati calcolati attraverso la regressione della distanza di posizionamento di proteine marcatrici.

3.14 DOSAGGIO QUANTITATIVO DELL'ATTIVITÀ CHITINASICA

L'analisi quantitativa dell'attività chitinasica presente negli estratti è stata misurata seguendo il metodo spettrofotometrico riportato da Miller (1959) (Fenice *et al.*, 1998) 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 μ L di chitina colloidale 1% in tampone citrato fosfato 50 mM pH 5,0 e 250 μ L di estratto enzimatico) è stata posta ad incubare per 2 ore a 40°C, e quindi raffreddata in ghiaccio ed addizionata di 1 mL del reagente acido dinitrosalicilico DNSA^(*). È seguita una nuova incubazione a 100°C per 15 minuti, successivo raffreddamento e lettura allo spettrofotometro (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, USA) dell'assorbanza a 640 nm.

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

3.15 DOSAGGIO QUANTITATIVO DELL'ATTIVITÀ GLUCANASICA

L'attività delle β -1,3-glucanasi presenti nell'estratto grezzo 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 al § 3.8.

La miscela di reazione era composta da: 40 μ L di substrato a base di laminarina (Sigma) 0,1% in tampone acetato di sodio 0,1 M, pH 5,2 e 90 μ L di preparato enzimatico, incubata a 37°C per 3 ore, in agitazione (200 oscillazioni min^{-1}). Il controllo è stato invece addizionato di preparato enzimatico denaturato. Terminata l'incubazione i campioni sono stati addizionati di 300 μ L di reagente "A" di Nelson (soluzione rameica), bolliti per 20 min., raffreddati, addizionati di 200 μ L 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 eseguita 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 e Hwang, 1996).

3.16 DOSAGGIO QUANTITATIVO DELL'ATTIVITÀ PEROSSIDASICA

L'attività perossidasiica 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 aggiunta dell'enzima seguendo l'aumento di assorbanza a 470 nm dovuto alla formazione di tetraguaiacolo (coefficiente di estinzione molare 26,6 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Una unità di attività enzimatica 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.

3.17 DETERMINAZIONE DEL pH OTTIMALE DELL'ATTIVITÀ PEROSSIDASICA E GLUCANASICA.

Il pH ottimale per l'attività di perossidasiica e glucanasi è stato individuato attraverso saggi qualitativi (descritti precedentemente), usando tamponi con pH diversi. Per l'intervallo pH 5,0-6,0 è stato utilizzato tampone Na-acetato 0,1 M, per l'intervallo 7,0-8,0 è stato utilizzato il tampone Tris-HCl 0,1 M.

3.18 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 e 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 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 (Calcolfluor White M2R, Sigma[®]) 0,01% (p/v) in

Tris-HCl 0,5 M pH 8,9, per 10 minuti al buio 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, attraverso un transilluminatore UV (λ 365 nm). Le bande di attività sono state visualizzate in quanto la fluorescenza è visibile dove è presente la glicolchitina, ma non le 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%.

3.19 ANALISI DELLE FORME ISOENZIMATICHE DI GLUCANASI

L'analisi delle forme isoenzimatiche presenti negli estratti è stata eseguita tramite IEF su gel di poliacrilammide come descritto in precedenza. Successivamente alla corsa il gel è stato lavato con tre passaggi in acqua distillata, quindi immerso ad equilibrare in tampone Na-acetato 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% (w/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 poi sottoposto a colorazione immergendolo in NaOH 1 M contenente 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (Sigma[®]) 0,15% (p/v) a 100°C, per circa 10 minuti, fino a che non si rendono evidenti le bande rosse su fondo rosa. Queste corrispondono alle isoforme di attività glucanasica (Pan *et al.*, 1989). I punti isoelettrici sono stati calcolati attraverso la regressione della distanza di posizionamento di proteine marcatrici. Dopo la colorazione il gel è stato conservato a 4°C in una soluzione 3% glicerolo, 40% metanolo e 10% acido acetico.

3.20 ANALISI DELLE FORME ISOENZIMATICHE DI PEROSSIDASI

L'analisi isoenzimatica delle perossidasi è stata eseguita secondo Caruso *et al.* (1999/a). Dopo la corsa in IEF (§ 3.9), 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 (Farmitalia Carlo Erba S.p.A., Milano, Italia) 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 acqua. 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).

3.21 ANALISI DELLE FORME ISOENZIMATICHE DEGLI INIBITORI PROTEICI DI PNL E PG

3.21.1 INIBITORI PROTEICI DELLE PG (PGIP)

Dopo la corsa in IEF (§ 3.9), il gel di poliacrilamide è stato risciacquato mediante debole agitazione con tampone acetato di Na 0,05 M, pH 4,6. Il gel è stato quindi condizionato per 20 minuti in una soluzione di acido poligalatturonico all'1%, in tampone acetato di Na 0,1 M, pH 4,6; successivamente il gel è stato sciacquato con tampone acetato di Na 0,05 M, in modo da rimuovere l'eccesso di substrato. Il gel è stato quindi immerso in una soluzione acquosa contenente la poligalatturonasi alla concentrazione di 0,09 unità cm^2 , utilizzando un volume di 75 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ di superficie del gel. Il gel è stato poi incubato a 30°C per 45 minuti. Dopo l'incubazione è stato sottoposto a colorazione con rosso rutenio (Sigma[®]) allo 0,05%. Alla fine il gel è stato lavato più volte con acqua distillata fino a che le bande rosse dell'inibitore si rendono evidenti sullo fondo rosa.

3.21.2 INIBITORI PROTEICI DELLE PNL (PNLIP)

Dopo la corsa in IEF (§ 3.9), il gel di poliacrilamide è stato risciacquato mediante debole agitazione con tampone Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. Il gel è stato quindi condizionato per 20 minuti in una soluzione di pectina all' 1%, in Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0; successivamente il gel è stato sciacquato con tampone Tris-HCl 0,05 M, in modo da rimuovere l'eccesso di substrato. Il gel è stato quindi immerso in una soluzione acquosa contenente la pectin-liasi alla concentrazione di 0,09 unità cm^2 , utilizzando un volume di 75 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ di superficie del gel. Il gel è stato poi incubato a 30°C per 45 minuti. Dopo l'incubazione è stato sottoposto a colorazione con rosso rutenio (Sigma[®]) allo 0,05%. Alla

fine il gel è stato lavato più volte con acqua distillata fino a che le bande rosse dell'inibitore si rendono evidenti sullo fondo rosa.

3.22 DOSAGGIO DELL'AMMONIO

La concentrazione dell'ammonio nei filtrati colturali, provenienti da allevamento di *F. culmorum* su mezzo liquido costituito da estratto lievito, è stata misurata con un elettrodo selettivo della Radiometer analytical S.A., Villerurbanne Cedex, France (modello ISE-K-NH₄). Per la preparazione degli standards sono state usate differenti concentrazioni di NH₄Cl (da 1×10^{-1} a 1×10^{-7} M). E' stato inoltre usato un elettrodo di riferimento sempre della Radiometer analytical (modello REF251).

4 RISULTATI

4.1 PROVA DI SUSCETTIBILITÀ VARIETALE

Allo scopo di valutare il grado di suscettibilità di diverse varietà di frumento tenero nei confronti di *F. culmorum*, è stata fatta una prova varietale; sono state utilizzate le varietà Pandas, Abbondanza, Colfiorito, Bolero, Centauro.

I sintomi sono stati valutati in base quattro classi di gravità che sono state utilizzate per calcolare l'indice di malattia (Mc Kinney) riportati in **fig 4.1**.

Nella **fig 4.2** si può osservare che, le diverse varietà di frumento hanno un differente grado di suscettibilità nei confronti di *F. culmorum*.

I genotipi più suscettibili sono risultati la varietà Bolero e la varietà Centauro, con indice di malattia rispettivamente di 8,80 e 8,85 e con la maggior parte delle cariossidi inserite nella classe 2 (cariossidi germinate con coleoptile lungo un centimetro, apparato radicale poco sviluppato e con necrosi) e nella classe 3 (cariossidi non germinate o con coleoptile appena accennato, apparato radicale inesistente o completamente necrotizzato). Le varietà Colfiorito, Abbondanza, e Pandas sono risultate lievemente più tolleranti, anche se l'indice di malattia riscontrato è stato compreso tra 6,5 e 7,5.

4.2 ENZIMI PECTOLITICI PRODOTTI DA *F. CULMORUM*

4.2.1 PECTIN-LIASI DI *F. CULMORUM* PRODOTTE IN VITRO ED IN VIVO

Gli enzimi pectin-liasici (PNL) contenuti nei filtrati colturali, ottenuti dall'allevamento in vitro di *F. culmorum* (su Czapek (Dox) modificato con pectina come unica fonte di carbonio) a diversi tempi di crescita (3, 6, 9, 12, 15 giorni) sono stati analizzati sotto l'aspetto quantitativo e qualitativo. L'attività pectin-liasica totale è riportata nella **fig 4.3**. Come si può osservare l'attività enzimatica è evidente a partire dal sesto giorno di allevamento, con un picco al nono giorno per poi decrescere gradualmente nel successivo periodo di osservazione.

Tali saggi quantitativi sono stati fatti anche su filtrati colturali ottenuti dall'allevamento in vitro di *F. culmorum* su Czapek (Dox) contenente glucosio quale unica fonte di carbonio; l'attività enzimatica è risultata inferiore di circa dieci volte rispetto a quella riscontrata sui filtrati precedentemente analizzati.

Fusarium culmorum ha prodotto in vitro diverse forme isoenzimatiche di pectiniasi (PNL). La focalizzazione isoelettrica su gel di poliacrilammide (pH 3,5-10,0) ha consentito di verificare la presenza di quattro isoforme principali di PNL (**fig. 4.4**), tutte e quattro basiche (denominate PNL1, PNL2, PNL3, PNL4), aventi rispettivamente punti isoelettrici, 8,6, 8,8, 9,0, 9,1. L'intensità delle bande relative alle forme isoenzimatiche riflette la curva temporale di attività pectin-liasica. La PNL4 compare, anche se debolmente, al terzo giorno mentre PNL1, PNL2, PNL3 compaiono al sesto giorno, raggiungendo la maggiore intensità al nono giorno.

La banda scura al di sopra di PNL4 deve ritenersi una forma isoenzimatica di PME con pI 9,4.

E' stata analizzata anche l'attività pectin-liasica presente nell'estratto proteico totale e nell'IWF di plantule inoculate con *F. culmorum*. Come si può osservare nelle **fig. 4.5** e **4.6** si ha attività pectin-liasica soltanto nelle plantule inoculate e non nei controlli non inoculati, inoltre l'attività è rilevabile soltanto a 72 ore dall'inoculazione.

Nello zimogramma delle PNL prodotte in vivo (IWF e estratto proteico totale di ipocotili eziolati inoculati con *F. culmorum*) si sono ritrovate due isoforme presenti anche in vitro, PNL2 e PNL4 (pI 8,8 e 9,1) (**fig. 4.7** e **4.8**). Le suddette bande nell'IWF sono comparse, anche se debolmente, a 72 ore dall'inoculo; risultando evidenti a 96 ore. Nell'estratto proteico totale PNL2 e PNL4 sono state rilevate in forma molto debole a 48 ore, mentre sono risultate espresse in forma marcata a 72 e 96 ore dall'inoculazione con il patogeno.

Anche in vivo è stata rilevata la presenza di forme isoenzimatiche di PME. L'isoforma di PME con pI 9,4 è di origine fungina ed è stata rilevata solo negli estratti proteici totali e nell'IWF di plantule infette, a partire dalle 72 ore dall'inoculazione. Ci sono poi tutta una serie di isoforme di PME che si ritrovano sia nelle plantule inoculate che nei controlli. Tali bande sono prodotte dalla pianta in quanto non riscontrate nel filtrato colturale.

4.2.2 POLIGALATTURONASI DI *F. CULMORUM* PRODOTTE IN VITRO ED IN VIVO

Anche gli enzimi poligalatturonasici (PG) presenti nei filtrati culturali sono stati analizzati sotto l'aspetto quantitativo e qualitativo. L'attività poligalatturonasica è evidente fin dal terzo giorno di allevamento e presenta un incremento tra il sesto e il nono giorno; dal dodicesimo giorno decade senza però arrivare mai a zero (**fig. 4.9**).

L'attività poligalatturonasica, evidente nei primi tre giorni di allevamento fungino si riflette con l'espressione di tre forme isoenzimatiche, PG1, PG2, PG3 aventi rispettivamente punti isoelettrici 6,5, 7,0 e 7,9 (**fig. 4.10**). Dal nono giorno di allevamento in poi sono rilevabili altre due deboli bande alcaline. Si ritiene che esse siano due isoforme di PNL e non di PG; infatti come evidenziato dai risultati emersi durante la prova di pH dell'attività pectin-lasica l'enzima PNL risulta attivo anche a pH 5,0, ed utilizza acido poligalatturonico e non pectina come substrato. Inoltre le due suddette isoforme riferibili alle PNL presentano una sostanziale coincidenza di pI con le isoforme denominate PNL2 e PNL4.

E' stata analizzata anche l'attività poligalatturonasica presente nell'IWF di plantule inoculate con *F. culmorum*. Come si può osservare nella **fig. 4.11** si ha attività poligalatturonasica soltanto negli estratti ottenuti da plantule inoculate e non nei controlli; inoltre l'attività è rilevabile soltanto a 72 ore dall'inoculazione.

Nello zimogramma delle PG prodotte *in vivo* (**fig. 4.12**), sono presenti due forme isoenzimatiche riferibili a PG1 e PG2; tali isoforme vengono prodotte a partire dalle 72 ore dall'inoculo delle plantule. Dagli estratti proteici totali ottenuti dalle plantule precedentemente sottoposte ad estrazione di IWF non è stata rilevata attività PG né di forme isoenzimatiche.

4.3 CURVA DI pH DEGLI ENZIMI PECTOLITICI

Allo scopo di valutare l'optimum di pH degli enzimi pectolitici sono state fatte prove di attività variando il pH della miscela di reazione. L'attività delle PNL è risultata strettamente legata al pH della miscela di reazione; per quanto riguarda la PNL, non è stata riscontrata attività a pH 5,0 essa è incrementata a pH 6,0 e 7,0 con un picco a pH 8,0 (**fig. 13**).

La curva di pH dell'attività PG ha presentato un picco di attività a pH 5,0; essa ha subito una decrescita a pH 6,0 e 7,0 per poi aumentare nuovamente a pH 8,0 (**fig. 14**); questo incremento potrebbe essere attribuito all'attività degli enzimi pectin-lasici che sono molto attivi a pH 8,0; tale aspetto è legato al fatto che le PNL fungine sono attive anche su acido poligalatturonico come substrato, anche in assenza di Ca^{++} e che il saggio effettuato è in grado di poter rilevare l'aumento di zuccheri riducenti derivanti anche dall'attività pectin-lasica.

4.4 VARIAZIONE DEL pH E DEL CONTENUTO DI AMMONIO DI ALLEVAMENTI *IN VIVO* E *IN VITRO*

La variazione del pH è stata misurata sia *in vitro* che *in vivo*.

Il filtrato colturale ottenuto a seguito dell'allevamento di *F. culmorum* su estratto di lievito ha fatto registrare un incremento del valore di pH, la variazione è stata sostanziale, passando da pH 4 del tempo 0 a un valore di 8,2 nella coltura di 12 giorni (**fig. 4.15**).

Negli estratti ottenuti da frumento (IWF ed estratto proteico totale), è stata riscontrata una variazione del pH meno pronunciata rispetto a quanto osservato "*vitro*". Si è osservato un incremento di pH da 6,0 nelle plantule di controllo a pH 7,0 nelle plantule inoculate (**fig. 4.16 e 4.17**).

Dai filtrati colturali ottenuti dall'allevamento di *F. culmorum* su estratto di lievito è stata registrata una variazione del contenuto di ioni ammonio. La variazione contenuta nei filtrati colturali a diversi tempi di crescita (1, 2, 3, 6, 9, 12, giorni), è stata sostanziale, si è passati da 0,028 moli di ammonio presenti nei controlli a 0,047 moli contenute nei filtrati di coltura al sesto giorno di allevamento (**fig. 4.18**).

Anche in questo caso, come nella variazione del pH, nelle tesi *in vivo* (IWF ed estratto proteico totale) è stata riscontrata una variazione, meno pronunciata rispetto a quanto osservato in "*vitro*". La quantità di ioni ammonio presenti nel fluido extracellulare delle piante infette presenta un incremento costante con massimo a 96 ore. E' stato osservato un incremento anche nell'estratto proteico totale; tuttavia in questo caso l'incremento è risultato di minor entità, sempre con un massimo a 96 ore. Nell'estratto proteico totale e nell'IWF ottenuti dalla plantule di controllo non inoculate non è stata registrata alcuna variazione del contenuto di ioni ammonio (**fig. 4.19 e fig. 4.20**).

4.5 ANALISI DELLE PROTEINE ENZIMATICHE (PR)

4.5.1 CHITINASI

Il saggio quantitativo delle chitinasi, presenti nell'IWF e nell'estratto proteico totale di ipocotili eziolati di frumento, ha evidenziato la presenza di una considerevole attività enzimatica. Si è osservata l'espressione di attività chitinasica nei controlli non inoculati, nonché l'induzione di attività nelle piante inoculate, sia nell'IWF sia nell'estratto proteico totale (**fig. 4.21 e 4.22**). L'attività chitinasica è risultata costantemente maggiore nell'IWF rispetto a quella presente nell'estratto proteico totale. Sia nell' IWF che nell'estratto proteico totale, l'attività ha subito un incremento costante nell'arco delle 96 ore.

Nelle **fig. 4.23** e **4.24** sono illustrati i profili isoenzimatici di chitinasi, espressi negli ipocotili eziolati di frumento (IWF ed estratto proteico totale) a diversi tempi dall'inoculazione con *F. culmorum* (24, 48, 72, 96 ore). Il numero delle isoforme globalmente rilevate è stato di diciannove, denominate Chi1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, con pI rispettivamente di 3,1, 3,3, 3,5, 3,7, 4,4, 5,2, 5,3, 5,7, 6,0, 6,4, 6,7, 7,2, 7,5, 8,4, 8,7, 8,9, 9,0, 9,2 e 9,3. Non è stata riscontrata un' induzione differenziale di isoforme, a parte Chi 8 (con pI 5,7) presente nell'inoculato, ma non nel controllo dell'estratto proteico totale. Non si è osservata induzione differenziale di alcuna isoforma nell'IWF.

4.5.2 β -1,3-GLUCANASI

Il saggio quantitativo eseguito sui fluidi extracellulari e sugli estratti proteici di ipocotili di frumento ha evidenziato la presenza di attività β -1,3-glucanasica. Tale attività è risultata più alta nelle piante inoculate rispetto ai controlli, inoltre è risultata maggiore nell'IWF rispetto all'estratto proteico totale, con un picco di attività tra le 72 e le 96 ore (**fig. 4.25** e **4.26**).

I profili isoenzimatici delle glucanasi presenti nell'IWF fluidi extracellulari e nell'estratto proteico totale sono illustrati nelle **fig. 4.27** e **4.28**. Non risulta una induzione differenziale di isoforme di glucanasi tra le plantule inoculate e quelle di controllo; il numero di isoforme rilevate è quattro (denominate Glu1, Glu2, Glu3 Glu4 con pI rispettivamente di 5,9, 6,4, 6,7, 8,6), di esse le Glu1, Glu2 e Glu3 sono state osservate sia nell'IWF che nell'estratto proteico totale, in quest'ultimo inoltre c'è una quarta isoforma, Glu4 con pI 8,6.

4.5.3 PEROSSIDASI

Il dosaggio dell'attività perossidasi presente nell'IWF e nell'estratto proteico totale di ipocotili di frumento ha evidenziato differenze tra le plantule di controllo e quelle inoculate con *F. culmorum*. Nell'IWF e nell'estratto proteico totale delle plantule inoculate si è sempre riscontrata una maggiore attività perossidasi (**fig. 4.29** e **4.30**) con un picco di attività rispettivamente a 72 e 96 ore. Si è osservata la presenza di un ricco pattern isoenzimatico con ben 17 isoforme (denominate Px1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17) con pI stimati di 3,5, 3,8, 4,2, 4,5, 4,9, 5,7, 5,9, 6,2, 6,4, 6,8, 8,0, 8,3, 8,6, 8,8, 8,9, 9,1, 9,3 (**fig. 4.31** e **4.32**). Nel controllo non inoculato del IWF a 24 ore, sono state rilevate la Px1, la Px4, Px8, Px12, Px17. Anche nell'inoculato sono risultate espresse le

suddette isoforme. A 48 ore dall'inoculo nel controllo sono apparse in aggiunta la Px2, Px3, Px9 e Px14. Lo stesso pattern isoenzimatico è comparso nell'inoculato, con la Px12 particolarmente marcata. A 72 ore si è assistito alla comparsa di alcune isoperossidasi non presenti nel controllo, la Px6, Px7, Px10, Px11. A 96 ore, in aggiunta alle isoperossidasi indotte a 72 ore sono state rilevate altre due forme la Px5 e la Px13.

Il quadro isoenzimatico nell'estratto proteico totale è risultato meno complesso di quello osservato nell'IWF. A 24 ore dall'inoculo solo due isoforme sono risultate marcatamente espresse sia nell'IWF che nell'estratto proteico totale, la Px8 e, in misura minore, la Px15. A 72 ore si assiste all'induzione differenziale di due isoforme la Px6 e la Px10. A 96 ore le suddette isoforme indotte risultano più marcatamente espresse.

4.5.4 PR-4

Dalle prove elettroforetiche effettuate non è emersa la presenza di proteine PR-4, sia nelle plantule inoculate che in quelle di controllo.

4.5.5 INIBITORI PROTEICI DEGLI ENZIMI PECTOLITICI

I saggi quantitativi e qualitativi, effettuati su estratti di ipocotili eziolati (IWF e estratto proteico totale), non hanno evidenziato la capacità di inibire l'attività poligalatturonasica e pectin-liasica di un estratto enzimatico ottenuto dall'allevamento *in vitro* di *F. culmorum*.

4.6 CURVA DI PH DELLE PROTEINE ENZIMATICHE (PR)

4.6.1 CHITINASI

L'attività chitinasica non è influenzata dalla variazione del pH del substrato di reazione; infatti nella **fig. 33** si può osservare come il pattern isoenzimatico delle chitinasasi risulti uguale in tutte le condizioni di pH saggiate.

4.6.2 β -1,3-GLUCANASI

Il saggio quantitativo dell'attività enzimatica delle β -1,3-glucanasi non ha rilevato significative differenze di attività in funzione del pH della miscela di reazione(**fig. 34**).

Il pH del substrato influenza invece il profilo isoenzimatico delle β -1,3-glucanasi; infatti a pH 5,0 si osservano le quattro isoforme precedentemente descritte nel capitolo 4.5.2, mentre aumentando il pH tali isoforme non sono più facilmente osservabili (**fig. 35**).

4.6.3 PEROSSIDASI

L'attività della perossidasi è fortemente influenzata dalla variazione del pH della miscela di reazione (**fig. 36**). Questa attività ha un picco a pH 5,0, decresce a pH 6,0 e 7,0 e manifesta un minimo di attività a pH 8,0.

La variazione dell'attività si riflette sull'intensità delle bande relative alle forme isoenzimatiche (**fig. 37**); a pH 5,0 le bande sono molto evidenti mentre l'intensità decresce a pH 6,0 e 7,0 per arrivare al minimo a pH 8,0.

FIGURE E GRAFICI



Fig. 4.1: classi di malattia definite per plantule di frumento tenero varietà Bolero inoculate con *F. culmorum*. Le diverse classi sono state utilizzate per calcolare l'indice di malattia secondo la formula di McKinney, attribuendo alla classe 1 il valore di intensità di malattia = 1, alla classe 5 il valore = 5, alla classe 10 il valore =10.

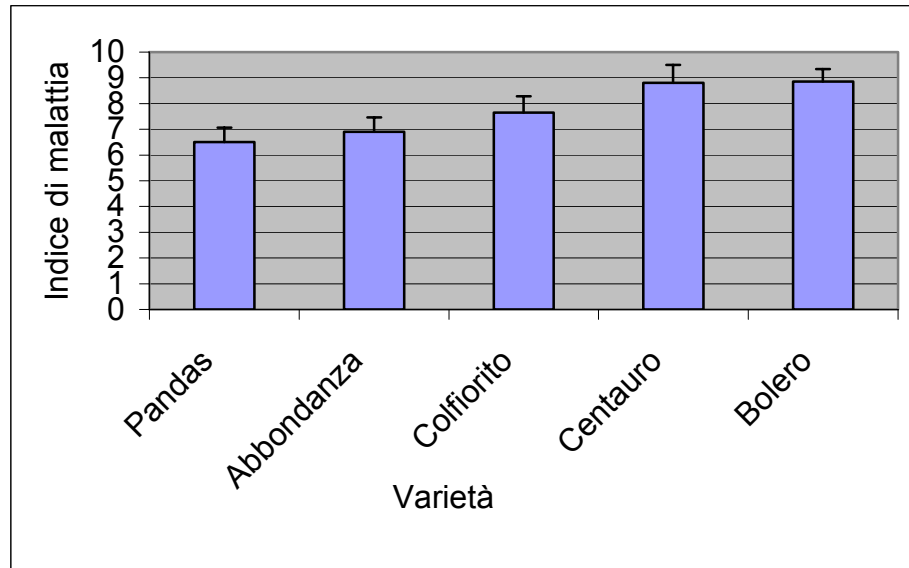


Fig. 4.2: indice di malattia rilevato su cinque varietà di frumento tenero a seguito dell'inoculazione con *Fusarium culmorum*.

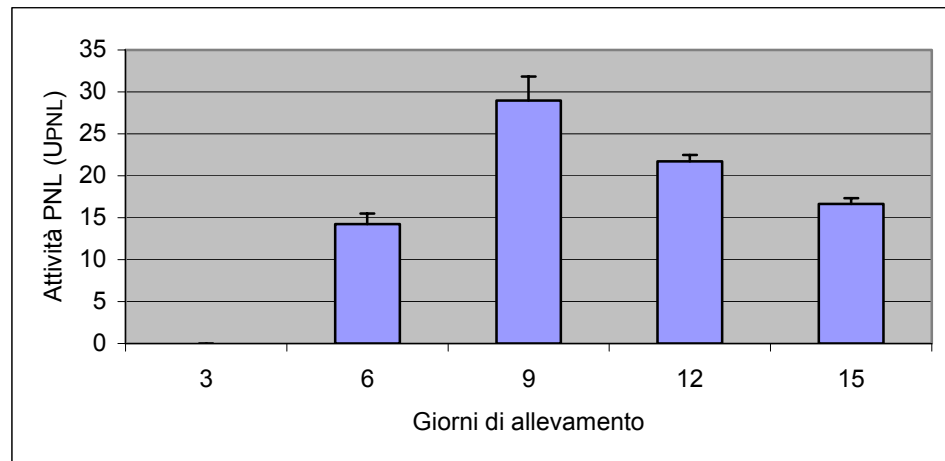


Fig. 4.3: attività petin-liasica prodotta da *Fusarium culmorum* su mezzo di coltura liquido (Czapek-Dox) con pectina come sola fonte di carbonio.

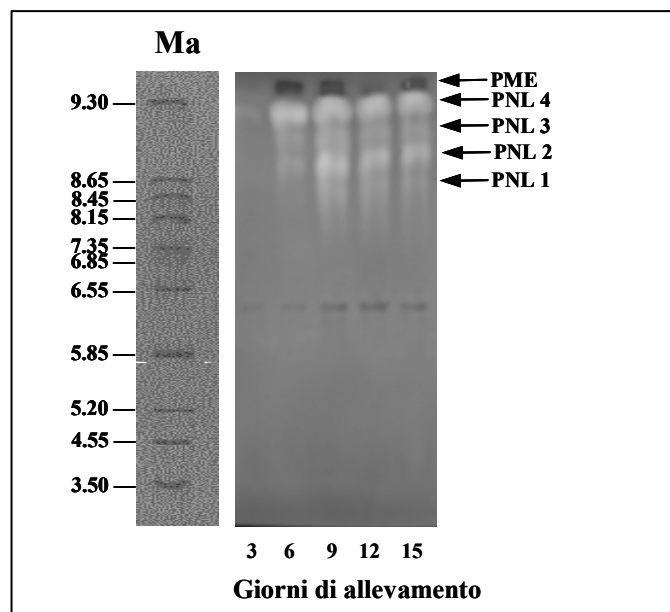


Fig. 4.4: profilo isoenzimatico di pectin-liasi prodotto da *F. culmorum* cresciuto per 15 giorni su mezzo liquido (Czapek-Dox) con pectina come sola fonte di carbonio. I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3.5-10. A sinistra sono riportate le posizioni ed i pI dei marcatori proteici di riferimento (**Ma**).

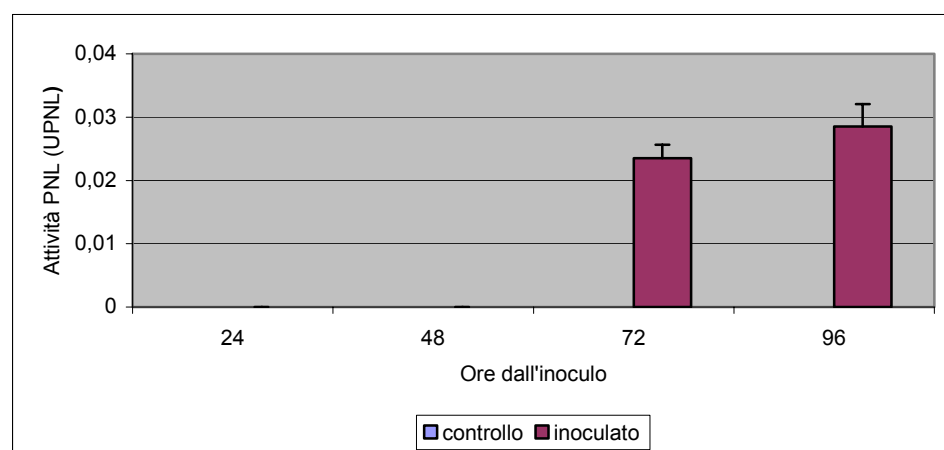


Fig. 4.5: attività pectin-liasica rilevata nell'estratto proteico totale ottenuto da plantule di frumento a 24, 48, 72, 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*.

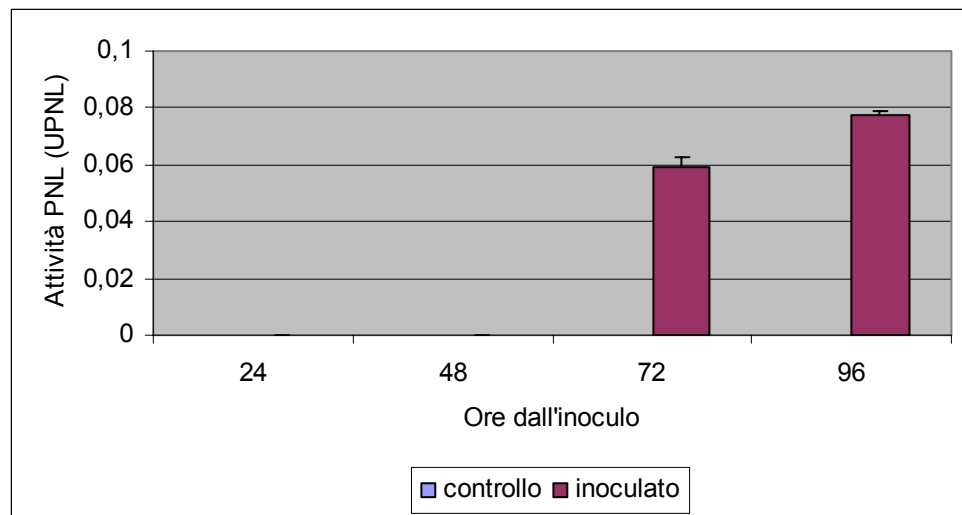


Fig. 4.6: attività pectin-liasica rilevata nel IWF (Internal Washing Fluid) ottenuto da plantule di frumento a 24, 48, 72, 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*.

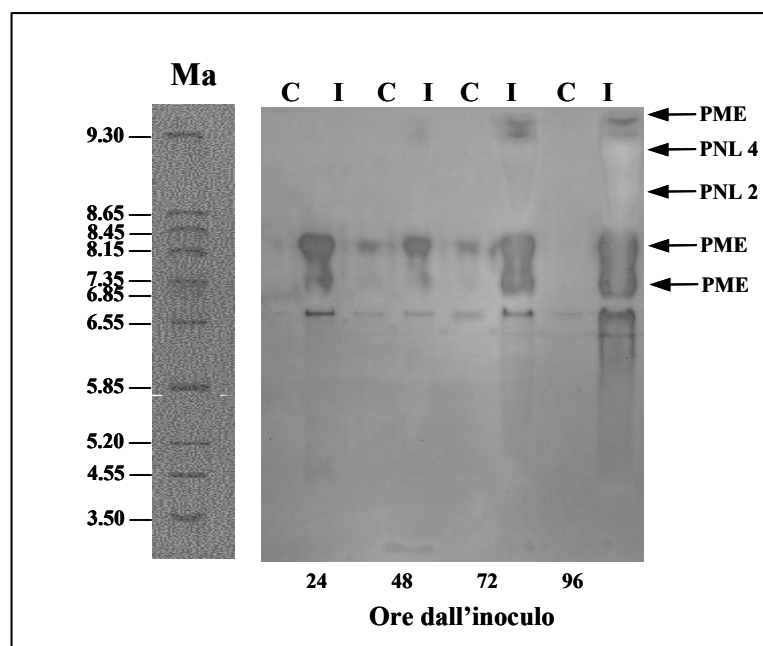


Fig. 4.7: forme isoenzimatiche di pectin-liasi, presenti nel IWF (Internal Washing Fluid) di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72 e 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*. I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A sinistra sono riportate le posizioni ed i pI dei marcatori proteici di riferimento (**Ma**) (C: controllo non inoculato; I: inoculato).

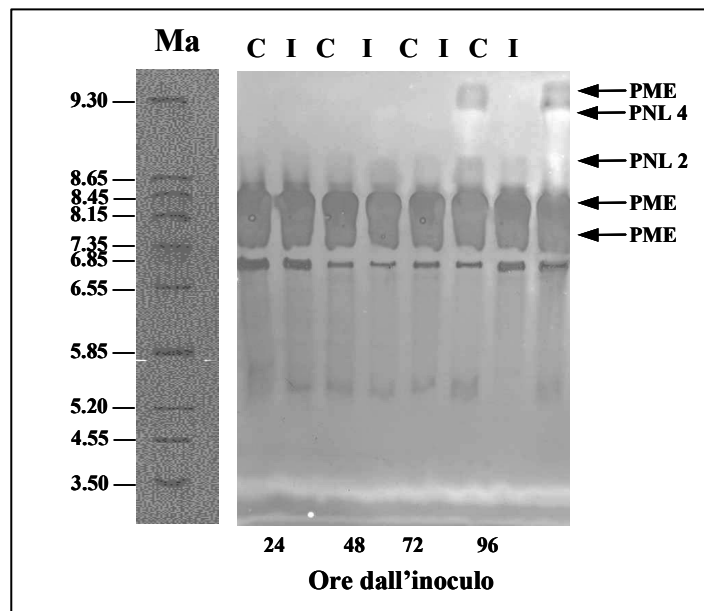


Fig. 4.8: forme isoenzimatiche di pectin-liasi, presenti nell'estratto proteico totale di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72 e 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*. I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3.5-10. A sinistra sono riportate le posizioni ed i pI dei marcatori proteici di riferimento (**Ma**) (**C**: controllo non inoculato; **I**: inoculato).

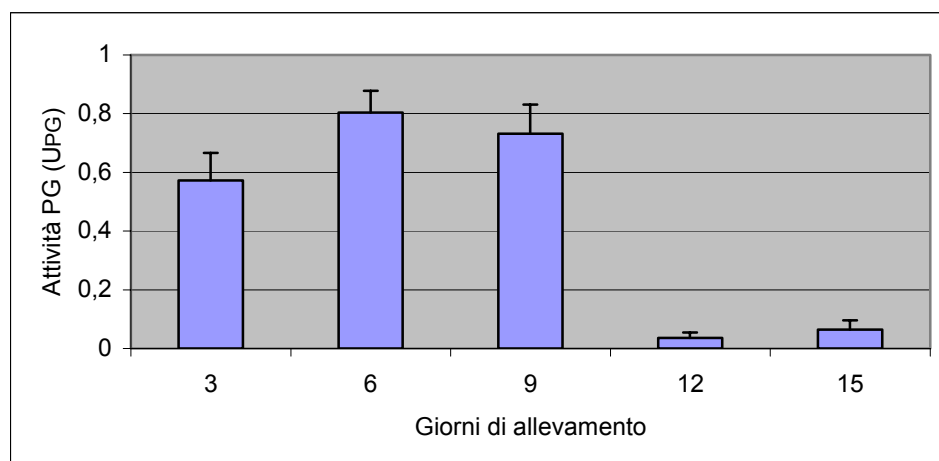


Fig. 4.9: attività poligalatturonasica rilevata su mezzo liquido (Czapek-Dox) inoculato con *F. culmorum*.

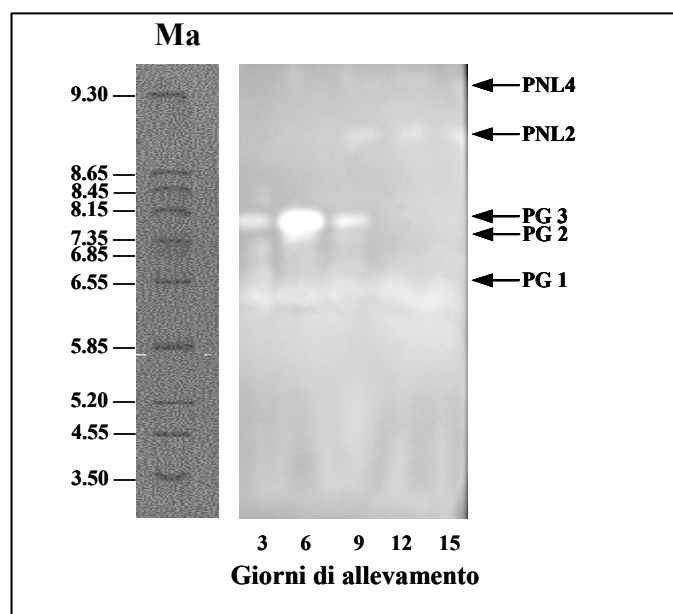


Fig. 4.10: profilo isoenzimatico di poligalatturonasi prodotte da *F. culmorum* allevato su mezzo liquido (Czapek-Dox). I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A sinistra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (**Ma**).

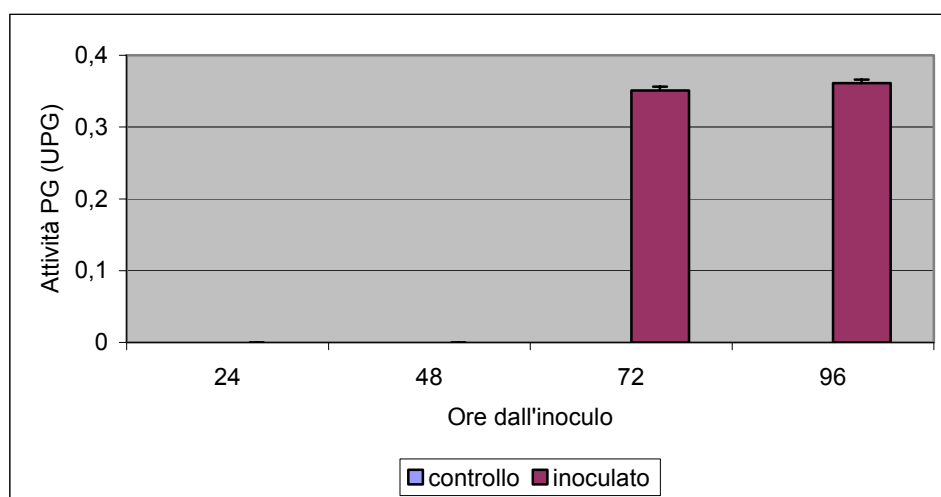


Fig. 4.11: attività poligalatturonasica presente nel'IWF (Internal Washing Fluid) di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72, 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*.

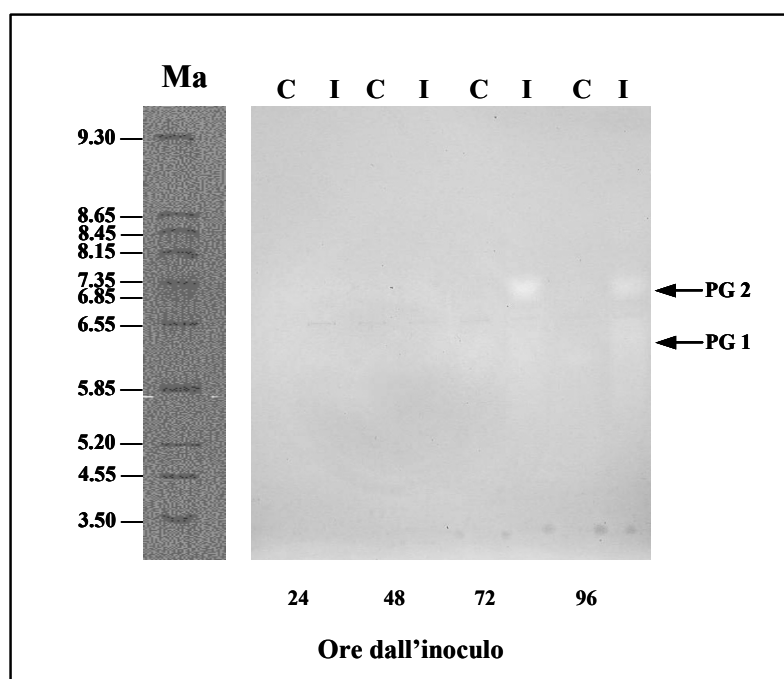


Fig. 4.12: forme isoenzimatiche di poligalatturonasi, presenti nel IWF (Internal Washing Fluid) di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72 e 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*. I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A sinistra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (**Ma**) (**C**: controllo non inoculato; **I**: inoculato).

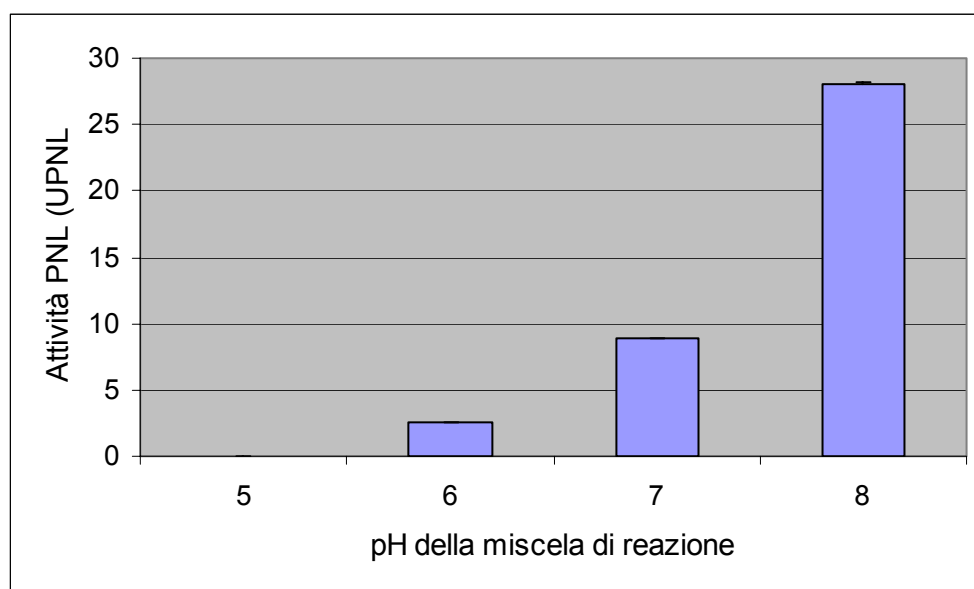


Fig. 4.13: variazione dell'attività pectin-lasica in funzione della variazione del pH della miscela di reazione.

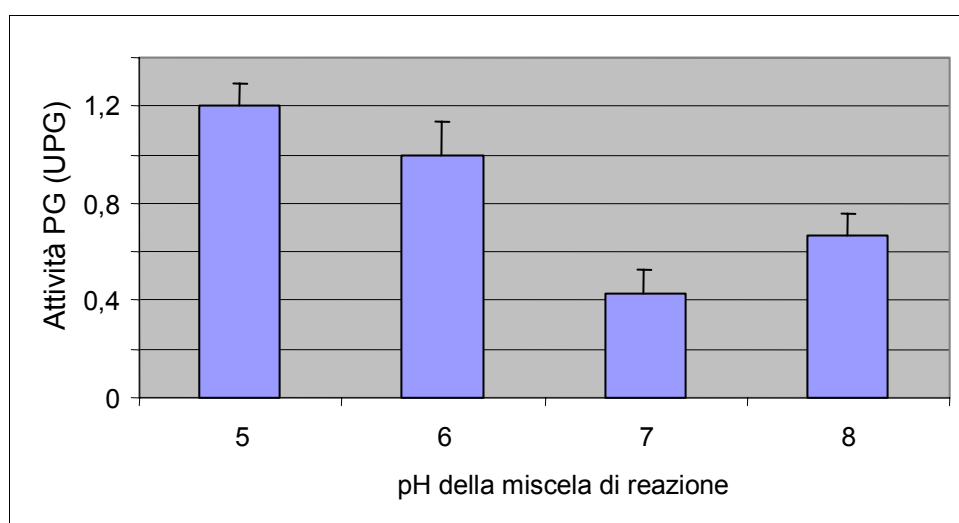


Fig. 4.14: variazione dell'attività poligalatturonasica in funzione della variazione del pH della miscela di reazione.

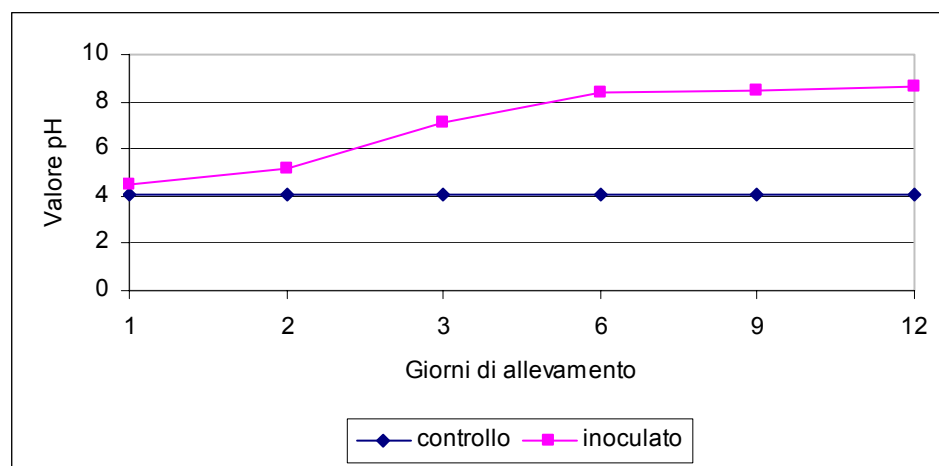


Fig. 4.15: variazione di pH del mezzo di coltura liquido (estratto di lievito) a seguito di inoculazione con *F. culmorum*.

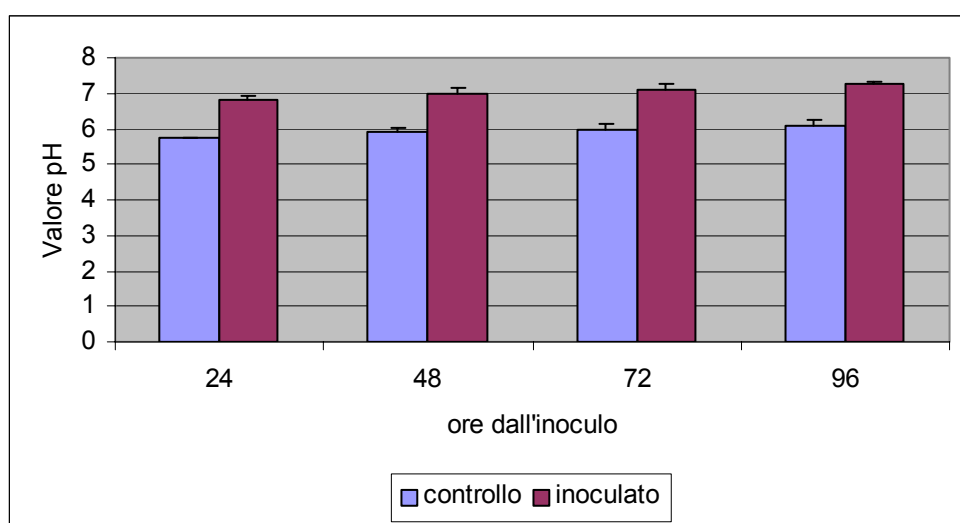


Fig. 4.16: variazione di pH dell'IWF (Internal Washing Fluid) di plantule di frumento a 24, 48, 72, 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*.

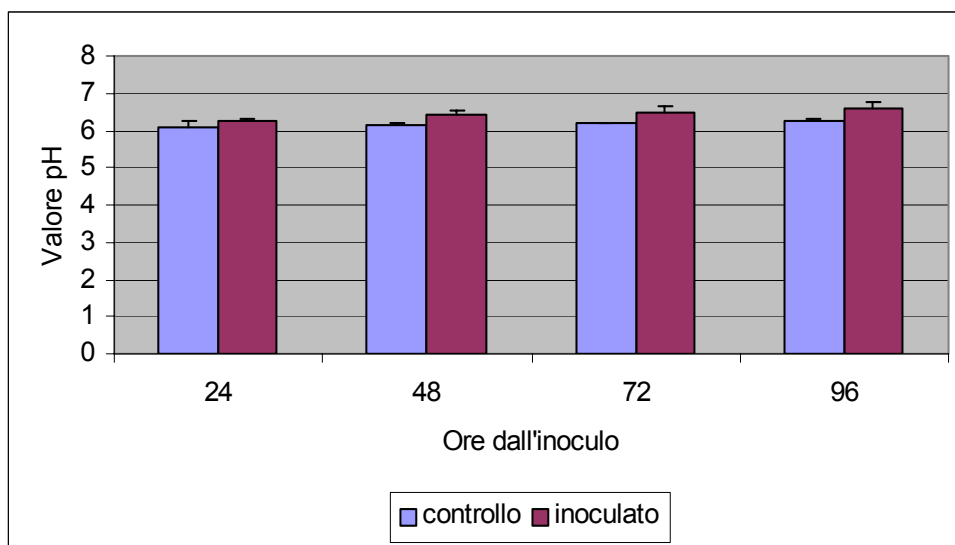


Fig. 4.17: variazione di pH dell'estratto proteico totale di plantule di frumento a 24, 48, 72, 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*.

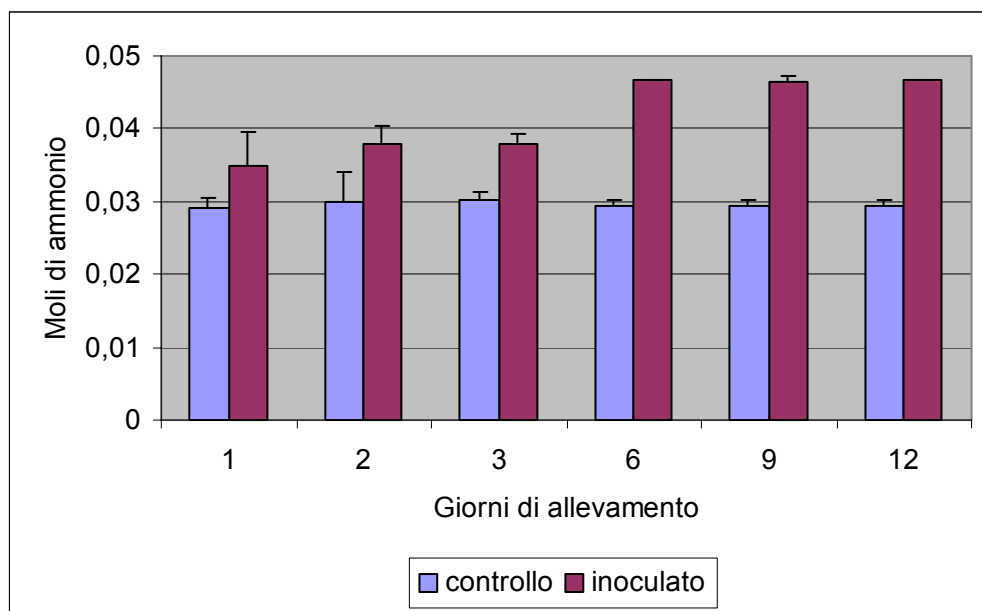


Fig. 4.18: variazione della quantità di ammonio presente nel mezzo di crescita (estratto di lievito), a seguito di inoculazione con *F. culmorum*.

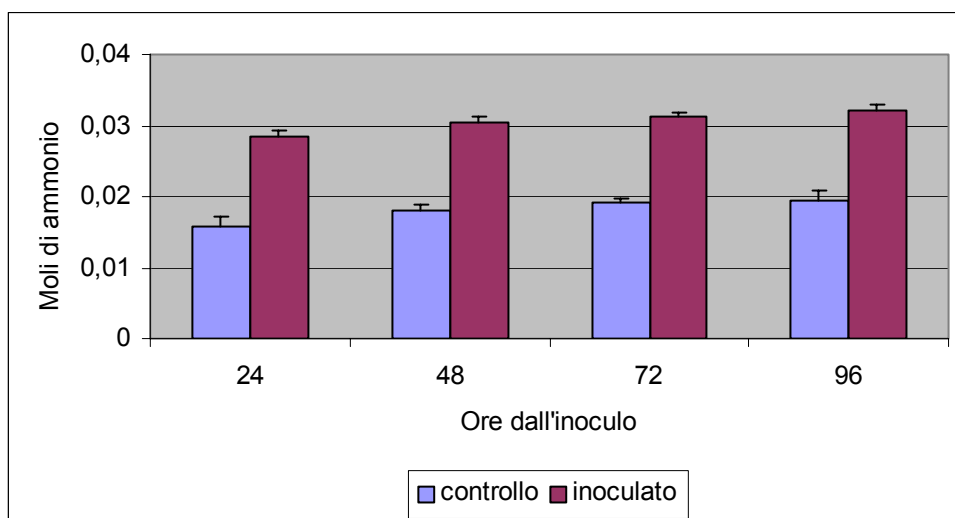


Fig. 4.19: variazione della quantità di ammonio presente nell'IWF (Internal Washing Fluid) di plantule di frumento a 24, 48, 72, 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*.

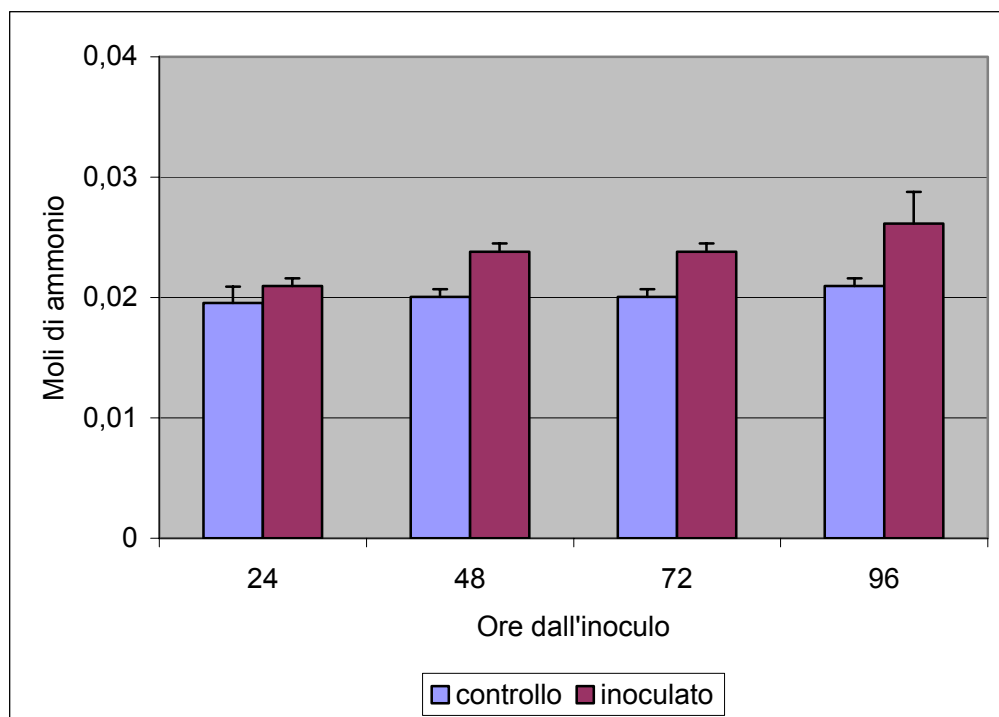


Fig. 4.20: variazione della quantità di ammonio presente nell'estratto proteico totale di plantule di frumento a 24, 48, 72, 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*.

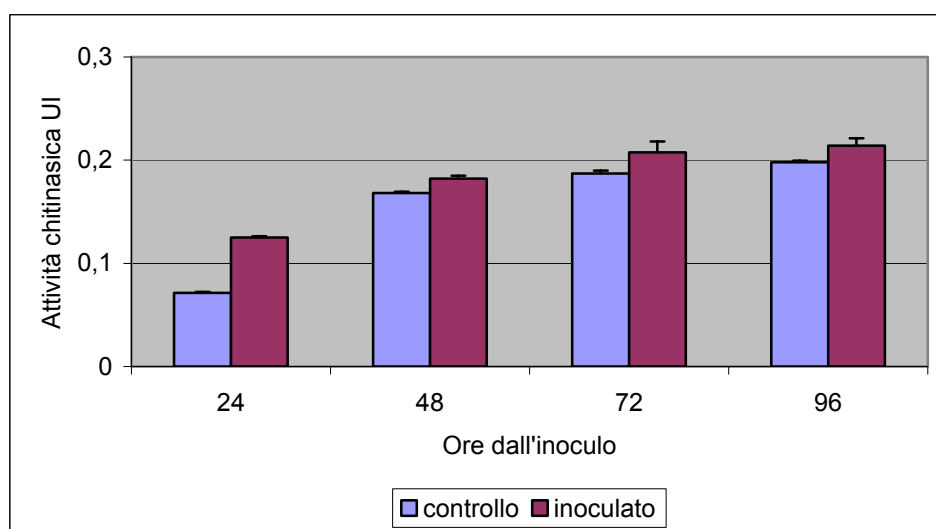


Fig. 4.21: attività chitinasica presente nel IWF (Internal Washing Fluid) di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72, 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*.

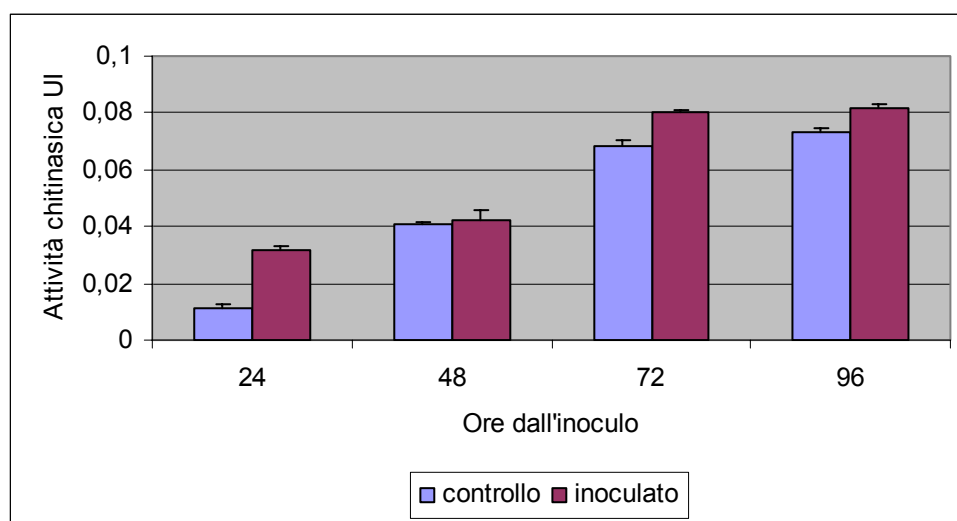


Fig. 4.22: attività chitinasi presente nell'estratto proteico totale di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72, 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*.

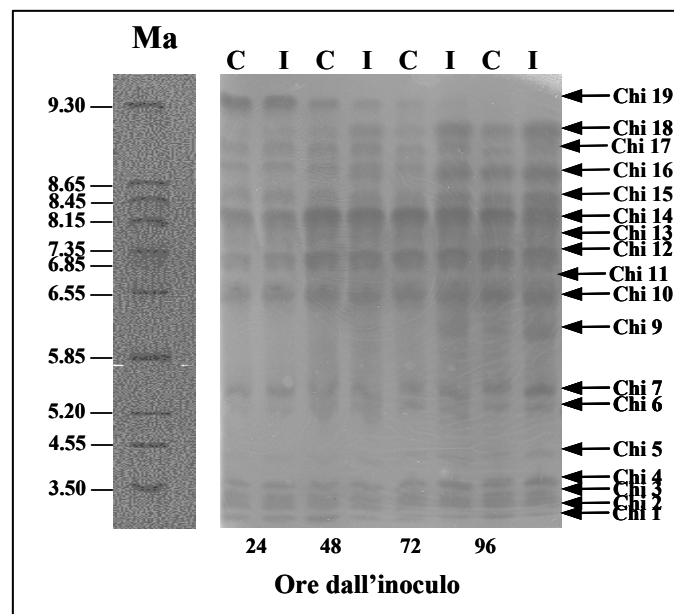


Fig. 4.23: forme isoenzimatiche di chitinasi, presenti nel IWF (Internal Washing Fluid) di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72 e 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*. I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A sinistra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (**Ma**) (**C**: controllo non inoculato; **I**: inoculato).

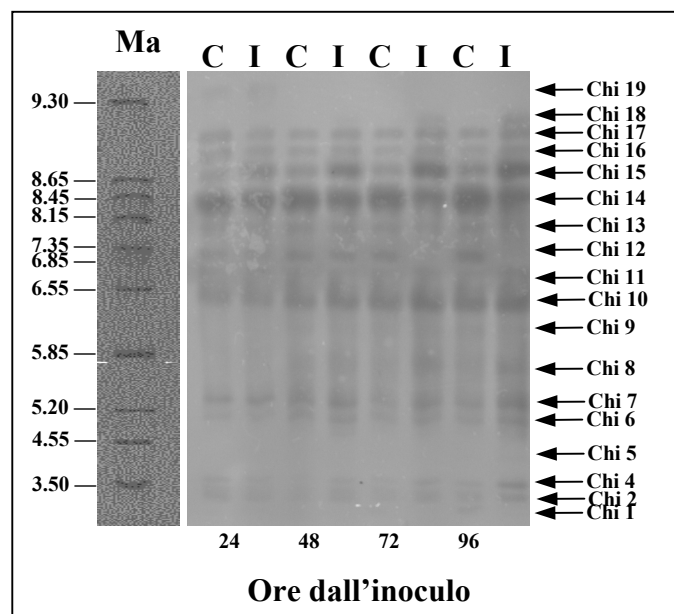


Fig. 4.24: forme isoenzimatiche di chitinasi, presenti nell'estratto proteico totale di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72 e 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*. I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A sinistra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (**Ma**) (**C**: controllo non inoculato; **I**: inoculato).

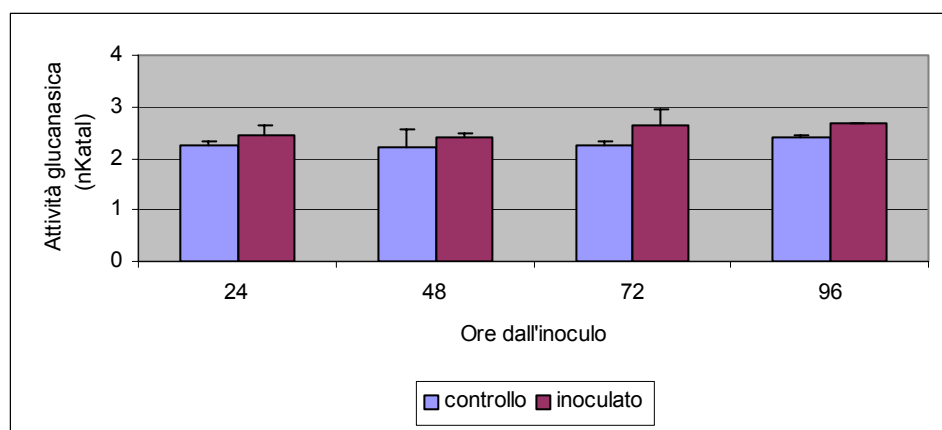


Fig. 4.25: attività glucanasica presente negli IWF (Internal Washing Fluid) di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72, 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*.

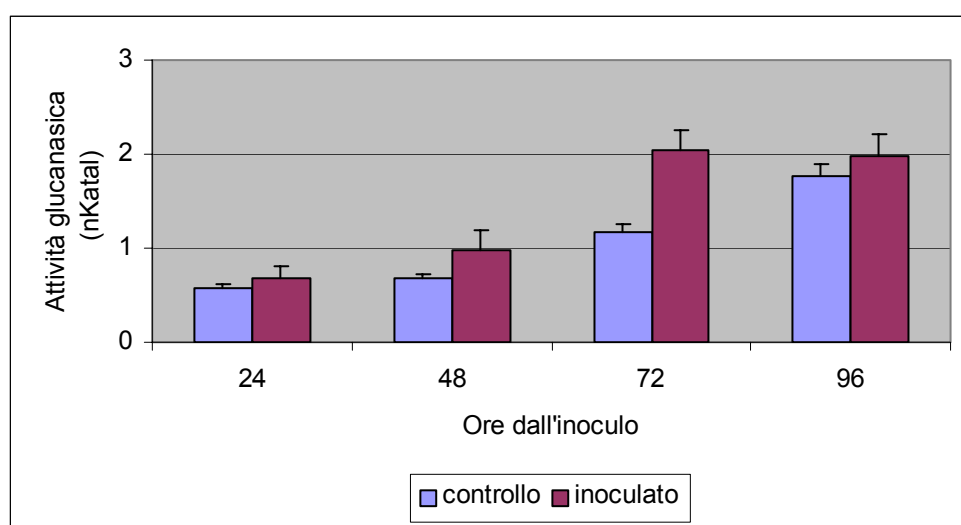


Fig. 4.26: attività glucanasica presente nell' estratto proteico totale di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72, 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*.

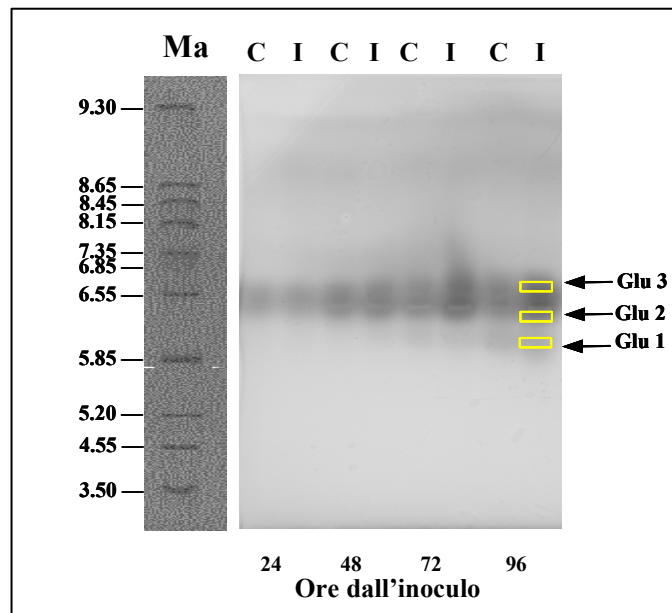


Fig. 4.27: forme isoenzimatiche di glucanasi, presenti nel IWF (Internal Washing Fluid) di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72 e 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*. I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A sinistra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (**Ma**) (**C**: controllo non inoculato; **I**: inoculato).

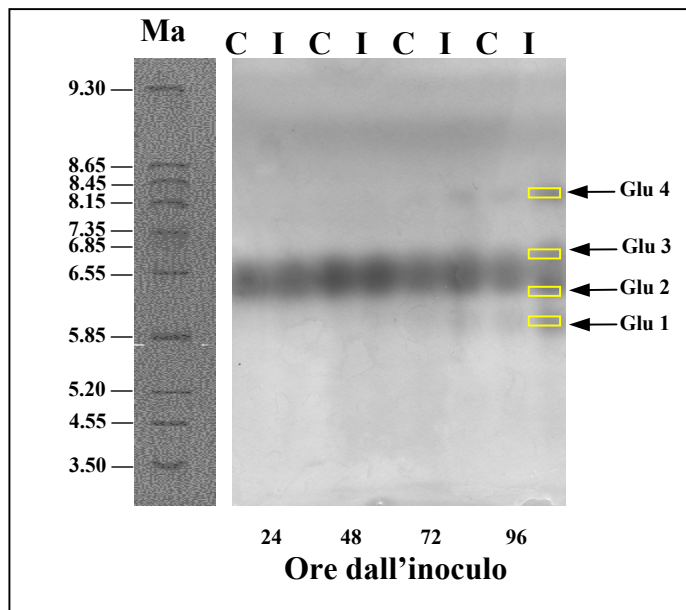


Fig. 4.28: forme isoenzimatiche di glucanasi, presenti nell'estratto proteico totale di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72 e 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*. I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A sinistra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (**Ma**) (**C**: controllo non inoculato; **I**: inoculato).

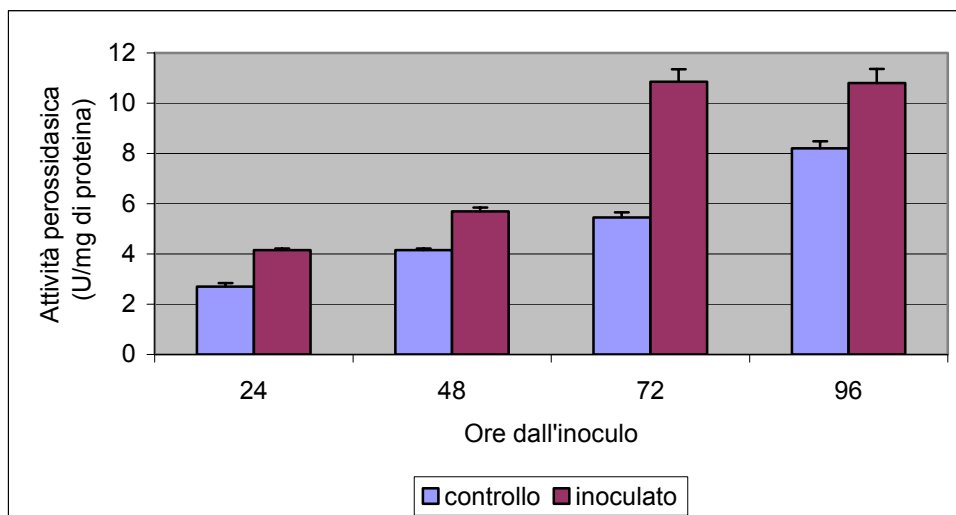


Fig. 4.29: attività perossidasi presente nel IWF (Internal Washing Fluid) di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72, 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*.

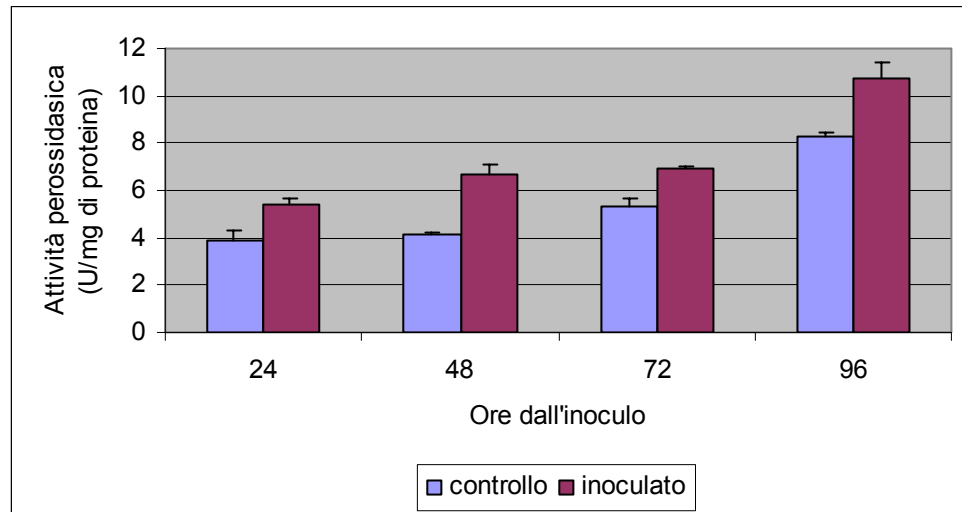


Fig. 4.30: attività perossidasi presente nell' estratto proteico totale di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72, 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*.

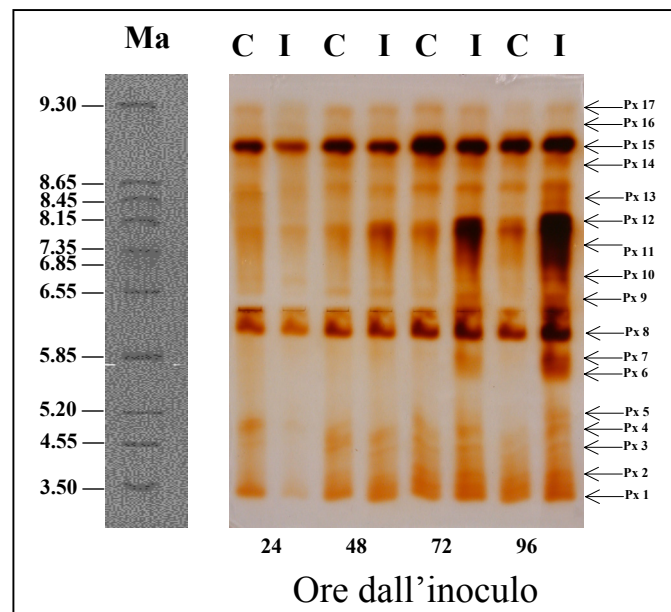


Fig. 4.31: forme isoenzimatiche di perossidasi, presenti nel IWF (Internal Washing Fluid) di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72 e 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*. I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A sinistra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (**Ma**) (**C**: controllo non inoculato; **I**: inoculato).

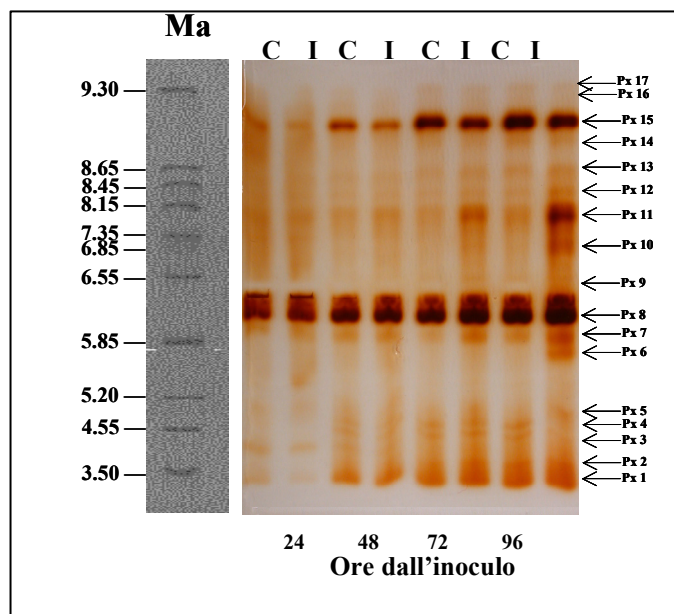


Fig. 4.32: forme isoenzimatiche di perossidasi, presenti nell'estratto proteico totale di plantule di frumento (varietà Bolero) a 24, 48, 72 e 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*. I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A sinistra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (**Ma**) (**C**: controllo non inoculato; **I**: inoculato).

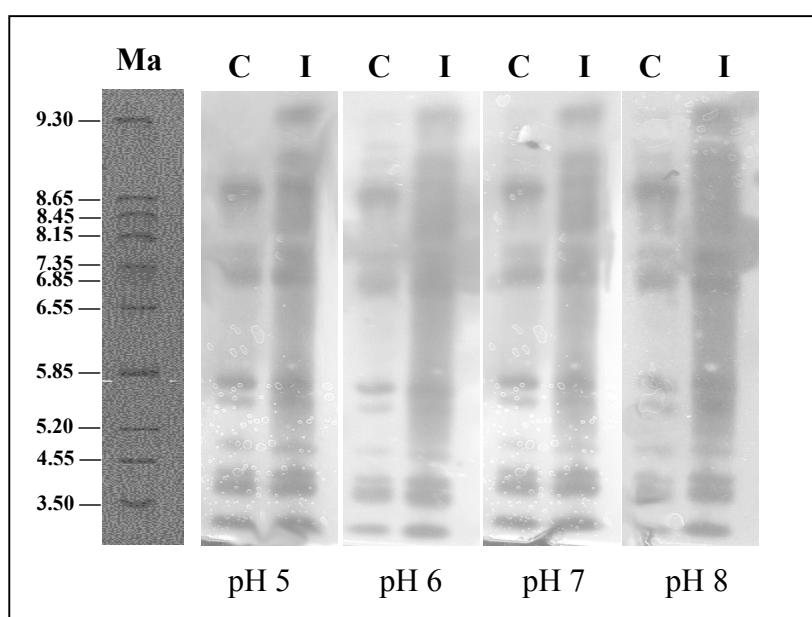


Fig. 4.33: forme isoenzimatiche di chitinasi, con substrato di reazione a diversi pH. I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A sinistra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (**Ma**) (**C**: controllo non inoculato; **I**: inoculato).

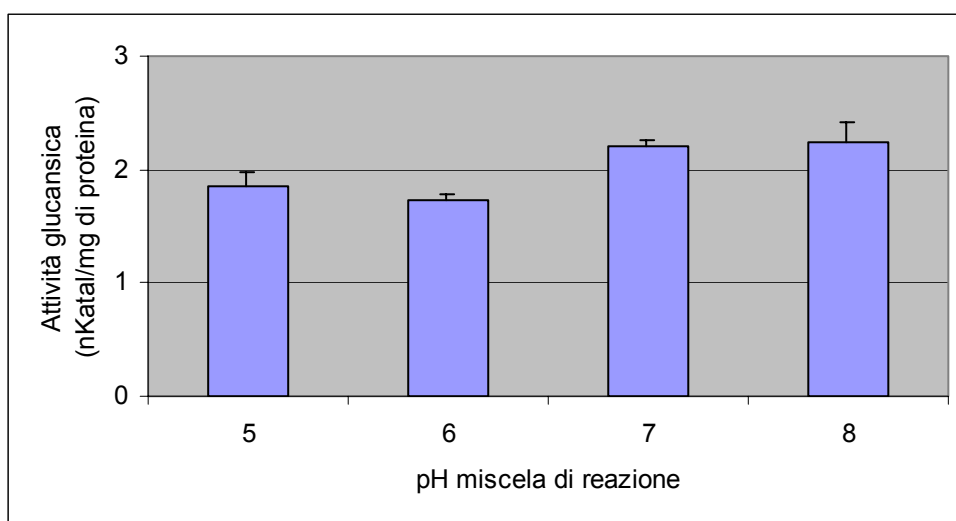


Fig. 4.34: attività glucanasica presente in plantule di frumento (varietà Bolero) 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*, con substrati di reazione a diversi pH.

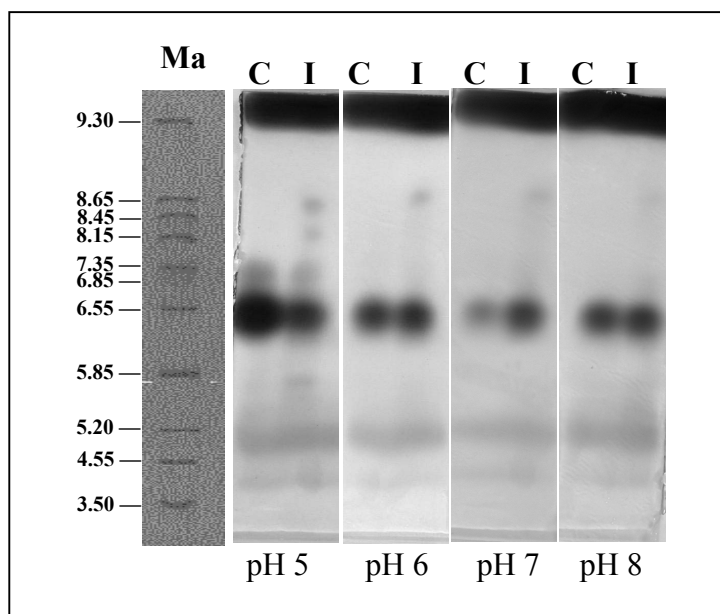


Fig. 4.35: forme isoenzimatiche di glucanasi, con substrato di reazione a diversi pH. I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A sinistra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (**Ma**) (**C**: controllo non inoculato; **I**: inoculato)

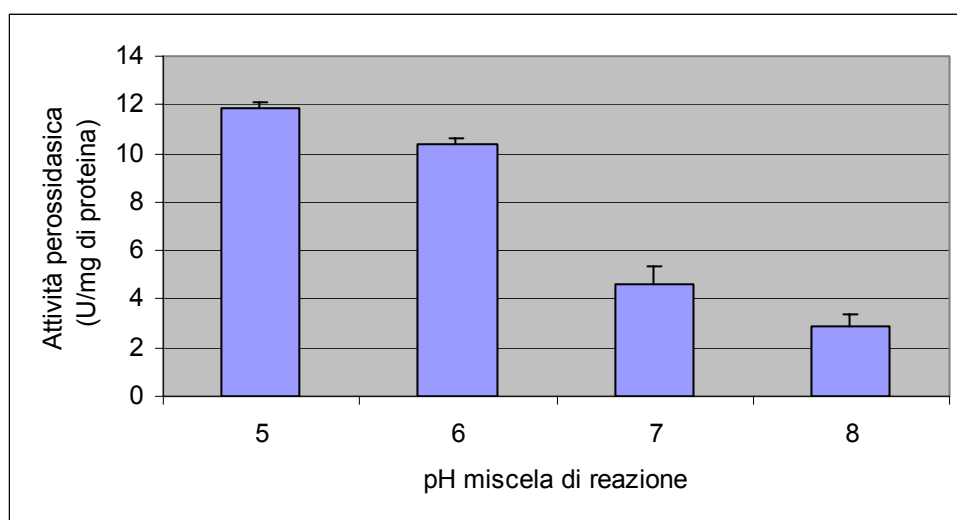


Fig. 4.36: attività perossidasi presente in plantule di frumento (varietà Bolero) 96 ore dall'inoculo con *F. culmorum*, con substrati di reazione a diversi pH.

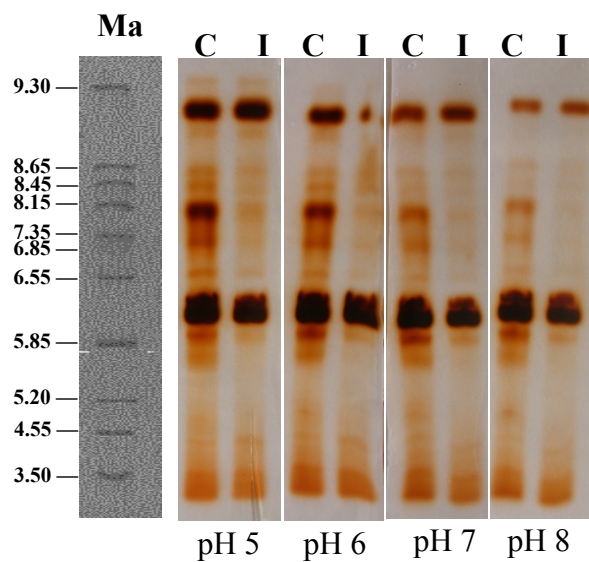


Fig. 4.37: forme isoenzimatiche di perossidasi, con substrato di reazione a diversi pH. I campioni sono stati sottoposti ad isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide (PAGE IEF) con intervallo 3,5-10. A sinistra sono riportate le posizioni ed i pI delle proteine marcatrici di riferimento (**Ma**) (**C**: controllo non inoculato; **I**: inoculato)

5 DISCUSSIONE

Fusarium culmorum è uno dei patogeni più temibili del frumento e rappresenta una delle principali componenti del complesso del “mal del piede” in Italia (Frisullo e Rossi, 1991; Rossi *et al.*, 1995; Balmas *et al.*, 2000; Innocenti *et al.*, 2000). Esso è in grado di provocare danni quantitativi e qualitativi di grande portata dovuti alla capacità del patogeno di colonizzare siti diversi della pianta di frumento, quali la parte basale del fusto e le cariossidi; in questo ultimo caso il patogeno è in grado di accumulare pericolose micotossine (Magan *et al.*, 2002; Magan e Olsen, 2004); la presenza di tali composti può avere gravi ripercussioni sulla salute umana degli animali domestici.

La fusariosi del piede è una malattia che colpisce in concomitanza di determinate condizioni climatiche con una maggiore incidenza in caso di andamento caldo e secco (Perry, 1990; Bateman, 1993; Bateman e Murray, 2001), tuttavia, il fattore predisponente è sicuramente la pratica della monosuccessione (Innocenti *et al.*, 2000). La specializzazione produttiva seguita alla completa meccanizzazione della coltura, unitamente a problematiche commerciali ha determinato in molte aree cerealicole la pratica della monosuccessione, con l'abbandono della pratica agricola consolidata in cui il frumento veniva inserito in avvicendamenti anche lunghi. Con il frumento in monosuccessione varia l'equilibrio microbiologico tellurico assicurato dagli avvicendamenti e si assiste al prevalere di alcune specie fungine patogene a discapito della flora antagonista. Altri fattori hanno probabilmente aumentato i rischi di infezioni da *F. culmorum*. L'abbandono della pratica della bruciatura delle stoppie a fine ciclo produttivo, per ragioni comunque fondate e legate allo sfruttamento della biomassa e al rischio di incendi, ha determinato un aumento della capacità di sopravvivenza del fungo sulle stoppie eventualmente già infette. Inoltre, la produzione cerealicole in aree poco idonee, come quella del frumento duro nel nord Italia ha determinato un consistente aumento delle infezioni sia della spiga che del piede e conseguentemente dell'inoculo presente nell'ambiente. Poiché il “mal del piede” da *F. culmorum* è una malattia essenzialmente legata a fattori agronomici, risulta difficile individuare genotipi di frumento resistenti, in quanto l'interazione non è legata ad un processo di co-evoluzione come accaduto nel caso delle ruggini o dell'oidio. In questo quadro, i risultati emersi dalla prova di resistenza varietale presentati nel presente lavoro confermano come alcune importanti varietà di frumento tenero in uso oggi siano generalmente suscettibili alla malattia, come il Bolero, genotipo prescelto per la conduzione delle ricerche qui descritte.

Dai risultati raggiunti dalla presente ricerca emerge come *F. culmorum* sia in grado di produrre una quantità considerevole di enzimi pectolitici, sia in terreno di coltura sia in pianta. Il ritrovamento di significative quantità di attività pectolitica nei tessuti del frumento indica come questi enzimi rivestano un ruolo centrale nel processo di colonizzazione da parte di questo fungo. Gli esperimenti condotti *in vitro* hanno permesso di osservare come tali enzimi vengano prodotti secondo una sequenza temporale; inizialmente vengono prodotte le forme isoenzimatiche di poligalatturonasi (PG) in sinergia con le pectinmetilesterasi, questi enzimi raggiungono un picco di produzione per poi declinare. Le pectin-liasi (PNL) vengono prodotte in un tempo successivo per poi aumentare in modo consistente. Tale dinamica appare legata alla variazione di pH del mezzo; in altri termini è lecito ipotizzare che le PG vengano indotte in ambiente sub-acidico, mentre le PNL in ambiente alcalino. Questa ipotesi è in linea con gli esperimenti rivolti ad accertare il pH ottimale di questi enzimi, 5,0 per le PG, 8,0 per le PNL. *In vitro* pertanto, il fungo durante il suo accrescimento tende ad esprimere PG nelle fasi iniziali; contestualmente gli ioni ammonio vengono prodotti in modo consistente, come si deduce dai saggi effettuati con un effetto di alcalinizzazione del mezzo. L'alcalinizzazione induce il fungo ad esprimere diverse isoforme di pectin-liasi che proprio in ambiente alcalino trovano il loro optimum di pH. Tale dinamica può essere esportata anche durante l'interazione *F. culmorum* - frumento anche se i risultati ottenuti sulle variazioni del pH tissutale siano meno marcati di quanto ottenuto *in vitro*.

In generale il pH del substrato assume un'importanza centrale in quanto contribuisce a determinare il successo della colonizzazione del patogeno attraverso la secrezione di fattori di patogenesi (Eshel 2002, Prusky *et al.*, 2001, 2003; Yacoby *et al.*, 2000, Vitale *et al.*, 2005). Gli enzimi pectolitici ed in particolare le PNL sono stati indicati come fattori di patogenesi in molte interazioni ospite – patogeno in base ad alcuni parametri, quali l'uso di isolati ipovirulenti, (Marcus *et al.*, 1986), mutanti non patogenetici (Wattad *et al.*, 1995), anticorpi in grado di bloccare l'attività enzimatica (Crawford e Kolattukudy 1987; Wattad *et al.*, 1994), incremento della virulenza in seguito a trasferimento genico (Yakobi *et al.*, 2000), correlazione fra attività pectolitica e virulenza (Chilosi e Magro, 1998). Wassenar e Gastra (2001) hanno proposto una definizione in diverse classi dei fattori di virulenza in base alla loro funzione durante il processo infettivo. Secondo questi autori gli enzimi pectolitici vengono classificati come fattori di virulenza all'interno della Classe I; in tale classe vengono comprese, anche le tossine di alto e basso peso molecolare. Nella Classe III vengono inclusi quei fattori, come il sistema di

regolazione del pH, indispensabili per il patogeno al fine di condizionare alcuni elementi del tessuto ospite, non idonei al processo infettivo.

Il pH apoplastico rappresenta un importante parametro in quanto può condizionare l'attività di diverse attività enzimatiche e, conseguentemente l'efficienza infettiva. Molti patogeni sono in grado di svilupparsi a diversi livelli di pH e posseggono un sistema di regolazione del pH che assicura che gli enzimi ed altri prodotti vengano sintetizzati soltanto ad un pH al quale le loro funzioni hanno massima efficienza (Denison, 2000). In questo quadro, un cambiamento del pH dell'ambiente di crescita durante l'attacco del patogeno può essere considerato un fattore critico nell'espressione dei fattori di virulenza (Eshel *et al.*, 2002b; Prusky *et al.*, 2001, 2003; Yakoby *et al.*, 200b). Dai risultati riportati in questo lavoro si osserva come *F. culmorum* sia in grado di produrre in modo differenziale forme isoenzimatiche di PNL in funzione dell'incremento del pH ambientale, raggiungendo la massima espressione quando il pH raggiunge il valore di 8,0. Durante il processo infettivo su frumento è possibile delineare questa dinamica in modo analogo anche se in forma meno marcata. Le isoforme di PNL vengono prodotte negli spazi intercellulari a 72h dall'inoculo quando il pH del mezzo incrementa a 7,0. L'importanza della variazione del pH durante lo sviluppo di *F. culmorum* è avvalorata dal fatto che già durante la fase di germinazione dei macroconidi la formazione del tubulo germinativo segue un innalzamento consistente del pH interno alla cellula conidica di origine come prerequisito essenziale per la germinazione (Chitarra *et al.*, 2005).

Durante questa fase viene sintetizzata e rilasciata PG rilevata nel mezzo di crescita già a 72h. Il patogeno *in vivo* è in grado di aumentare in modo più contenuto il pH negli spazi intercellulari e ciò determina la produzione di ambedue attività enzimatiche. Prusky e Yakoby (2003) hanno proposto una classificazione dei funghi fitopatogeni come “funghi alcalini” ed “acidici” in base alla loro capacità di alcalinizzare od acidificare l'ambiente di crescita. Già alcuni autori avevano osservato come alcuni funghi, quali *Colletotrichum trifolii*, *C. lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani* fossero in grado di produrre pectin/pectato liasi come principale enzima pectolitico in concomitanza con un aumento del pH del substrato (Hancock, 1966; Wijesundera *et al.*, 1989; Bugbee, 1990). L'alcalinizzazione da parte “funghi alcalini” viene determinata dalla liberazione attiva di ammonio. Questo processo potrebbe essere il risultato dell'attivazione di proteasi a cui fa seguito la deaminazione di aminoacidi che porta di conseguenza all'aumento di pH (Jennings, 1989). *F. culmorum* è in grado di produrre proteasi sia *in vitro* che durante la colonizzazione di cariossidi di frumento (Urbanek e Yirdaw, 1984; Pekkarinen e Jones, 2002; Pekkarinen *et*

al., 2002). Le proteasi individuate durante questi studi sono risultate delle forme enzimatiche caratterizzate da un optimum di attività a pH alcalini. La variazione di pH che interviene durante la colonizzazione del patogeno potrebbe essere associata a proteasi la cui attività aumenterebbe parallelamente all'aumento di pH. La pianta è in grado di reagire producendo degli inibitori di proteasi o attivando quelli naturalmente presenti nella cariosside e dotati di attività antifungina (Chilosi *et al.*, 2000). Il ruolo svolto da tali inibitori nella pianta potrebbe consistere non solo nell'inibire l'azione delle proteasi fungine sulle strutture cellulari, ma anche, in modo indiretto, nell'evitare che si produca un incremento di pH tale da favorire la produzione e l'attività delle PNL.

E' stato osservato che la patogenicità di *C. gloeosporioides*, unitamente all'espressione del fattore di virulenza PL-B, dipende da un aumento nel pH. L'accumulazione della PL *in vitro* viene accompagnata da un incremento del pH del mezzo da 3,8 a 7,0. Frutti di avocado diventano suscettibili all'attacco fungino quando il pH a livello del pericarpo aumenta da 5,2 a 6,0 in seguito al processo di maturazione (Yakoby *et al.*, 2000b, 2001), fenomeno che il fungo accelera per mezzo della produzione di ammoniaca (Prusky *et al.*, 2001, 2003; Yakoby *et al.*, 2000b, 2001). Tale dinamica procede con un aumento del pH fino a 7,5-8,0, che corrisponde all'optimum di pH per la secrezione di PL-B (Prusky *et al.*, 2001). In modo analogo, *C. coccodes* e *C. acutatum* durante il processo di colonizzazione, rispettivamente su pomodoro e mela, determinano, anche se in modo diverso, un aumento di pH e di ioni ammonio (Prusky *et al.*, 2001). Inoltre è stato osservato che la quantità di ioni ammonio presenti nelle mele colonizzate da *C. acutatum* risultava un decimo di quella prodotta dallo stesso fungo su pomodoro ed avocado. Tale fenomeno può essere correlato con la quantità disponibile di fonti dell'azoto che può differire in ospiti differenti determinando conseguentemente un diverso aumento di ammonio, del pH e quindi del processo di colonizzazione per mezzo della secrezione della PNL. Recentemente è stato osservato che un altro patogeno appartenente al genere *Fusarium*, *F. sambucinum* è in grado di produrre, durante il processo patogenetico su tuberi di patata, prevalentemente PNL unitamente all'incremento di pH prossimo al valore ottimale per le stesse PNL (Vitale *et al.*, 2005).

Nel caso di un fungo necrotrofo non litico quale *Alternaria alternata*, è stato notato che durante il processo di colonizzazione su vari ospiti (pomodoro, pepe, melone, ciliegia e cachi) veniva determinato un aumento degli ioni ammonio (da tre a dieci volte) e del pH (da 0,2 a 2,4 unità di pH). Tuttavia, poiché tale processo non avveniva in modo correlato in funzione dei diversi ospiti, è stato suggerito che l'aumento di pH poteva dipendere da

alcuni fattori possibilmente interagenti quali il potere tampone del tessuto, la fonte di azoto disponibile ed il pH iniziale (Eshel *et al.*, 2002b). Altri funghi sono inoltre in grado di produrre ioni ammonio durante il processo di accrescimento, quali *Neurospora crassa*, *A. fumigatus*, *Candida albicans* e *Metarhizium anisopliae* (De Bernardis *et al.*, 1998; Sikora e Marzluf, 1982; St Leger *et al.*, 1997, 1998, 1999). Nel caso di *M. anisopliae*, l'incremento di ioni ammonio è stato associato con un l'aumento dell'attività di una proteasi prodotta in ambiente alcalino, possibile fattore di patogenicità per l'attacco fungino su insetti (St Leger *et al.*, 1998).

I funghi appartenenti al genere *Colletotrichum* inclusi nella classificazione di Prusky e Yakoby (2003) producono essenzialmente dei marciumi molli su frutti, che naturalmente durante il processo di maturazione hanno la tendenza a variare il pH anche se tale processo viene poi esaltato dall'attività fungina. Nell'interazione frumento-*F. culmorum*, il patogeno colonizza un tessuto come la base del frumento che al contrario dei frutti in maturazione non è predisponibile a naturali variazioni di pH; in tal contesto l'attività di condizionamento del pH viene condotta forzatamente a seguito della penetrazione del patogeno nelle prime fasi di sviluppo della pianta. In modo analogo è stato osservato che *Didymella bryoniae*, agente causale del cancro gommoso delle cucurbitacee è in grado di provocare nei germinelli di melone un aumento del pH tissutale unitamente ad una consistente produzione di PNL come unica forma pectolitica (Chilosi e Magro, 1998). Pertanto, si possono individuare dei “funghi alcalini”, rappresentati da un gruppo di funghi in grado di colpire con un meccanismo di alcalinizzazione diversi tipi di tessuto, (frutti carnosì, steli, foglie, tuberi) con un meccanismo del tutto analogo.

L'espressione di più enzimi litici da parte di un fungo fitopatogeno può essere interpretata come capacità del patogeno di produrre forme diverse in funzione del pH in modo differenziale e, nel caso di funghi polifagi, anche in funzione delle caratteristiche dell'ospite. Tale aspetto può spiegare i casi in cui l'inattivazione di singolo gene codificante un enzima pectolitico non ha provocato alcun effetto in termini di patogenicità (Gao *et al.*, 1996; Scott-Craig *et al.*, 1998), probabilmente a causa della dotazione di un intero arsenale capace di promuovere la penetrazione e la colonizzazione della pianta ospite.

Oltre ai “funghi alcalini” altri funghi vengono classificati come “funghi acidici” (Prusky e Yakoby, 2003). I primi ricercatori a notare una correlazione fra variazione di pH e patogenicità sono stati Bateman e Beer (1965). Secondo tali autori l'acidificazione del tessuto durante l'attacco dell'agente patogeno era messa in atto per adattare il pH

apoplastico ai valori ottimali per la degradazione enzimatica delle pareti cellulari. In questo gruppo troviamo funghi quali *Penicillium expansum*, *P. digitatum*, *P. italicum*, *Botrytis cinerea* (Prusky *et al.*, 2003), *Sclerotinia sclerotiorum* e *Cryphonectria parasitica* (Bateman e Beer, 1965; Rollins e Dickman, 2001; Vautard-Mey e Fevre, 2003) che sono in grado di promuovere un forte effetto di acidificazione del tessuto infetto. L'acidificazione del tessuto viene ottenuta tramite l'accumulazione di acidi organici e/o dell'escrezione di H^+ . La capacità di *F. oxysporum* di acidificare il pH extracellulare è legata all'attivazione della membrana H^+ -ATPase (Brandao *et al.*, 1992) ed alla produzione di acido fusarico (FA), ritenuto anche come fattore di patogenesi (Davis, 1969). Il modo di azione del FA potrebbe essere correlato all'espressione di geni codificanti fattori di acidificazione (Caracuel *et al.*, 2003). *S. sclerotiorum* e *B. cinerea* promuovono l'acidificazione del tessuto ospite tramite la produzione di acido ossalico (Marciano *et al.*, 1983; Manteau *et al.*, 2003; Rollins e Dickman, 2001), mentre *Penicillium* e *Aspergillum* spp. producono allo scopo acidi gluconico e citrico (Prusky *et al.*, 2003; Ruijter *et al.*, 1999). L'acido ossalico è stato indicato anche come fattore di virulenza in quanto mutanti di *S. sclerotiorum* per la mancanza di secrezione di ossalato risultavano non patogeni (Godoy *et al.*, 1990). Gli acidi organici presentano una importante attività di chelazione di Ca^{2+} con conseguente indebolimento della parete cellulare e della stabilità delle membrane (Bateman e Beer, 1965; Cunningham e Kuiack, 1992). Inoltre, l'ossalato può essere direttamente tossico, sopprimendo lo stress ossidativo (Cessna *et al.*, 2000) ed inibendo l'attività della polifenolossidasi prodotta dalla pianta (Magro *et al.*, 1984; Marciano *et al.*, 1983; Vannini *et al.*, 1993).

Il meccanismo prodotto da *F. culmorum* in grado di promuovere un innalzamento del pH e quindi la produzione di pectiniasi ha un riflesso non solo nell'attività patogenetica del fungo, ma anche nel grado di resistenza del fungo. A seguito dell'infezione da parte del patogeno vengono prodotte diverse proteine di patogenesi. In studi effettuati in passato sono state riscontrate nell'intera frazione proteica una diversa tipologia di proteine di difesa, quali β 1,3-glucanasi, perossidasi, chitinasi, PR4 (Caruso *et al.*, 1999). Nella presente tesi vengono per la prima volta riportati dei risultati che indicano come queste proteine hanno nel loro insieme una diversa distribuzione a seguito dell'infezione di plantule di frumento da parte di *F. culmorum* tra frazione apoplastica e simplastica. In particolare, si osserva come alcune isoforme delle citate proteine di difesa siano differenzialmente indotte nell'apoplasto o nel simplasto a seguito del processo patogenetico da parte di *F. culmorum*. Il significato di questo fenomeno può essere

associato con le caratteristiche delle diverse isoforme in termini di attività antifungina singola e sinergica. L'importanza nei fenomeni di resistenza delle chitinasi e β 1,3-glucanasi con localizzazione apoplastica è sottolineata dal fatto che esse vengono accumulate in modo consistente in caso di resistenza durante il tentativo d'infezione di varietà di frumento con minore suscettibilità a *F. culmorum* (Kang e Buchenauer, 2002). Per quanto riguarda le perossidasi, sono glicoproteine catalizzanti l'ossidazione di un gran numero di substrati, tramite la H_2O_2 . Sono note diverse isoforme, coinvolte in un gran numero di processi cellulari tra cui i fenomeni di resistenza (Gaspar *et al.*, 1982). Da cariossidi di frumento è stata anche isolata una perossidasi con attività antifungina (Caruso *et al.*, 2001). I risultati presentati nella presente tesi indicano come la variazione di pH scaturita dall'interazione *F.culmorum*–frumento determini una diminuzione da parte della pianta di opporsi all'invasione del patogeno; il pH ottimale di forme isoenzimatiche di β 1,3-glucanasi e chitinasi risulta pari a 5,0. L'alcalinizzazione del mezzo produce una consistente diminuzione dell'attività di tali enzimi; tale effetto potrebbe quindi determinare una diminuzione della loro efficacia come proteine di difesa rendendo così vana la loro espressione ed induzione da parte della pianta.

6 CONCLUSIONI

I risultati presentati nella presente tesi di dottorato indicano come *F. culmorum* sia in grado di influenzare durante il processo patogenetico il pH apoplastico per mezzo di rilascio di ioni ammonio per azione di proteasi fungine. La produzione di ioni ammonio incrementerebbe nel tempo in quanto le proteasi fungine hanno optimum di pH alcalino. Questo processo avrebbe la capacità di attivare i geni coinvolti nella produzione di pectinasi che aumenterebbero durante il processo stesso e si avvantaggerebbero nella loro attività delle condizioni di pH alcalino determinando la disgregazione delle strutture cellulari. La pianta in tali condizioni presenta una diminuita capacità di difendersi in quanto alcune sue difese costitutive ed indotte legate a proteine enzimatiche di difesa avrebbero un decremento di attività perché prodotte in un ambiente di pH non ottimale.

Dal punto di vista dei riflessi pratici, i risultati riportati, permettono di definire le modalità del processo patogenetico durante l'interazione *F. culmorum* - frumento. Tale aspetto permette definire nuove strategie nella difesa, legate ad esempio nel reperire fonti di resistenza in grado di opporsi per esempio all'alcalinizzazione del mezzo attraverso un'azione di inibizione delle proteasi fungine da parte di inibitori proteici. Inoltre, il contenimento della malattia potrebbe essere ottenuto attraverso l'utilizzo di composti in grado di tamponare la fillosfera su valori di pH subacidi non idonei allo sviluppo della malattia.

7 BIBLIOGRAFIA

- Abeles F.B., Forrence L.E., 1970. Temporal and hormonal control of β -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiology 45: 395-400.
- Adam A., Farkas T., Somlay G., Hevesi M., Kiralay Z., 1989. Physiological and Molecular Plant Pathology 34: 23-26.
- Albersheim P., Killias U., 1963. Histochemical localization at the electron microscope level. American Journal of Botany. 50: 732-745.
- Albersheim P., 1975. The wall of growing plant cells. Sci. Amer. 232: 80-95.
- Alexander D., Goodman R. M., Gut-Rella M., Glascock C., Weymann K., Friedrich L., Maddox D., Ahl-Goy P., Luntz T., Ward E., and Ryals J., 1993. Increased tolerance to 2 oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein-1a. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7327-7331.
- Alvarez M. E., Pennel R. I., Mejer P. J., Ishikawa A., Dixon R. A., Lamb C., 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. Cell 92: 773-784.
- Annis S. L., Goodwip H., 1997. Recent advances in molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. European Journal of Plant Pathology 103: 1-14.
- Antoniw J. F., Ritter C. E., Pierpoint W. S., Van Loon L. C., 1980. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. J. Gen. Virol. 47: 79-87.
- Apostol I., Heinsteins P. F., Low P. S., 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defence and signal transduction. Plant Physiology 90: 109-116.
- Atkinson M. M., Keppler L. D., Orlandi E. W., Baker C. J., Mischke C. F., 1990. Involvement of plasma membrane calcium influx in bacterial induction of the K^+/H^+ and hypersensitive responses in tobacco. Plant Physiology 92: 215-221.
- Balmas V., Santori A., Corazza L., 2000. Ruolo di alcune specie di *Fusarium* nel determinare sintomi di "mal del piede" del frumento duro. Atti Giornate Fitopatologiche 2: 247-252.
- Baga M., Chibbar R. N., Katta K. K., 1995. Molecular cloning and expression analysis of peroxidase genes from wheat. Plant Molecular Biology 29: 647-662.
- Baker B., Zambryski P., Staskawicz B., Dinesh-Kumar S. P., 1997. Signaling in plant-microbe interactions. Science 276: 726-733.
- Baker C.J., Aist J. R., Bateman D. F., 1980. Ultrastructural and biochemical effects of endopolygalacturonase on cell walls from cell suspension cultures of bean and rice. Canadian Journal of Botany 58: 867-880.

- Baker C. J., Mock N., Glazener J., Orlandi E., 1993a. Recognition responses in pathogen/nonhost and race/cultivar interactions involving soybean (*Glycine max*) and *Pseudomonas syringae* pathovar. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 43: 81-94.
- Baker C. J., Orlandi E., Mock N., 1993b. Harpin an elicitor of hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiology* 102: 1341-1344.
- Bate N. J., Rothstein S. J., 1998. C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant Journal* 16: 561-569.
- Bateman D. F., 1976. Plant cell wall hydrolysis by pathogens. In: "Biochemical aspects of Plant Parasite Relationships". Eds Friend J., Threlfall D.R., Academic Press, pp. 79-103.
- Bateman D. F., Beer S. V., 1965. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 55: 204-211.
- Bateman G.L., 1993. Development of disease symptoms and fungal pathogens on shoot bases in continuous winter wheat. *Plant Pathology* 42: 595-608.
- Bateman G. L., Murray G., 2001. Seasonal variations in populations of *Fusarium* species in wheat-field soil. *Applied Soil Ecology* 18: 117-128.
- Basham H. G., Bateman D. F., 1975. Relationship of cell death in plant tissue treated with a homogeneous endopectate lyase to cell wall degradation. *Physiological Plant Pathology* 5: 249-262.
- Bent A. F., 1996. Plant disease resistance genes: function meets structure. *The Plant Cell* 8: 1757-1771.
- Bergey D. R., Orozco-Cardenas M., de Moura D. S., Ryan C. A., 1999. A wound and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1756-1760.
- Beringer J. E., Johnson A. W. B., 1984. In: *Plant-Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives* Kosuge T and Nester EW, eds. Vol. 1, Macmillan, New York and London pp. 3-18.
- Bock W., Dongowski G., Gobel H., Krause M., 1975. Nachweis der hemmung mikrobieller pektin- und pectat lyase durch pflanzeigene inhibtoren. *Die Nahrung* 19: 411-416.
- Bohlmann H., Apel K., Garcia-Olmedo F., 1994. Thionins. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12/S75.
- Bol J. F., Linthorst J. M., Cornelissen B. J. C., 1990. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 113-138.

- Boller T., 1987. Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. Plant-Microbe interactions: Molecular and Genetic Perspectives. Kosuge T and Nester EW, eds. Vol. 2, Macmillan, New York and London, pp. 385-413.
- Boller T., 1993. Antimicrobial functions of the plant hydrolases chitinase and β -1,3-glucanase. In: Developments in Plant Pathology, Fritig B., and Legrand M. Eds. pp. 391.
- Bolwell G. P., Bindschedler L. V. L. V., Blee K. A., Butt V. S., Davies D. S., Gardner S. L., Gerrish C., Minibayeva F., 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. Journal of Experimental Botany 53: 1367-1376.
- Bolwell G. P., WoJtaszek P., 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence—broad perspective. Physiological and Molecular Plant Pathology 51: 347-366.
- Bottalico A., 1998. *Fusarium* disease of cereals: species complex and related mycotoxins profiles in Europe. Journal of Plant Pathology 80, (2): 85-103.
- Bowen J. K., Templeton M. D., Sharrok K. R., Crowhurst R. N., Rikkerik E. H. A., 1995. Gene inactivation in the plant pathogen *Glomerella cingulata*: three strategies for the disruption of the pectin lyase gene *pnlA*. Mol. Gen. Genet. 246: 196-205.
- Bradford M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Brandao R. L., Castro I. M., Passos, J. B., Nicoli J. R. and Thevelein J. M., 1992. Glucose-induced activation of the plasma membrane H^+ -ATPase in *Fusarium oxysporum*. J. Gen. Microbiol. 138: 1579–1586.
- Brisson L. F., Tenhaken R., Lamb C. J., 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. Plant Cell 6: 1703-1712.
- 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.
- Broekaert W. F., Lee H., Kush A., Chua N. H., Raikhel N. V., 1990. Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7633-7637.
- Brogliè K., Brogliè R., Benhamou, N., Chet I., 1993. The role of Cell Wall Degrading Enzymes in Fungal Disease Resistance. In: «Biotechnology in Plant Disease Control». Wiley-Liss. Inc., pp. 139-156.
- Bugbee W. M., 1990. Purification and characteristics of pectin lyase from *Rhizoctonia solani*. Physiological and Molecular Plant Pathology 36: 15-25.

- Bugbee W. M., 1993. A pectin lyase inhibitor protein from cell walls of sugar beet. *Phytopathology* 83: 63-68.
- Bussik H. J. D., Buxton F. P., Fraaye B. A., de Graaff L. H., Visser J., 1992. The polygalacturonase of *Aspergillus niger* encoded by family of diverged genes. *European Journal Biochemistry*. 208: 83-90.
- 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. *Phytopathology* 152: 34-42.
- Buzi A., Chilosi G., Caruso C., Leonardi L., Magro P. Differential induction of defence related proteins in melon seedlings infected with *Didymella bryoniae* and upon treatment with BTH, salicylic acid and methyl jasmonate. 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology, Taormina, Giardini Naxos, Italy, 18-22 Settembre 2000.
- Campagna C., Haidukowski M., Pancaldi D., Pascale M., Ravaglia S., Silvestri M., Visconti A., 2005. Fonti di rischio e gestione delle micotossine nel frumento. *L'Informatore Agrario* 1: 39-47.
- Caracuel Z., Roncero M. I. G., Espeso E. A., Gonzales-Verdejo C. I., Garcia-Maceira F. I. and Di Pietro A., 2003. The pH signaling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Microbiology* 48: 765-779.
- 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, pp. 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., Bertini L., Magro P., 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.
- Casacuberta J. M., Puigdoménech P., Segundo B. S., 1991. A gene coding for a basic pathogenesis-related (PR-like) protein from *Zea mays*. Molecular cloning and induction by a fungus (*Fusarium moniliforme*) in germinating maize seed. *Plant Molecular Biology* 16: 527-536.
- Cervone F., De Lorenzo G., Pressey R., Darvill A. G., Albersheim P., 1990. Can *Phaseolus* PGIP inhibit pectic enzymes from microbes and plants? *Phytochemistry* 29: 447-449.

- Cervone F., Castoria R., Leckie F., De Lorenzo G. 1997. Perception of fungal elicitors and signal transduction. Signal Transduction in Plants, P. Aducci (ed.), Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland, pp. 153-177.
- Cessna S., Sears V., Dickman M., Low P., 2000. Oxalic acid, a pathogenicity factor of *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the host oxidative burst. Plant Cell 12: 2191–2199.
- Champeil A., Dorè T., Fourbet J. F., 2004. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practice blight attack and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. Plant Science 166 (6): 1389-1415.
- Chilosi G., Magro P., 1997. Pectin lyase and polygalacturonase isoenzyme production by *Botrytis cinerea* during the early stages of infection on different host plants. Journal of Plant Pathology 78: 61-69.
- Chilosi G., Magro P., 1998. Pectolytic enzymes produced *in vitro* and during colonization of melon tissues by *Didymella bryoniae*. Plant Pathology 47: 700-705.
- Chilosi G., Caruso C., Caporale C., Leonardi L., Bertini L., Buzi A., Nobile M., Magro P., Buonocore V., 2000. Antifungal activity of a Bowman-Birk-type trypsin inhibitor from wheat kernel. Journal of Phytopathology 148: 477-481.
- Chilosi G., Corazza L., 1990. Occurrence and epidemics of yellow rust of wheat in Italy. Cereal Rust and Powdery mildews Bulletin, Edizione R.A. Bayles, Oxford (UK) "The European and Mediterranean Cereal Rusts Foundation" 1990, Vol. 18 (1), 1-9.
- Chilosi G., Johnson R., 1990 Resistance to races of *Puccinia striiformis* in seedlings of Italian wheats and possible presence of Yr6 gene in some durum cultivars. Journal of Genetics and Breeding, Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Roma, Gennaio 1990, Vol. 44 (1): 13-20.
- Chitarra G. S., Breeuwer P., Rombouts F. M., Abee T., Dijksterhuis J., 2005. Differentiation inside multicelled macroconidia of *Fusarium culmorum* during early germination. Fungal Genetics and Biology 42: 694-703.
- Chittoor J., Leach J. E., White F. F., 1997. Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Mol. Plant-Microbe Interact. 9: 861-871.
- Clark C. A., Lobeer J. W., 1976. Comparative histopathology of *Botrytis squamosa* and *B. cinerea* on onion leaves. Phytopathology 66: 1279-1289.
- Clement J. A., Parry D. W., 1998. Stem-base disease and fungal colonisation of winter wheat grown in compost inoculated with *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *Microdochium nivale*. European Journal of Plant Pathology 104: 323-330.
- Collinge D. B., Slusarenko A. J., 1987. Plant gene expression in response to pathogens. Plant Molecular Biology 9: 389-410.

- Cooper R. M., Wood R. K. S., 1977. Physiological Plant Pathology 5:135-136. In: Callow, J. A., 1983. Biochemical Plant Pathology. John Wiley and Sons.
- Cooper R. M., 1984. The role of cell-wall degrading enzymes in infection and damage. In: "Plant Disease: Infection, Damage and Loss". Eds. Wood, R. K. S. and Jellis, G. J., Blackwell Scientific Publications pp. 13-27.
- Corazza L., Balmas V., 1994. Le malattie fungine del frumento trasmesse attraverso il terreno. Sementi Elette 40: 39-43.
- Corazza L., Balmas V., Chilosi G., 1987. Il mal del piede del frumento duro. L'informatore Agrario 38: 75-76.
- Corazza L., Sartori A., Magnotta A., Balmas V., Cannoni M., 1999. Mal del piede: agenti causali e suscettibilità varietale. L'informatore Agrario, 55, 36: 43-46.
- Côté F., Hahn M. G., 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. Plant Molecular Biology 26: 1379-1411, Kluwer Academic Publishers.
- Côté F., Ham K. S., Hahn M. G., Bergmann C. W., 1998. Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions. Generation, perception, and signal transduction. Subcell. Biochem. 29: 385-432.
- Crawford M. S., Kolattukudy P. E., 1987. Pectate lyase from *Fusarium solani* f.sp. *pisi*: purification, characterization, *in vitro* translation of the mRNA, and involvement in pathogenicity. Archives of Biochemistry and Biophysics 258: 196-205.
- Creelman R. A., Mullet J. E., 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 355-381.
- Croft K. P. C., Voisey C. R., Slusarenko A. J., 1990. Physiological and Molecular Plant Pathology 36: 49-62.
- Croft K., Juttner F., Slusarenko A. J., 1993. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Plant Physiol. 101: 13-24.
- Crute I. R., Pink D. A. C., 1996. Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. The Plant Cell 8: 1747-1755.
- Cunningham J.E., Kuiack C., 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. Applied Environmental Microbiology 58: 1451-1458.
- Dangl J., Holub E., 1997. La dolce vita: a molecular feast in plant-pathogen interactions. Cell 91: 17-24.
- Dann E. K., 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.
- Darvill A.G., Augur C., Bergmann C., Carlson R. W., Cheong J. J., Eberhard S., Hahn M. G., Lo V. M., Marfà V., Meyer B., Mohnen D., O'Neill M. A., van Halbeek H., York W. S. and Albersheim P., 1992. Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth, development and defenses in plants. *Glycobiology* 2: 181-198.
- Davis D., 1969, Fusaric acid in selective pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 59: 1391-1395.
- De Bernardis F., Muhlschlegel F. A., Cassone A., Fonzi W. A., 1998. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 66: 3317-3325.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R. A., Lamb C. J., 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.
- De Lorenzo G., D'Ovidio R., Cervone F., 2001. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defence against pathogenic fungi. *Annual Review Phytopathology* 39: 313-335.
- Denison S.H., 2000. pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 29: 61-71.
- De Witt P. J. G. M., 1987. In: *Fungal Infection of Plant*. Pegg GF and Ayres PG eds. Cambridge University Press. pp. 1-24.
- Diamond J, 1997. Armi , acciaio e malattie. Ed. Enaudi
- Dixon R. A., Lamb C. J., 1990. Molecular communications in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41:339-367.
- Doares S. H., Narváez-Vásquez J., Conconi A., Ryan C. A., 1995. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiology* 108: 1741-1746.
- Dorey S, Kopp M., Geoffroy P., Fritig B. e Kauffmann S., 1999. Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenyl alanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. *Plant Physiology* 121: 163-171.
- Durner J., Wendehenne D., Klessing D. F., 1998. Defence gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 95: 10328-10333.
- Ebel J., 1998. Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. *Bioessays* 20: 569-76.

- Epple P., Apel K., Bohlmann H., 1995. An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology* 109: 813-820.
- Eshel D., Miyara I., Ailinng T., Dinoor A., Prusky, D., 2002. pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruits. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 15: 774-779.
- Farmer E. E., 1994. Fatty acid signalling in plants and their associated microorganisms. *Plant Mol. Biol.* 26(5): 1423-1437.
- Farmer E. E., Ryan C. A., 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant Cell* 4: 129-134.
- Farmer E. E., Weber H., Vollenweider S., 1998. Fatty acid signalling in *Arabidopsis*. *Planta* 206(2): 167-174.
- Favaron F., 2001. Gel detection of *Allium porrum* polygalacturonase-inhibiting protein reveals a high number of isoforms. *Physiological Molecular Plant Pathology* 58: 239-245.
- Favaron F., Castiglioni C., Di Lenna P., 1993. Inhibition of some rot fungi polygalacturonases by *Allium cepa* L. and *Allium porrum* L. extracts. *Journal Phytopathology* 139: 201-206.
- Favaron F., Destro T., D'Ovidio R., 2000. Transcript accumulation of polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) following pathogen infections in soybean. *Journal of Plant Pathology* 82: 103-109.
- Felix G., Meins F., 1987. Ethylene regulation of β -1,3-glucanase in tobacco. *Planta* 172: 386-392.
- Fenice M., Di Giambattista R., Raetz E., Leuba J. L., Federici F., 1998. Repeated-batch and continuous production of chitinolytic enzymes by *Penicillium janthinellum* immobilised on chemically-modified microporous cellulose. *Journal of Biotechnology* 62: 119-131.
- Ferrari S., Vairo D., Ausubel F. M., Cervone F., De Lorenzo G., 2003. Tandemly duplicated *Arabidopsis* genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *Plant Cell* 15: 93-106.
- Flor H. H., 1971. Current status of the gene for gene concept. *Annual Review 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.
- Frisullo S. e Rossi V., 1991. Variazioni delle popolazioni fungine associate al mal del piede del frumento duro nell'Italia meridionale. *Petria* 1: 99-130.

- Fritig B., Heitz T., Legrand M., 1998. Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current opinion in immunology* 10: 16-22.
- Fry S. C., 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review Plant Physiology* 37: 165-186.
- Gao S.J., Choi G. H., Shain L. and Nuss D. L., 1996. Cloning and targeted disruption of *enpg1*, encoding the major *in vitro* extracellular endopolygalacturonase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parastica*. *Applied Environmental Microbiology* 62:, 1984–1990.
- Gaspar T., Penel C., Thorpe T., Greppin H., 1982. Peroxidases: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. University of Geneva Press, Geneva.
- Gaspar T., Penel C., Hagege D., Greppin H., 1991. Peroxidases in plant growth, differentiation and development processes. In: Biochemical, molecular, and physiological aspects of plant peroxidases, Lobarzewski J., Greppin H., Penel C. and Gaspar Th. eds. University M.Curie-Sklodowska, Lublin, Poland and University of Geneva, Switzerland, pp. 249-281.
- Gianinazzi S., Martin C., Valée J. C., 1970. Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi-nc*. Apparition des nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *Compte rendu de l'Académie des Sciences de Paris* 270: 2283-2386.
- Glazebrook J., 1999. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 280-286.
- Glazener J. A., Orlandi E. W., Baker C. J., 1996. The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiology* 110: 759-763.
- Godoy G., Steadman, J. R. Dickman M. B. and Dam, R., 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological Molecular Plant Pathology* 37: 179–191.
- Goodman R. N., Király Z., Wood K. R., 1986. Cell Wall Composition and Metabolism. In: “The Biochemistry and Physiology of Plant Disease”, Cap. 4. University of Missouri Press, Columbia.
- Govrin E. M., Levine A., 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10: 751-757.
- Greenberg J. T., 1996. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 93: 12094-12097.

Greenberg J. T., 1997. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 525-545.

Hahn M., Bucheli E., Cervone F., Doares S. H., O'Neil R. A., Darvill A., Albersheim P., 1989. Roles Of cell wall constituents in plant pathogen interactions. (In: Kosuge T., Nester E. W. ed. Plant Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspectives, vol. 3, McGraw hill Publ. Co. New York, NY, pp. 131-181.

Hammond-Kosack K. E., Jones, J. D. G., 1997. Plant disease resistance genes. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 575-607.

Hancock J.G., 1966. Pectate lyase production by *Colletotrichum trifolii* in relation to changes in pH. Phytopathology 56: 1112-1113.

Heath M. C., 1998. Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. European Journal of Plant Pathology 104: 117-124.

Heitz T., Bergey D. R., Ryan C. A., 1997. A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. Plant Physiology 114:1085-1093.

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.

Hislop E. C., Keon J. P. R., Fieldings A. H., 1979. Effect of pectinase lyase from *Monilia fructigena* on viability, ultrastructure and localization of acid phosphatase of culture apple cells. Physiological Plant pathology 14: 371-381.

Hitton D. M., Pressey R., 1980. Glucanases in fruits and vegetables. J. Am. Soc. Hort. Sci. 105: 499-502.

Høj P. B., Hartman D. J., Morrice N. A., Doan D. N. P., Fincher G. B., 1989. Purification of a β -1,3-glucan endohydrolase isozyme II from germinated barley and determination of its primary structure from a cDNA clone. Plant Molecular Biology 13: 31-42.

Huber D. J., Nevins D. J., 1980. β -d-glucan hydrolase activity in *Zea* coleoptile cell walls. Plant Physiology 65: 768-773.

Innocenti G., Montanari M., Nastri A., Marengi A., Toderi G., 2000. Effetti di avvicendamento colturale e tecnica di lavorazione del terreno ottenuto in ambiente pedecollinare con sistemi colturali semplificati. Nota IV. Interazione con *Fusarium* spp., *Bipolaris sorokiniana* e *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* su frumento, triticale, orzo e avena. Rivista di Agronomia 34: 276-285.

Ishiro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I., Okada K., 2001. The defective in anther dehiscence1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. Plant Cell 13(10): 2191-2209.

Jabs T., 1999. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. Biochemical Pharmacology 57: 231-247.

Jabs T., Colling C., Tschöpe M., Hahlbrock K., Scheel D., 1997. Elicitor stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. Proceedings of the National Academy of Science USA 94, 4800-4805.

Jach G. B., Gornhardt J., Mundy J., Longemann E., Pinsdorf R., Leah J., Shell Mass C., 1995. Enhanced quantitative resistance against fungi disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. The Plant Journal 81: 97-109.

Jennings D. H., 1989. Some perspectives on nitrogen and phosphorus metabolism in fungi. In: *Nitrogen, Phosphorus and Sulphur Utilization by Fungi* (Boddy, L., Machant, R. and Read, D.J., eds), pp. 1-31. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Johnston D. J., Ramanathan V., Williamson, B., 1993. A protein from immature raspberry fruits which inhibits endopolygalacturonases from *Botrytis cinerea* and other micro-organisms. J. Exp. Bot. 44: 971-976.

Jung J. L., Fritting B., Hahne G., 1993. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) pathogenesis-related proteins. Plant Physiology 101: 873-880.

Kang Z., Buchernauer H., 2002. Studies on infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: Degradation of host cell wall components and localization of tricothecene toxins in infected tissue. European Journal of Plant Pathology 108: 653-660.

Kang Z., Zingen-Sell I., Buchernauer H., 2005. Infection of wheat spikes by *Fusarium avenaceum* and alterations of cell wall components in the infected tissue. *European Journal of Plant Pathology* 111: 19-28.

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

Kauss H., Jeblick W., 1996. Influence of salicylic acid on the induction of competence for H₂O₂ elicitation. Comparison of ergosterol with other elicitors. *Plant Physiology* 11: 755-763.

Keegstra K., Talmadge K. W., Beuer W. D., Albersheim P., 1973. A model of walls of suspension-cultured sycamore cells based on interconnections of macromolecular components. *Plant Physiology* 51: 188-196.

Keen N., 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics* 24: 447.

Keon J. P. R., Waksman G., Bailey J. A. 1990. A comparison of the biochemical and physiological properties of a polygalacturonase from two races of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37: 193-206.

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

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.

Knogge W., 1996. Fungal infection of plants. *The Plant Cell* 8: 1711-1722.

Koiwa H., Sato F., Yamada Y., 1994. Characterization of accumulation of tobacco PR-5 proteins by IEF-immunoblot analysis. *Plant Cell Physiology* 35: 821-827.

Kondo Y., Kawai Y., Ohnishi M., Miyazawa T., Itoh S., Mizutani J., 1993. Lipoxygenase in soybean seedlings catalyzes the oxygenation of phospholipid and such activity changes after treatment with fungal elicitor. *Biochim. Biophys. Acta* 1170(3): 301-306.

Kramell R., Atzorn R., Schneider G., Miersch O., Bruckner C., Schmidt G., Parthier B., 1995. Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue. *J. Plant Growth Regul.* 14: 29-36.

Krumm T., Bandemer K., Boland W., 1995. Induction of volatile biosynthesis in the Lima bean (*Phaseolus lunatus*) by leucine- and isoleucine conjugates of 1-oxo- and 1-hydroxyindan-4-carboxylic acid: evidence for amino acid conjugates of jasmonic acid as intermediates in the octadecanoid signaling pathway. *FEBS Lett.* 377 (3): 523-529.

Kuc J., 1987. In: "Innovative approaches to plant disease control" I. Chet (Ed.), John Wiley, New York, pp. 255-274.

Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lamb C. J., Dixon R. A., 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 76: 419-422.

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.

Laudert D., Weiler E. W., 1998. Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signaling. *Plant J.* 15:675-684.

Leon J., Rojo E., Sanchez-Serrano J. J., 2001. Wound signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 52 (354): 1-9.

Leone G., Van de Heuvel J., 1986. Regulation by carbohydrates of the sequential *in vitro* production of pectic enzymes by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Botany* 65: 2133-2141.

Leone G., 1992. Significance of polygalacturonase production by *Botrytis cinerea* in pathogenesis. Proceedings of Xth International *Botrytis* Symposium, Heraklion, Greece. Pudoc Scientific Publisher, Wageningen, The Netherlands, pp 63-68.

Leone G., Schoffemeer E. A. M., Van de Heuvel J., 1990. Purification and characterization of a constitutive polygalacturonase associated with the infection process of French bean leaves by . *Canadian Journal of Botany* 68: 1921-1930.

- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C., 1994. H₂O₂ from oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Levine A., Pennel R. I., Alvarez M. E., Palmer R., Lamb C., 1996. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology* 6 427-437.
- Li X. C., Berenbaum M. R., Schuler M. A., 2000. Molecular cloning and expression of CYP6B8: a xanthotoxin-inducible cytochrome P450 cDNA from *Helicoverpa zea*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 75-84.
- Linthorst H. J. M., 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit. Review Plant Science* 10:113-150.
- 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.).
- Maccarrone M., Van Zadelhoff G., Veldink G. A., Vliegenthart J. F. G. e Finnazzi-Agrò A., 2000. Early activation of lipoxygenase in lentil (*Lens culinaris*) root protoplasts by oxidative stress induces programmed cell death. *European Journal of Biochemistry* 267: 5078-5084.
- Magan N., Olsen M., 2004. Mycotoxin in food: Detection and control. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.
- Magan N., Hope R., Colleate A., Baxter E. S., 2002. Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology* 108: 685-690.
- Magro P., Chilosi G., Buzi A., 1997. Enzimi pectolitici e sintesi di fitoalessine in *Vicia Faba* inoculata con *Botrytis fabae* e *Botrytis cinerea*. Atti V Convegno Annuale S.I.Pa.V. Agripolis-Legnaro (PD), 18-19 Settembre 1997, p. 37.
- 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.
- May M. J., Hammond-Kovack K. E., Jones J., 1996. Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the Cf-gene-

dependent defence response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. Plant Physiol. 110: 1367-1379.

Mallalasekera R. A. P., Sanderson F. R., Colhoun J., 1973. *Fusarium* diseases of cereals IX penetration and invasion of wheat seedlings by *Fusarium culmorum* and *F. nivale*. Transactions of the British Mycological Society 60: 453-462.

Mansfield J. W., Richardson A., 1981. The ultrastructure of interactions between *Botrytis* species and broad bean leaves. Physiological Plant Pathology 19: 41-48.

Manteau S., Abouna S., Lambert B., Legendre L., 2003. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factors secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiol. Ecol. 43: 359-366.

Marciano P., Di Lenna P., 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.

Marcus L., Barash I., Sneh B., Koltin Y., Finkler A., 1986. Purification and characterization of pectolytic enzymes produced by virulent and hypovirulent isolates of *Rhizoctonia solani* Kuhn. Physiological and Molecular Plant Pathology 29: 325-336

Martin G. B., 1999. Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. Current Opinion in Plant Biology 2: 273-279.

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

McNeil M., Darvill A. G., Fry, S. C., Albersheim P., 1984. Structure and function of the primary cell wall of plants. Annual Review Biochemistry 53: 625-663.

Mehdy M. C., 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. Plant physiology 105: 467-472.

Melchers L. S., Apotheker-de Groot M., van der Knaap J. A., Ponstein A. S., Sela-Buurlage M. B., Bol J. F., Cornelissen B. J. C., van den Elzen P. J. M., Linthorst H. J. M., 1994. A new classes of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases display antifungal activity. Plant Journal 5: 469-480.

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

Miller J. D., Ewen M. A., 1997. Toxic effects of deoxynivalenol on ribosomes and tissues of the spring wheat cultivars Frontana and Casavant. *Natural Toxins* 5: 234-237.

Mittler R., Shulaev V., Sesar M., Lam E., 1996. Inhibition of programmed cell death in tobacco plants during a pathogen-induced hypersensitive response at low oxygen pressure. *Plant Cell* 8: 1991-2001.

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

Molina A., Segura A., Garcia-Olmedo F., 1993. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal pathogens. *FEBS Lett.* 316: 119-122.

Mount M. S., Bateman D. F., Basham H. J., 1970. Induction of electrolyte loss, tissue maceration and cellular death of potato tissue by an endopolygalacturonate trans-eliminase. *Phytopathology* 60: 924-931.

Movahedi S., Heale J. B., 1990/a. Purification and characterisation of an aspartic proteinase secreted by *Botrytis cinerea* Pers ex Pers in culture and in infected carrots. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36: 289-302.

Movahedi S., Heale J. B., 1990/b. The roles of aspartic proteinase and endopolygalacturonase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various tissues by different isolates of *B. cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36: 303-324.

Mussing C., Biesgen C., Liss J., Uwer U., Weiler E. W., Altamann T., 2000. A novel stress-inducible 12-oxophytodienoate reductase from *Arabidopsis thaliana* provides a potential link between brassinosteroid-action and jasmonic-acid synthesis. *Journal of Plant Physiology* 157: 143-152.

Neale A. D., Wahleithner J. A., Lund M., Bonnet H. T., Kelly A., Meeks-Wagner D. R., Peacock W. J., Dennis E. S., 1990. Chitinase, β -1,3-glucanase, osmotin and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. *Plant Cell* 2: 673-684.

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

Niderman T., Genet I., Bruyère T., Gees R., Stinzi A., Legrand M., Fritig B., Mosinger 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 Physiology* 108: 17-27.

- Nilsen K. K., Bojsen K., Roepstorff P., Mikkelsen J. D., 1994. A hydroxyproline-containing class IV chitinase of sugar beet is glycosylated with xylose. *Plant Molecular Biology* 25: 241-257
- Nurnberger T., Nennstiel D., Jabs T., Sacks W. R., Hahlbrock K., Scheel D., 1994. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78: 449-60.
- Okamoto K., Hatanaka C., Ozawa J., 1964. A saccharifying pectate trans-eliminase of *Erwinia aroideae*. *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* 28: 331-336.
- Orozco-Cardenas M. L., Narvaez-Vasquez J., Ryan C. A., 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defence genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13(1): 179-191.
- Payne G., Ward E., Gaffney T., Goy P.A., Moyer M., Harper A., Meins F., Ryals J., 1990. Evidence for a third structural class of β -1,3-glucanase in tobacco. *Plant Molecular Biology* 15: 797-808.
- Parchmann S., Gundlach H., Mueller M. J., 1997. Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiology* 115:1057-1064.
- Palva T., Holmström K., Pekka H., Palva E., 1992. Induction of Plant Defense Response by Exoenzymes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6 (2): 190-196.
- Pan S. Q., Ye X. S., Kuc' J., 1989. Direct determination of β -1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. *Analytical Biochemistry* 182: 136-140.
- Park H. J., Miura Y., Kawakita K., Yoshioka H., Doke N., 1998. Physiological mechanisms of a sub-systemic oxidative burst triggered by elicitor induced local oxidative burst in potato tuber slices. *Plant and Cell Physiology* 39: 1218-1225.
- Parry D. W., 1990. The incidence of *Fusarium* spp. in stem bases of selected crops of winter wheat in midlands. *Plant Pathology* 39: 619-622.
- Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan C. A., 1991. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase-inhibitor proteins. *Science* 253: 895-898.
- Pekkarinen A.I., Jones B.L., Niku-Paavola M. L., 2002/a. Purification and properties of an alkaline proteinase of *Fusarium culmorum*. *European Journal of Biochemistry* 269: 798-807. 17.
- Pekkarinen A. I., Jones B.L., 2002/b. Trypsin-like proteinase produced by *Fusarium culmorum* grown on grain proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3849- 3855.

- Peng M. e Kuć J., 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and in tobacco leaf disk. *Phytopathology* 82: 696-699.
- Penninckx I. A. M. A., Thomma B. P. H. J., Buchala A., Métraux J. P., Broekaert W. F., 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10: 2103-2113.
- Piglioni V., 1975. Il mal del piede del frumento. Osservazioni condotte nell'Italia centro-meridionale. *L'Italia Agricola*, 110: 1221-1223.
- Pisi A., Innocenti G., 2001. Morphological modifications in wheat seedlings infected by *Fusarium culmorum* examined at SEM. *Phytopathologia Mediterranea* 40: 172-175.
- Porta H. e Rocha Sosa M., 2002. Plant lipoxygenases. Physiological and Molecular features. *Plant Physiology* 130: 15-21.
- Porter N. A., Caldwell S. E., Mills K. A., 1995. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30(4): 277-290.
- Potter S., Uknes S., Lawton K., Winter A. M., Chandler D., Di Maio J., Novitzky R., Ward E., Ryals J., 1993. Regulation of a Hevein-like gene in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 680-685.
- Powell A. L. T., van Kan J., ten Have A., Visser J., Greve L., Bennet A. B., Labavitch J. M., 2000. Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 942-950.
- Proctor R. H., Hohn T. M., McCormick S. P. 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 593-601.
- Prusky D., Yakoby N., 2003. Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH?. *Molecular Plant Pathology* 4(6): 509-516.
- Prusky D., McEvoy L., Leverentz B., Conway W. S., 2001. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1105-1113.
- Prusky D., McEvoy J. L., Saftner R., Conway W. S., Jones R., 2003. The relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. *Phytopathology* 94: 44-51.
- Purkayastha R. P., 1970. The detection of phytotoxicity in *Botrytis*-infected leaves of bean (*Vicia faba* L.). *Science e Culture* 36:54-55.
- Rayan C. A., Moura D. S., 2002. Systemic wound signaling in plants: a new perception. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 99(10):6519-6520.
- Rancé I., Fournier J., Esquerré-Tugayé M. T., 1998. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in

- transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Plant Biology* 95: 6554-6559.
- Rasmussen U., Bojsen K., Collinge D. B., 1992. Cloning and characterization of a pathogen induced chitinase in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* 20: 277-287.
- Rebmann G., Hertig C., Bull J., Mauch F., Dudler R., 1991. Cloning and sequencing of cDNAs encoding a pathogen-induced putative peroxidase of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Molecular Biology* 16: 329-331.
- 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 (3): 615-622.
- 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 (3): 615-622.
- Ryals J. A., Neuenschwander U. H., Willits M. G., Molina A., Steiner H. Y., Hunt D., 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1809-1819.
- Ryan C. A., 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Annual Review Plant Physiology* 24:173-196.
- Ryan C. A., 1992. The search for the proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. *Plant Molecular Biology* 19: 123-133.
- Roberts W. K., Selitrennikoff C. P., 1990. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *J Gen. Microbiol.* 136: 1771-1778.
- Roggen H. P. J. R., Stanley R. G., 1969. Cell wall hydrolysing enzymes in wall formation as measured by pollen-tube extension. *Planta* 84: 295-303.
- 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 Th. eds. University M.Curie-Sklodowska, Lublin, Poland and University of Geneva, Switzerland, pp. 131-147.
- Rollins J. A., Dickman M. B., 2001. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of *pacC*/RIM1 homolog. *Appl. Environmental Microbiology* 67: 75-81.
- Rossi V., Cervi C., Chiusa G., Languisio L., 1995. Fungi associated with foot rots of winter wheat in North-west Italy. *Journal of Phytopathology* 3: 115-119.

- Ruijter G. J. G., van de Vondervoort P. J. I., Visser J., 1999. Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese. *Microbiology* 145: 2569–2576.
- Rustérucci C., Stallaert V., Milat M. L., Pugin A., Ricci P., Blein J. P., 1996. Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiology* 111: 885-891.
- Rustérucci C., Montillet J. L., Agnel J. P., Battesti C., Alonso B., Knoll A., Bessoule J. J., Etienne P., Suty L., Blein J. P., Triantaphylid s C., 1999: Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death reaction induced by cryptogin on tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* 274: 36446-36455.
- Sasaki Y., Asamizu E., Shibada D., Nakamura Y., Kaneko T., Awai M., Kuwata C., Tsugane T., Masuda T., Shimada H., Takamiya K., Ohta H., Tabata S., 2001. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: self-activation of jasmonate acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling. *DNA Res.* 8(4) : 153-161.
- Schmidt H. H., Walter U., 1994. NO at work. *Cell* 78(6): 919-925.
- Scofield S. R., Tobias C. M., Rathjen J. P., Chang J. H., Lavelle D. T., Michelmore R. W., Staskawicz B. J., 1996. Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* 274: 2063-2065.
- Scott-Craig J. S., Panaccione D. G., Cervone F., Walton J. D., 1990. Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. *Plant Cell* 2: 1191–1200.
- Sela-Burlage M. B., Ponstein A. S., Bres-Vloemans S. A., Melchers L. S., Van den Elzen P.J.M., Cornelissen B. J. C., 1993. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiology* 101: 857-863.
- Seo H. S., Song J. T., Cheong J. J., Lee Y. H., Hwang I., Lee J. S., Choi Y. D., 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (8): 4788-4793.
- Shewry P. R., Lucas, J. A., 1997. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. *Advances in Botanical Research* vol. 26 (incorporating *Advances in Plant Pathology*), pp. 134-192. Academic Press Ltd.
- Shinshi H., Neuhaus J. M., Ryals J., Meins F., 1990. Structure of a tobacco endochitinase gene evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. *Plant Molecular Biology* 14: 357-368.
- Siedow J. N., 1991. Plant lipoxygenase: structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 145-188.

- Sikora L. A., Marzluf G. A., 1982. Regulation of 1-phenylalanine ammonia-lyase by 1-phenylalanine and nitrogen in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* 150: 1287–1291.
- Smith J. A., Fulbright D. W., Hammerschmidt R., 1991. Rapid induction of systemic resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Physiological Molecular Plant Pathology* 38: 223-235.
- Snijders C. H. A., 2004. Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichothecene formation. *Toxicology letters* 153: 37-46.
- Stanford A., Bevan M., Northcote D., 1989. Differential expression within a family of novel wound-induced genes in potato. *Mol. Gen. Genet.* 215: 200-208.
- Staskawicz B. J., Ausubel F. M., Baker B. J., Ellis, J. G., Jones J. D. G., 1995. Molecular Genetics of Plant Disease Resistance. *Science*, vol. 268: 661-667.
- Stephens G., Wood R. K., 1975. Killing of protoplasts by soft-rot bacteria. *Physiological Plant Pathology* 5: 165-181.
- Sticher L., Mauch-Mani B., Métraux J.P., 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35: 235-270.
- Stintzi A., Weber H., Reymond P., Browse J., Farmer E. E., 2002. Plant defence in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 98: 12834-12842.
- St Leger R. J., Joshi L., Roberts D., 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied Environmental Microbiology* 64: 709–713.
- St Leger R. J., Joshi, L., Roberts D. W., Shieh M., Brown R. L., Whitehead M. P., Carey J. W., Cotty T.E., 1997. Adaptation of proteases and carbohydrates of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology* 143: 1983–1992.
- St Leger R. J., Nelson J. O., Screen S. E., 1999. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Journal of Microbiology* 145: 2691–2699.
- Sutton D. C., Deverall B. J., 1984. Phytoalexin accumulation during infection of bean and soybean by ascospores and mycelium of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* 33: 377-83.
- Tang X., Frederic R. D., Zhou J., Halterman D. A., Jia, Y., Martin, G. B., 1996. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto Kinase. *Science* 274: 2060-2065.
- Templeton M. D., Sharrok K. R., Bowen J. K., Crowhurst R. N., Rikkerink E. H. A., 1994. The pectin lyase-encoding gene (*pnl*) family from *Glomerella cingulata*: characterization of *pnlA* and its expression in yeast. *Gene* 142: 141-146.

- Terras F. R. G., Schoofs H. M. E. Thevissen K., Osborn R. W., Vanderleyden J., Camue B. P. A., Broekaert W. F., 1993. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiology* 103: 1311-1319.
- 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 cystein-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell* 7: 573-588.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Tierens, K. F. M. J., Broekaert, W. F., 1999. Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 121: 1093-1101.
- Thordal-Christensen H., Brandt J., Cho B. H., Rasmussen S. K., Gregersen P. L. Smedegaard-Petersen V., Collinge D. B., 1992. cDNA cloning and characterization of two barley peroxidase transcripts induced differentially by the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis*. *Physiological Molecular Plant Pathology* 40: 395-409.
- Toderi G., D'Antuono L. F., 2000. Frumento (*Triticum* sp. pl.). In: Baldoni e Giardini (coord.) “Coltivazioni erbacee” cap. 2 (pp. 32-108), 3^a edz., Pàtron Editore, quarto Inferiore (BO).
- Turner J. G., Ellis C., Devoto A., 2002. The Jasmonate Signal Pathway. *The Plant Cell* 14: S153-S164.
- Trudel J., Asselin A., 1989. Detection of chitinase activity after polyacrilamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 178: 362-366.
- Unemoto N., Kakitani M., Iwamatsu A., Yoshikawa M., Yamaoka N., Ishisa I., 1997. The structure and function of a soybean β -1,3-glucan-elicitor-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1029-1034.
- Urbanek H., YirdawG., 1984. Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and its possible role in phytopathogenesis. *Acta Microbiologica Polonica* 33: 131-136.
- Uritani I., Sthamann M. A., 1961. Pectolitic enzymes of *Ceratocistis fimbriata*. *Phytopathology* 51: 277-285.
- Van Camp W., Von Montagu M., Inzé D., 1998. H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science* 3: 330-334.
- Vance C. P., Kirk T. K., Sherwood R.T., 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review Phytopatology* 18: 259-288.
- Van den Bulcke M., Bauw G., Castresana C., Van Montagu M., Vandekerckhove J., 1989. Characterization of vacuolar and extracellular β -glucanases of tobacco: evidence for a strictly compartmentalized plant defence system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2673-2677.
- Van Loon L. C., 1985. Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* 4: 111-116.

- Van Loon, L. C., 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103: 753.
- Van Loon L. C., Van Kammen A., 1970. Polyacrilamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein composition after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40: 199-211.
- Van Loon L. C., Van Strien E. A., 1999. The current status of pathogenesis-related proteins. 9th International Congress on "Molecular Plant-Microbe Interactions". Amsterdam, July 25-30 1999. Book of abstracts p. 165.
- Vannini A., Beritognolo I., Magro P., 1993. Ruolo delle polifenoloossidasi del castagno nella resistenza al cancro corticale. *Linea ecologica* 2: 18-23.
- Vautard-Mey G., Fevre M., 2003. Carbon and pH modulate the expression of the fungal glucose repressor encoding genes. *Current Microbiology*. 46: 146–150.
- Verhoeff K., Liem J. I., 1978. Presence of endo-polygalacturonase in conidia of *Botrytis cinerea* before and during germination. *Phytopathologische Zeitschrift* 91: 219-26.
- Vignutelli A., Wasternack C., Apel K., Bohlmann H., 1998. Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens. *Plant J.* 14: 285-295.
- Vijayan P., Shockey J., Lévesque C. A., Cook R. J. and Browse J., 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7209-7214.
- Vitale S., Corazza L., Magro P., Chilosi G., 2005. Pectolytic enzymes produced in vitro and during infection of potato tubers by *Fusarium sambucinum*. *Phytopathologia mediterranea* 44: 195-2002.
- Vleeshouwers V. G. A. A., van Dooijeweert W., Govers F., Kamoun S., Colon L. T., 2000. The hypersensitive response is associated with nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* 210: 853-864.
- Vranová E., Inzé D., Van Breusegem F., 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53: 1227-1236.
- Walton J. D., 1994. Deconstructing the Cell Wall. *Plant Physiology* 104: 1113-1118.
- Wanjiru W. M., Kang Z., Buchenauer H., 2002. Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *European Journal of Plant Pathology* 108: 803-810.
- Wassenaar T.M., Gastra W., 2001. Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol. Lett.* 201: 1–7.
- Wattad C., Dinoor A., Prusky D., 1994. Purification of pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and its inhibition by epicatechin: a possible factor

- involved in the resistance of unripe avocado fruits to anthracnose. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7: 293-297.
- Wattad C., Freeman S., Dinoor A., Prusky D., 1995. A nonpathogenic mutant of *Colletotrichum magna* is deficient in extracellular secretion of pectate lyase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 621-626.
- Weber H., Bick, B. A. and Farmer E. E., 1997. Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1473-1478.
- Weber H., Chételat A., Caldelari D., Farmer E. E., 1999. Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-disease potato leaves. 11: 485-494.
- Wijesundera R. L .C., Bailey J.A., Byrde R. J. W., Fielding A. H., 1989. Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: their role in the development of bean anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34: 403-413.
- WoJtaszek P., 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322: 681-692.
- Wright C. S., Gavilanes F., Peterson D. L., 1984. Primary structure of wheat germ agglutinin isolectin, 2: peptide order deduced from X-ray structure. *Biochemistry* 23: 280-287.
- Wu G. S., Short B. J., Lawrence E. B., Levine E. B., Fitzsimmons K. C., Shah D. M., 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7: 1357-1368.
- Yakoby N., Kobiler I., Dinoor A., Prusky D., 2000/a. pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1026–1030.
- Yakoby N., Freeman S., Dinoor A., Keen N.T., Prusky D., 2000/b. Expression of pectate lyase from *Colletotrichum gloeosporioides*. *C. magna* promotes pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 887–891.
- Yakoby N., Beno-Moualem D., Keen N.T., Dinoor A., Pines O., Prusky D., 2001. *Colletotrichum gloeosporioides pelB*, is an important factor in avocado fruit infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 988–995.
- Yao C. L., Conway W. S., Ren R. H., Smith D., Ross G. S., Sams C. E., 1999. Gene encoding polygalacturonase inhibitor in apple fruit is developmentally regulated and activated by wounding and fungal infection. *Plant Molecular Biology* 39: 1231-1241.
- 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.

- Yun D. J., Ibeas J. I., Lee H., Coca M. A., Narasimham M. L., Uesono Y., Hasegawa P. M., Pardo J. M., Bressan R. A., 1998. Osmotin, a plant antifungal protein, subverts signal transduction to enhance fungal cell susceptibility. *Molec. Cell* 1: 807-817.
- Zhang J. X., Bruton B. D., 1999. Relationship of developmental stage of cantaloupe fruit to black rot susceptibility and enzyme production by *Didymella bryoniae*. *Plant Disease* vol 83 n° 11: 1025-1032.