



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
FACOLTÀ DI AGRARIA**

Dipartimento di *Territorio e sistemi agro-forestali*  
*Istituto di Patologia Vegetale*

TESI DI LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

*Effetto di chitinasi e taumatina di vite sulla germinabilità di spore fungine*  
*Effect of a chitinase and a thaumatin like protein of grapevine on germinability of fungal spores*

Relatore:

Prof. *Francesco Favaron*

Correlatore:

Dott. *Simone Vincenzi*

Laureando:

Paolo Armanasco

Matricola n. 597819-TG

ANNO ACCADEMICO 2010- 2011

*A Clotilde, Piero e Mariarosa*



# INDICE

RIASSUNTO.....	pag.1
ABSTRACT.....	pag.3
1. INTRODUZIONE.....	pag.5
1.1. Chitinasi.....	pag.9
1.2. Thaumatin-like proteins.....	pag.12
1.3. <i>Guignardia bidwellii</i> .....	pag.13
1.4. <i>Botrytis cinerea</i> .....	pag.16
1.5. <i>Fusarium graminearum</i> .....	pag.18
2. SCOPO.....	pag.21
3. EFFETTO DI CHITINASI E TAUMATINA DI VITE SULLA GERMINABILITÀ DI SPORE FUNGINE.....	pag.23
3.1. Materiali e metodi.....	pag.23
3.1.1. <i>Le proteine</i> .....	pag.23
3.1.2. <i>Materiale biologico e preparazione spore</i> .....	pag.24
3.1.3. <i>Saggio biologico</i> .....	pag.25
3.2. Risultati.....	pag.26
3.2.1 <i>Germinabilità di G. bidwellii</i> .....	pag.26
3.2.2 <i>Germinabilità di F. graminearum</i> .....	pag.29
4. DISCUSSIONE.....	pag.33
BIBLIOGRAFIA.....	pag.37



## RIASSUNTO

In seguito all'attacco dei patogeni le piante attivano vari meccanismi difensivi. Tra questi è noto l'accumulo di proteine di patogenesi (PR- proteins). Le più espresse in vite sono le chitinasi, presenti con 13 isoforme e responsabili della degradazione della parete fungina, e le "thaumatin-like-proteins", proteine che alterano la funzionalità della membrana cellulare e delle quali sono conosciuti cinque tipi. L'accumulo di tali proteine è crescente durante la fase di maturazione. *Guignardia bidwellii*, agente del marciume nero, è uno dei principali patogeni fungini della vite, della quale può colpire le foglie, i giovani tralci e soprattutto i grappoli nelle fasi più giovanili.

Nel presente lavoro di tesi è studiata la capacità della chitinasi e della "thaumatin-like-protein" (TLP) più abbondanti ed estratte da uve mature della cultivar "Incrocio Manzoni" nell'inibire la germinazione delle spore di *G. bidwellii* e *Fusarium graminearum*, fungo quest'ultimo non patogeno di vite. I risultati ottenuti hanno evidenziato che le due proteine hanno una buona capacità di ridurre la germinazione delle spore di entrambi i funghi. Alla prima osservazione, eseguita dopo 13 (*G. bidwellii*) e 7 ore (*F. graminearum*), la riduzione di germinabilità era compresa tra il 42% ed il 57% per *G. bidwellii* e tra il 17% ed il 53% per *F. graminearum*. Nelle osservazioni eseguite in momenti successivi entrambi i funghi mostravano una germinabilità crescente ma più accentuata in *F. graminearum*. Pertanto, le proteine indagate potrebbero essere implicate nella resistenza ontogenetica nei confronti di *G. bidwellii*, che si manifesta in vite nei tessuti più maturi ed in particolare negli acini, nei quali, come noto, la quantità di proteine PR è elevata. In *F. graminearum* è stata riscontrata una spiccata differenza tra l'efficacia delle due proteine; infatti, la chitinasi inibisce la germinazione delle spore molto più della TLP.



## ABSTRACT

Following the attack of pathogens plants activate various defense mechanisms. Among these is known the accumulation of pathogenesis proteins (PR-proteins). The most expressed in *Vitis* are the chitinases, with 13 isoforms and responsible for the degradation of the fungal cell wall, and the "thaumatin-like-proteins", proteins that alter the functionality of the cell membrane and of which five types are known. The accumulation of these proteins is increasing during maturation. *Guignardia Bidwellii*, agent of black rot is a major of fungal pathogens of the grapevine, which can affect the leaves, young shoots and above all the clusters in the early stages.

In the present work has been studied the ability of the most abundant chitinase and 'thaumatin-like-protein "(TLP) and extracted from ripe grapes of the cultivars" cross Manzoni "in inhibiting the germination of spores of *G. Bidwellii* and *Fusarium graminearum*, the latter a non-pathogenic fungus of *Vitis* genre. The results showed that the two proteins have a good ability to reduce the germination of spores of both fungi. At first observation, performed at 13 (*G. Bidwellii*) and 7 hours (*F. graminearum*), the reduction of germination was included between 42% and 57% for *G. Bidwellii* and between 17% and 53% for *F. graminearum*. In observations made at successive moments both fungi showed an increasing germination rate, more pronounced in *F. graminearum*. Therefore, the investigated proteins may be involved in the ontogenetic resistance against *G. Bidwellii* manifested in grapevine in more mature tissues and in particular in the grapes, in which, as noted, the amount of PR proteins is high. In *F. graminearum* there was a marked difference in efficacy between the two proteins, in fact, the chitinase inhibits the germination of spores, much more than the TLP.



# 1. INTRODUZIONE

In ogni malattia infettiva si verifica una serie di eventi più o meno distinti che caratterizzano lo sviluppo e la diffusione della malattia. Questa catena di eventi è chiamata ciclo di malattia (figura 1). Il ciclo di malattia è strettamente dipendente dal ciclo di vita del patogeno e riguarda la comparsa, lo sviluppo e la diffusione della malattia derivante dall'infezione. Gli eventi principali che caratterizzano il ciclo di malattia sono l'inoculo, la penetrazione, la colonizzazione, la disseminazione e la sopravvivenza del patogeno in assenza di ospiti e/o nei periodi avversi quali l'inverno. Da notare, che in alcune malattie possono verificarsi molteplici cicli d'infezione durante la medesima stagione vegetativa.

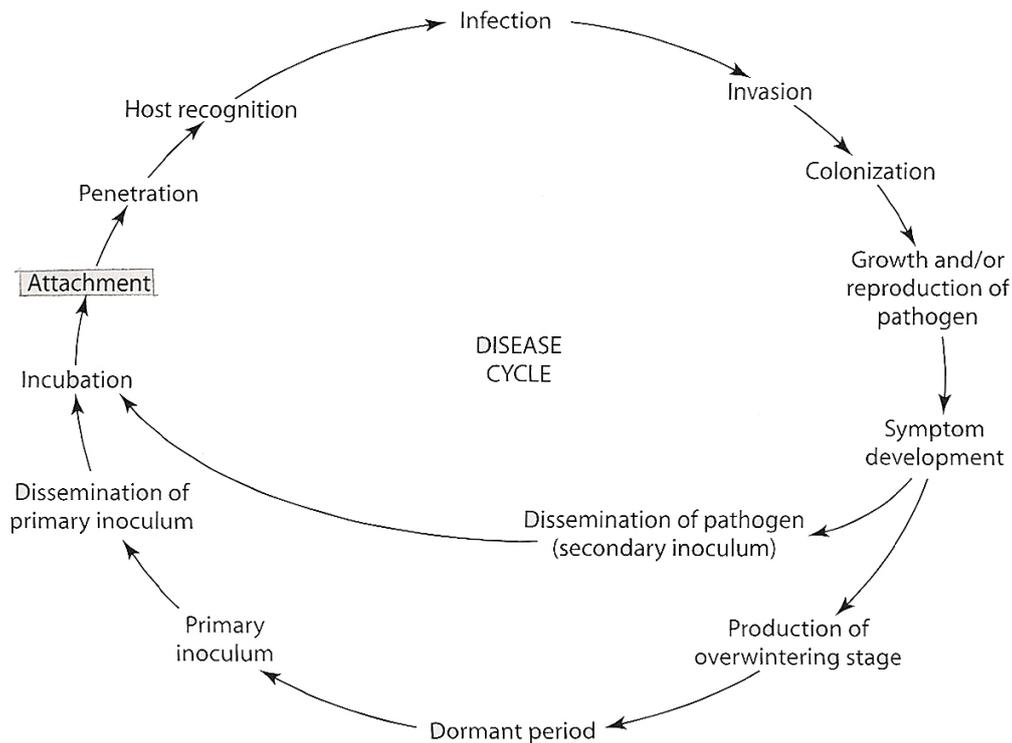


Figura 1. Ciclo di malattia (Agrios G., 1964)

Le relazioni che si instaurano tra pianta ed agente patogeno fin dalla fase di pe-

netrazione sono il risultato della coevoluzione tra i due organismi. Ciascuno dei due organismi opera sull'altro una pressione selettiva portante all'evoluzione di nuovi genotipi dell'ospite più o meno resistenti al patogeno e di nuovi genotipi di quest'ultimo più o meno aggressivi verso l'ospite. Tra questi avrà maggiori possibilità di sopravvivenza quello geneticamente più competitivo.

La fase di riconoscimento risulta determinante nell'evoluzione dell'interazione e condiziona la manifestazione dei sintomi caratteristici di malattia. La pianta può essere resistente a certi patogeni, o perché appartiene ad un gruppo tassonomico esterno al range di ospiti che tali patogeni possono colpire (resistenza non ospite), o perché possiede geni codificanti per caratteri di resistenza capaci di riconoscere specifici fattori di avirulenza codificati da geni patogeni. Questo tipo di resistenza, definita resistenza vera od ospite, si distingue dalla resistenza apparente, la quale è dovuta all'assenza di uno o più fattori fondamentali di malattia (l'ospite suscettibile, il patogeno virulento, le condizioni ambientali favorevoli alla malattia ) (Agrios, 1964). Sono distinguibili due tipi di resistenza ospite: la resistenza quantitativa, poligenica od orizzontale, attiva contro più specie e razze del patogeno e che si esprime come riduzione di malattia, e qualitativa, monogenica o verticale, attiva contro una o poche razze della stessa specie patogena e che si esprime, quando presente, come resistenza totale da parte della pianta.

La resistenza monogenica richiama il concetto fondamentale di interazione "gene x gene" secondo cui l'ospite è resistente se contiene almeno un gene R complementare ad un gene avr del patogeno.

Sia la resistenza ospite, sia quella non ospite sono dipendenti da due categorie di ostacoli definibili come meccanismi costitutivi e meccanismi indotti. Sono meccanismi costitutivi le caratteristiche morfologiche e strutturali dell'ospite (morfologia fogliare, spessore della cuticola, presenza di cere, caratteristiche della parete), sostanze tossiche pre-formate (fitoanticipine), enzimi che degradano fattori di patogenicità (degradazione di tossine prodotte dal patogeno), l'assenza di nutrienti essenziali allo sviluppo del patogeno insediato. Si definiscono, invece, indotti quei meccanismi che si innescano in seguito all'attacco del patogeno e risultano scatenati da elicitori, molecole caratteristiche degli organismi o derivanti dalla degrada-

zione delle strutture dell'ospite, liberate nel corso dell'interazione ed aventi un ruolo chiave nel riconoscimento pianta-ospite. Tali molecole, se provenienti dal patogeno, sono definite PAMP (Pathogen-associated molecular pattern); nel caso dei funghi i PAMP possono essere glucani, chitina, mannani e proteine. I meccanismi indotti necessitano quindi di un evento di riconoscimento che, una volta avvenuto, avvia fenomeni difensivi, come la formazione di papille, la risposta ipersensibile (HR), l'accumulo di specie reattive dell'O<sub>2</sub> (ROS), il rafforzamento della parete cellulare, l'accumulo di fitoalessine e, come ultimo, ma non per importanza, l'accumulo di proteine di patogenesi (PR- proteins). La SAR (resistenza sistemica acquisita), derivante dalla HR, è un terzo tipo di resistenza indotta basata su meccanismi difensivi che conferiscono l'attivazione di uno stato di sensibilizzazione (condizionamento o "priming") dei tessuti della pianta attivo nei confronti di eventuali infezioni secondarie.

L'accumulo delle proteine PR costituisce uno degli elementi fondamentali dei meccanismi di difesa inducibili. Le proteine PR finora descritte sono distinte in 17 famiglie (tabella 1).

Per citare qualche esempio si ricordano taumatine (TLP, thaumatin-like proteins) estratte in ciliegie (Fils-Lycaon et al. 1996), glucanasi, individuate in pomodoro (Gonzalez-Bosh, 1996) e nelle pesche (Hinton- Pressy, 1980) ed infine varie chitinasi, riscontrate in kiwi (McLeod-Poole, 1994) ed in uva (Derckel et al. 1996). Normalmente le PR- proteins e le PR-like sono espresse a bassi livelli nelle cellule di piante sane e non attaccate; vengono accumulate in risposta ad attacchi fungini, ferite od altri stress induttori di resistenza acquisita (Uknes et al. 1992). Da notare è, inoltre, che proteine con azione antiparassitaria possono essere presenti nei tessuti vegetali già prima dell'attacco patogeno; queste proteine, data la somiglianza strutturale con le PR-proteins, sono definite proteine PR-simili (PR-like).

Per quanto riguarda la vite, considerata nel presente lavoro di tesi, la maggior parte delle proteine contenute nel frutto sono classificabili come fattori di risposta della pianta a diverse condizioni di stress e specialmente ad attacchi di tipo parassitario.

FAMIGLIE	PROTEINE
PR1	ruolo sconosciuto, attiva contro Oomiceti
PR2	$\beta$ -1,3 glucanasi
PR3, PR4, PR8, PR11	chitinasi ed endochitinasi
PR5	taumatine (TLP)
PR6	inibitori di proteasi
PR7	endoproteasi
PR9	perossidasi
PR10	ribonucleasi
PR12, PR 13, PR14	difensine, tionine, LTP (lipid transfer protein)
PR15, PR16	ossalato ossidasi, ossalato ossidasi-like
PR17	ruolo sconosciuto, identificata in tabacco

Tabella 1. Classificazione delle PR-proteins (Ferreira R.B. et al., 2007)

Le proteine contenute nell'uva sono per lo più enzimi, complessi proteici indispensabili per la fisiologia della pianta e che assumono ruoli sia positivi che negativi in fase di vinificazione. Infatti le PR-proteins persistono nei processi tecnologici di vinificazione e possono essere causa di torbidità, nonché instabilità del prodotto. Tra le altre proteine rilevate nella vinificazione si ricordano gli enzimi quali ossidoriduttasi (tirosinasi propria dell'uva e laccasi prodotte da funghi, queste ultime con spettro d'azione più ampio delle prime), esterasi, invertasi, galatturonasi, cellulasi ed emicellulasi (Navarre, 1991).

Delle proteine presenti nel succo d'uva (profilo HPLC<sup>1</sup>, figura 2) sono, invece, sintetizzate in maggior quantità due PR- proteins: la chitinasi (CHIT) e la taumatina (TLP, thaumatin-like protein).

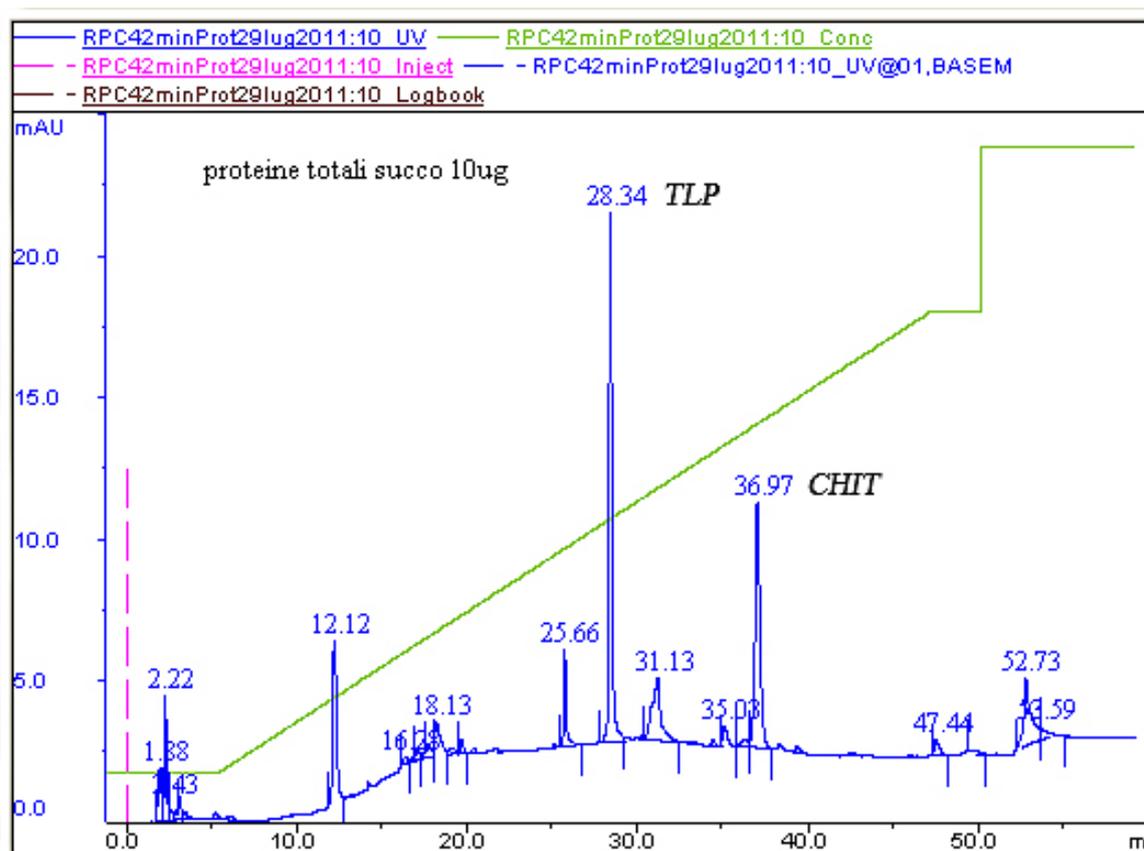


Figura 2. Separazione con HPLC di proteine del succo d' uva della varietà *Incroccio Manzoni*.

## 1.1 Chitinasi

Le chitinasi estraibili da *Vitis vinifera* sono suddivisibili in sei classi in relazione a struttura ed omologia tra le varie isoforme (Flach et al. 1992, Collinge et al. 1993, Robert et al. 2002). La classe I, considerata quella di base, è formata da una regione N-terminale ricca di cisteina, ruolo presumibile della quale è quello di sito attivo per la saldatura con la chitina (chitin-binding motif), una regione variabile centrale ricca di prolina e un'altra regione altamente conservata che rappresenta il dominio catalitico. Esiste poi una regione C- terminale allungata che svolge un ruolo chiave nella localizzazione della proteina nel vacuolo. Alla classe II manca il dominio N-terminale ricco di cisteina mentre la classe IV mostra quattro delezioni nel dominio catalitico. Nonostante questo, le chitinasi di classe IV mantengono un alto livello di omologia con la classe I e come queste sono di tipo extracellulare. Le chitinasi di classe V sono caratterizzate da una duplicazione della regione del dominio N - terminale "chitin-binding motif" (Robert et al. 2002). Le chitinasi di classe

III rappresentano degli enzimi del tutto particolari, in quanto caratterizzati da una struttura diversa da quella delle altre classi appena descritte e sono più paragonabili a chitinasi procariotiche (Watanabe et al. 1993). Sono state individuate 13 differenti isoforme di chitinasi nei tessuti di vite ed oltre il 95% dell'attività totale delle chitinasi contenute nell'uva, risulta attribuibile alle forme acidiche (Derckel et al. 1996). Negli acini maturi, inoltre, circa il 98% dell'attività chitinasica si riscontra nella polpa, il restante 2% nella buccia (Derckel et al. 1998). Le chitinasi della classe IV sono quelle maggiormente espresse negli acini d'uva (tabella 2), i geni che codificano per queste isoforme non sono espressi in foglie e nelle radici della vite, contrariamente a quanto accade per le classi I e III, le quali trovano espressione nelle foglie, ma non negli acini (Robinson et al. 1997). Dalla letteratura a riguardo si evince, inoltre, come il pH ottimale per l'attività chitinasica sia compreso tra 5 e 6 (Bowles, 1990).

ACCESSION	ENTRY NAME	PROTEIN NAME	ORGANISM	LENGHT	ID
O24531	O24531_VITVI	Class IV endochitinase	Vitis vinifera	264 AA	100%
Q7XAU6	Q7XAU6_VITVI	Class IV chitinase	Vitis vinifera	264 AA	97%
B0FZ27	B0FZ27_9ROSI	Class IV chitinase	Vitis pseudo-reticulata	264 AA	97%
O24530	O24530_VITVI	Class IV endochitinase	Vitis vinifera	261 AA	96%
B0FZ26	B0FZ26_9ROSI	Class IV chitinase	Vitis pseudo-reticulata	261 AA	96%

Tabella 2. Alcune chitinasi di *Vitis* identificate con blastp utilizzando la sequenza della chitinasi O24531\_VITVI (Uniprot.org).

Si ritiene che le chitinasi, idrolizzando il principale polisaccaride fibrillare della parete dei funghi, siano implicate nei processi difensivi della pianta dai funghi patogeni. I prodotti di degradazione della chitina vengono liberati e convertiti in chitosano, a seguito di una reazione di deacetilazione. Il chitosano è una molecola che possiede un ruolo chiave nei meccanismi di resistenza; gli viene riconosciuto il ruolo di elicitore: promuove ed incrementa l'attività di lipoxigenasi (LOX, enzima

che ha un ruolo determinante nelle risposte ipersensibili), di fenilalanina ammonioliase (PAL, è tra gli enzimi più importanti che interviene nelle vie metaboliche di sintesi dei metaboliti secondari, specialmente precursori di fitoalessine e acido salicilico), e della chitinasi stessa (Tortel- Aziz et al. 2006).

Oltre al ruolo di meccanismo di difesa, alle chitinasi sono state attribuite anche altre funzioni. Taluni autori, infatti, ritengono che esse potrebbero avere una funzione nello sviluppo somatico dell’embrione (De Jong et al. 1992). L’attività chitinasi- ca è incrementata nelle piante da numerosi fattori, quali lo stato fenologico, la presenza di etilene ed acido salicilico, stress abiotici e ferite (Bowles, 1990, Jacobsen et al. 1992, Reuveni et al. 1993, Collinge et al. 1993). Inoltre, le chitinasi (come avviene anche per le  $\beta$ -1,3-glucanasi) estratte da uva aumentano di attività (espressa in U/mg di tessuto fresco) con la maturazione; sono anche stati osservati aumenti di attività se il materiale vegetativo di partenza, da cui poi si sono estratti gli enzimi, è trattato con una soluzione di 1mM di acido salicilico o se su questo materiale vengono effettuate delle ferite, dette “di stimolazione” (Figura 3) (Derckel et. Al, 1998).

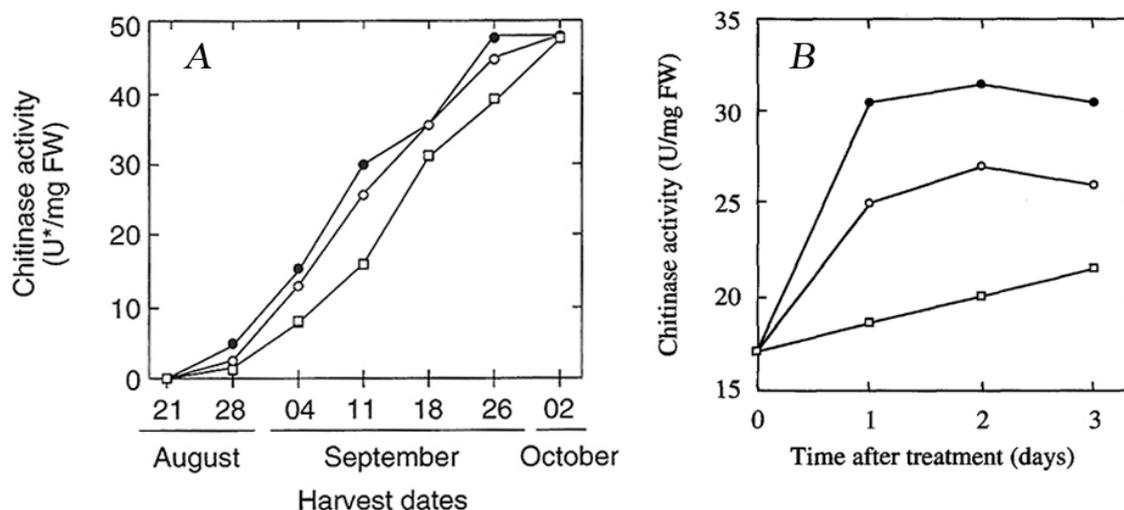


Figura 3. **A** induzione di attività chitinasi (U/mgFW) con ferite e salicilato (SA) in relazione al periodo di maturazione dell’uva della cv. Pinot nero e **B** variazione dell’attività chitinasi (U/mgFW) di proteine estratte da Pinot nero nei giorni successivi al trattamento. Acini feriti (○), acini feriti e trattati con SA (●), controllo (□) (Derckel et. Al, 1998).

Nell'uva le quantità di chitinasi parrebbero aumentare con andamenti di crescita proporzionali a quelli della concentrazione degli zuccheri totali (Salzman et al. 1998). Con il progredire della maturazione del frutto è manifesto pure un cambiamento nell'espressione delle isoforme, con viraggio verso le forme di chitinasi più attive, come ad esempio quelle della classe V (Derckel et al. 1998).

## 1.2 Thaumatin like protein

Le TLP (thaumatin-like-proteins) sono così denominate perché presentano una sequenza amminoacidica simile alla taumatina, molecola proteica contenuta nel frutto africano *Thaumatococcus daniellii*. Fanno parte della famiglia delle PR-proteins dove costituiscono il gruppo delle PR-5. Queste sostanze, come le altre PR-proteins, si accumulano a seguito di stress sia biotici che abiotici od a segnali stimolatori.

In molte specie vegetali, le TLP sono espresse ed accumulate principalmente in fiori e frutti, importanti organi riproduttivi suscettibili in particolar modo alle infezioni provocate da agenti di marciumi appartenenti a generi quali *Botrytis* e *Guignardia* (Clendennen et al. 1997, Sassa et al. 1998). La localizzazione risulta comunque piuttosto complessa, in quanto proteine di questo tipo sono rinvenute associate a granuli di amido contenuti entro plastidi delle cellule, nel floema, nei piccioli, negli steli e nelle giovani foglie (Dafoe et al. 2010). La sintesi di TLP può essere indotta in risposta a ferite causate dalla nutrizione di insetti dotati di apparato boccale masticatore o pungente succhiante (Frendo et al. 1992, Gao et al. 2007). Inoltre, note prevalentemente come inibitori di crescita fungina, le Thaumatin-like proteins hanno come bersaglio la membrana cellulare, rendendola, permeabile e provocandone squilibri osmotici (Batalia et al. 1996); infatti creano pori trans-membrana, meccanismo d'azione per il quale vengono ricordate anche come "permeatine". Molti autori hanno associato ad esse altri meccanismi d'azione come l'idrolisi dei  $\beta$ -1,3-glucani (Grenier et al. 1999) e l'inibizione di xilanasi fungine (Fierens et al. 2007). Le TLP identificate in *Vitis vinifera* sono cinque (tabella 3), tutte tra loro molto simili sia nella sequenza amminoacidica, sia nel numero di amminoacidi, sia nel peso molecolare (21,6-22 kDa).

ACCESSION	ENTRY NAME	PROTEIN NAME	ORGANISM	LENGHT	ID
O04708	O04708_VITVI	VVTL1	Vitis vinifera	222 AA	100%
F6HUH1	F6HUH1_VITVI	Putative uncharacterized protein	Vitis vinifera	222 AA	99%
A9CSP0	A9CSP0_9ROSI	Putative thaumatin-like protein	Vitis hybrid cultivar	222 AA	98%
Q9M4G6	Q9M4G6_VITVI	Putative thaumatin-like protein	Vitis vinifera	222 AA	98%
Q9LLB7	Q9LLB7_VITVI	Thaumatin-like protein	Vitis vinifera	226 AA	91%

Tabella 3. TLP di *Vitis* identificate con blastp utilizzando la sequenza della TLP O04708\_VITVI (Uniprot.org).

Il livello delle TLP aumenta con la crescita e con la maturazione degli acini (Tattersall et al. 1997); da ciò si può dedurre che la loro presenza negli acini subisce un incremento anche all'aumentare della concentrazione di zuccheri, processo caratterizzante la maturazione di un frutto. Da notare, in relazione a quest'ultimo aspetto, che l'incremento di TLP sembra maggiore di quello delle chitinasi (Salzman et al. 1998).

### 1.3 *Guignardia bidwellii*

Originario dell'America, *Guignardia bidwellii* è un fungo ascomicete (lo stadio anamorfo è *Phyllosticta ampellicida*) che ha fatto la sua comparsa in Francia verso la fine del secolo scorso, a seguito dell'importazione di portainnesti di vite resistenti alla fillossera. Diffondendosi, poi, ad altre regioni dell'Europa, ha attaccato numerose specie del genere *Vitis*. Vi è una differente suscettibilità varietale all'infezione anche se sulla vite coltivata provoca generalmente danni anche molto gravi. Di questa può colpire le foglie, i giovani tralci e soprattutto i grappoli. Sui lembi fogliari si ha la comparsa di lesioni evolventisi in macchie di solito rotondeggianti, raggiungenti il diametro di 1 cm od anche più, di tinta bruno-rossastra ed orlate di bruno. Sui giovani tralci erbacei, sui peduncoli fogliari si formano macchie di dimensioni minori e tendenzialmente allungate nel senso dell'asse dell'organo.

L'attacco ai grappoli segue, di norma, quello delle foglie e l'infezione assume la massima frequenza nonché dannosità sulle infruttescenze già ben sviluppate, prossime all'invasatura. Gli acini molto giovani imbruniscono e disseccano rapidamente; quelli già completamente sviluppati presentano dapprima una chiazza livida che si estende progressivamente a tutta la bacca. Nel giro di pochi giorni, il più delle volte l'acino va incontro a completo marciume (accompagnato da rapido disseccamento e conseguente raggrinzamento della buccia in ambiente secco) ed assume una colorazione nera: di qui il nome di marciume nero degli acini (Black rot) dato comunemente alla malattia (figura 5). Sui tessuti delle foglie e degli acini attaccati compaiono abbondanti fruttificazioni agamiche del parassita, sotto forma di minute punteggiature nerastre di vario tipo. Quelle di maggior interesse - in quanto di comparsa normale e responsabili della diffusione della malattia durante tutto il periodo estivo ed anche capaci di sopravvivere fino alla primavera successiva - sono rappresentate dai picnidi (120 - 230  $\mu\text{m}$  di diametro) attribuibili al genere *Phoma* [ *Phoma uvicola* Berk. et Curt. \_ *Phyllosticta uvicola* (Berk. et Curt.) Höhn ], nei quali si formano conidi ialini, unicellulari ovaliformi (circa 8 x 4,5  $\mu\text{m}$ ). Sugli acini, inoltre, il patogeno differenzia degli sclerozi che rimangono sterili fino verso la fine dell'inverno, momento in cui danno luogo alle fruttificazioni ascofore del fungo, le quali raggiungono maturità nella tarda primavera. Tali fruttificazioni, dette periteci, sono rappresentate da corpi ascofori bruni, contenenti aschi clavati (72-84 x 9-10  $\mu\text{m}$ ) con ascospore sub-ialine, unicellulari, irregolarmente ovaliformi.

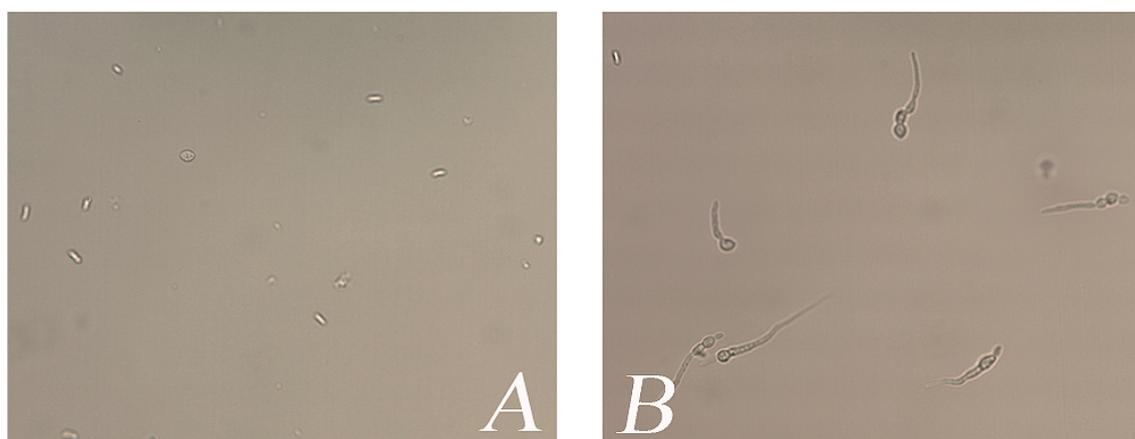


Figura 4. Conidi di *G. bidwellii* (circa 8 x 4,5  $\mu\text{m}$ ) non germinati (A) e germinati (B) ripresi ad ingrandimento 250X durante l'esperimento.

*G. bidwellii* sverna principalmente per mezzo delle fruttificazioni ascofore differenziantisi sugli acini caduti al suolo: in primavera le ascospore danno origine ai primi centri di infezione fogliare, in corrispondenza dei quali si differenziano poi, dopo un periodo di incubazione variante di norma dai 10 ai 20 giorni, le fruttificazioni picnidiche destinate alla successiva diffusione della malattia sui grappoli. Lo sviluppo dell'infezione di *G. bidwellii* è influenzato fondamentalmente dalle condizioni climatiche e può assumere livelli critici in regioni con estati relativamente calde e molto umide. L'insediamento delle singole infezioni richiede, ad una temperatura prossima ai 20°C, un periodo di bagnatura degli organi recettivi di almeno 15-20 ore (Goidanich, 1964). La recettività delle piante all'infezione aumenta a seguito di repentini abbassamenti termici che portino ad un rallentamento dello sviluppo vegetativo, mentre il periodo di incubazione della malattia si accorcia con l'innalzarsi della temperatura.

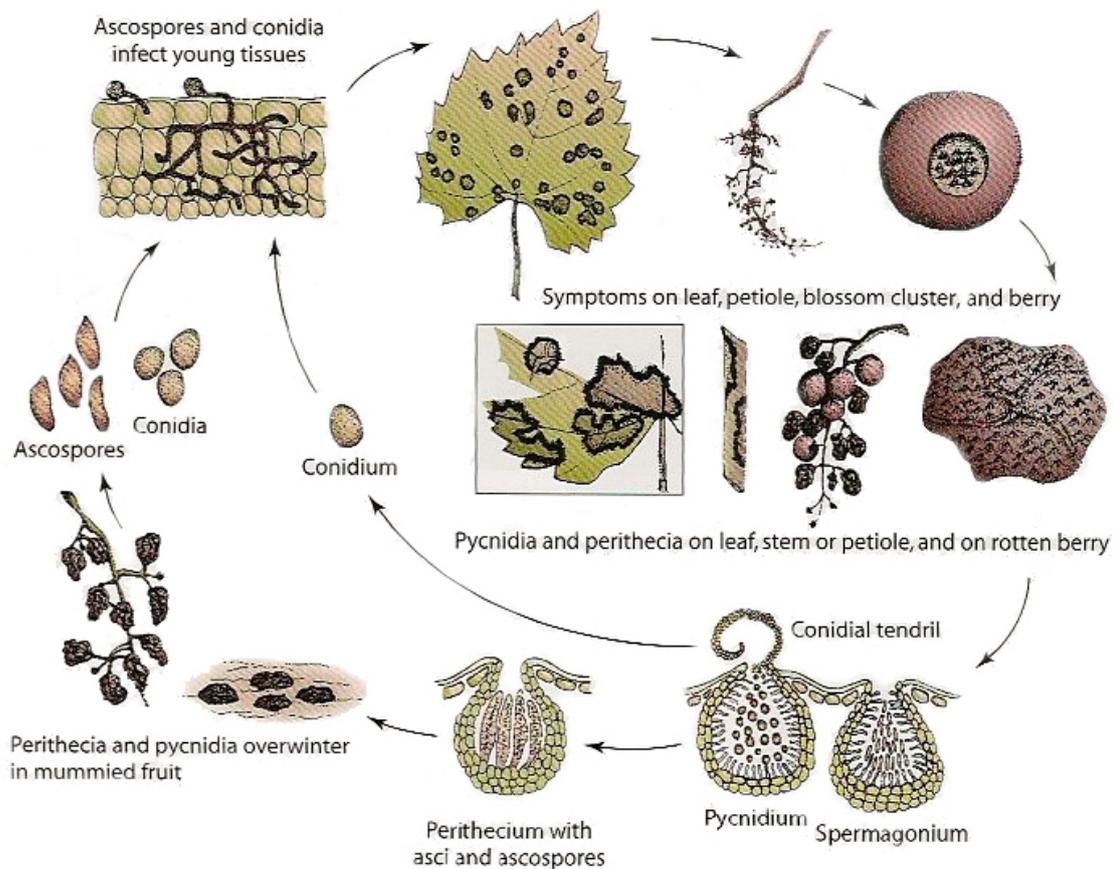


Figura 5. Ciclo di malattia del marciume nero (Black rot) (Agrios G., 1964).

I primi ricercatori osservarono, comunque, che le sole giovani parti epigeiche della piante di vite erano suscettibili alle infezioni da *G. bidwellii* ( Manns, 1928, Reddick, 1911, Scribner et al. 1888). Kuo and Hoch (1996) hanno caratterizzato questa resistenza legata all'età, detta ontogenetica, utilizzando foglie di vite. Essi dimostrarono, infatti, che i conidi erano capaci di infettare le foglie di vite di tutte le età, ma non di colonizzare (i tubetti germinativi mancavano cioè di ife sotto-cuticolari) quelle distanziate sei o più nodi dall'apice del germoglio.

#### 1.4 *Botrytis cinerea*

Il genere *Botrytis* è uno fra i primi descritti nella storia della micologia. Infatti, Micheli già nel 1729 gli attribuiva il sintomo “marciume grigio” riscontrabile sui grappoli d'uva. *Botrytis cinerea* (il cui stadio teleomorfo è *Botrytinia fuckeliana*) appartiene, come *G. bidwellii*, al phylum degli Ascomycota ed è di gran lunga la specie più importante delle ventidue, fino ad ora individuate, appartenenti a questo genere (Hennebert, 1973). Al già citato sintomo del “marciume grigio” o “muffa grigia” si associa spesso il concetto di “muffa nobile”, definibile in tal modo per un incremento di concentrazione di zuccheri solubili (dovuti ad un aumento di traspirazione del grappolo) con modificazione del tenore degli acini organici e dei tannini (miglioratori della qualità del vino), a seguito di lievi attacchi di *B. cinerea*. Il fenomeno è tuttavia da considerarsi del tutto circoscritto ad alcune microaree pedoclimatiche che permettono solo la manifestazione del sintomo di “infezione larvata” (Goidanich, 1964). Il patogeno è un parassita ubiquitario e spiccatamente polifago, data la capacità di alternare periodi di vita saprofitaria ad altri di comportamento parasitario o emiparassitario e la capacità di attaccare più di 200 ospiti (Agrios G., 1964). È caratterizzato da micelio robusto, ialino o leggermente grigio, ramificato, da cui si dipartono lunghi conidiofori scuri con cellula basale globosa, a loro volta ramificati nella regione terminale fino formare cellule conidiogene rigonfiate in ampolle clavate producenti conidi lisci, non settati di dimensioni 11x11-15 µm (figura 6). Il fungo può presentarsi anche sotto forma di sclerozio, di colore nero e di forma irregolare. Su vite i sintomi sono manifesti sulle foglie, sui giovani tralci e sul grappolo, tessuti i quali possono ricoprirsene anche completamente delle fruttificazioni conferenti il classico aspetto di muffa grigia.

L'infezione avviene soprattutto attraverso i conidi, diffusi dal vento e, sebbene idrofobici, necessitanti di acqua libera per germinare. La penetrazione può essere sia attiva che passiva. Quest'ultima è accelerata in presenza di ferite od aperture naturali quali idatoi e stomi; la penetrazione attiva è promossa, invece, dall'attività di due tipi di enzimi: cutinasi e lipasi, i quali nei primi stadi di attacco questi sono tanto importanti che, se inibiti. La penetrazione attiva viene totalmente impedita. *B.cinerea* sverna nel suolo, come micelio o come sclerozio. Residui fiorali senescenti o frutti mummificati rimasti sulla pianta possono costituire importanti sorgenti di infezione e fornire basi nutrizionali per produrre l'infezione (Matta, 1996).

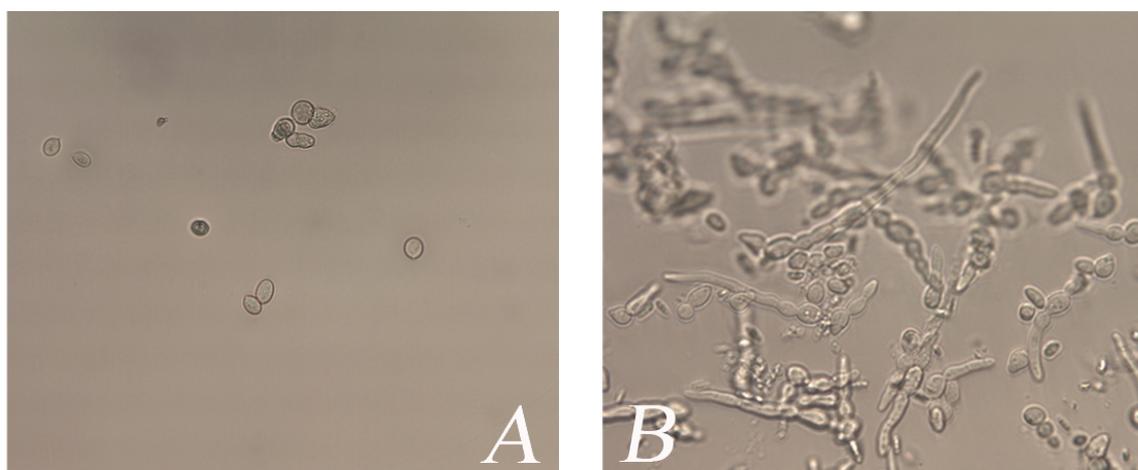


Figura 6. Conidi di *B. cinerea* (circa 11 x 11-15  $\mu\text{m}$ ) non germinati (A) e germinati (B) ripresi ad ingrandimento 400X; notare la tendenza all'aggregazione da parte delle spore germinate.

Lo sviluppo del patogeno (e quindi della malattia) è possibile entro limiti termici molto ampi (5-31 °C). Questa caratteristica fa sì che *B. cinerea* rappresenti un problema non solo in campo ma anche in fase di post-raccolta. Sembra probabile che il fungo inizi ad infettare in campo solo quando si verificano condizioni climatiche che prevedono 15 ore di bagnatura e una temperatura media di 15°C (regola dei 15/15). Importanti, infine, gli effetti del patogeno sulla qualità dei mosti e dei vini; in particolare *B.cinerea*, a causa dell'azione delle laccasi (enzimi appartenenti alla classe delle ossidoreduttasi), accentua il fenomeno della "casse ossidasica"<sup>2</sup>.

## 1.5 *Fusarium graminearum*

*Fusarium graminearum*, conosciuto anche e soprattutto con il nome del suo stadio teleomorfo *Gibberella zeae*, è un fungo fitopatogeno che causa la cosiddetta “fusariosi della spiga” del grano (head blight), malattia devastante su frumento ed orzo.

L'infezione provoca cambiamenti nella composizione proteica del grano e determina l'atrofizzazione delle cariossidi e la loro contaminazione con micotossine, soprattutto deossinivalenolo<sup>3</sup> (DON) e zearalenone<sup>4</sup>. Nonostante i grandi sforzi attuati per trovare geni di resistenza contro questo patogeno, non sono attualmente disponibili varietà completamente resistenti. Il fungo è un ascomicete aploide ootetralico. I corpi fruttiferi, chiamati periteci, si sviluppano sul micelio producono ascospore, le quali giungendo su parti sensibili della pianta ospite ivi germinano. L'inoculo primario è rappresentato dalle ascospore (figura 7). Le spore sono forzatamente espulse e possono germinare entro sei ore dal contatto con la superficie della pianta ospite. La malattia è monociclica, infatti, dopo un ciclo di infezione originato da ascospore sessuali, il fungo produce macroconidi per mezzo di una riproduzione asessuata. Queste strutture svernano nel terreno o nei residui vegetali in campo e danno origine al micelio nella successiva stagione primaverile.

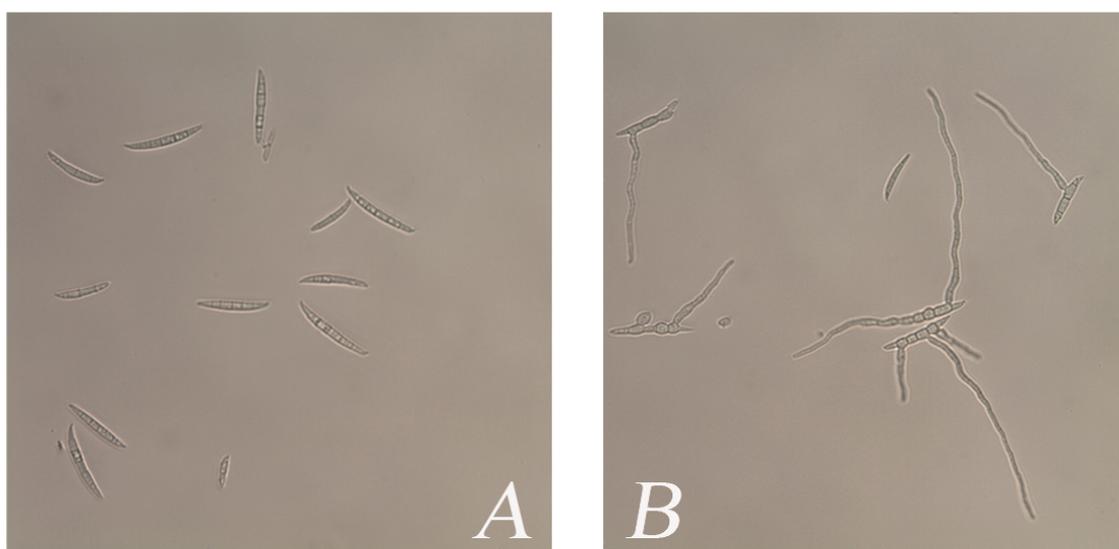


Figura 7. Ascospore di *F. graminearum* non germinate (A) e germinate (B) riprese ad ingrandimento 400X durante l'esperimento.

*Fusarium graminearum* infetta le spighe di grano, a partire dall'antesi per tutta la durata della fase di riempimento della cariosside, entrando nella pianta principalmente attraverso i fiori; il processo di infezione risulta comunque complesso ed il decorso completo della colonizzazione non è ancora stato descritto. I tubetti germinativi sembrano non essere in grado di penetrare la superficie dura e cerosa del lemma e della palea che proteggono il fiore, pertanto, *F. graminearum* entra nella pianta attraverso aperture naturali (stomi ad esempio) e necessita di tessuti molli quali i fiori, le antere e gli embrioni per infettare la pianta. Con condizioni ambientali favorevoli, il fungo può in breve tempo, partendo dal singolo fiore infetto, crescere attraverso il rachide e causare gravi danni all'intera infiorescenza. Al momento della germinazione delle spore sulle antere e sulla superficie del seme in via di sviluppo, le ife penetrano l'epicarpo e si diffondono attraverso lo strato aleuronico. Successivamente, l'intero endosperma e l'embrione sono colonizzati ed uccisi.

---

<sup>1</sup> *Cromatografia liquida ad alta pressione (High Pressure Liquid Chromatography)*; si tratta di una tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente, sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa.

<sup>2</sup> *La casse*, termine francese per rottura, indica un'alterazione nell'aspetto di un vino consistente in perdita di omogeneità (rottura) del colore e formazione di torbidità; è prodotta dall'ossidazione di composti ad opera di enzimi ossidasici, quali laccasi, in presenza di ossigeno. Provoca un imbrunimento del vino, formazione di iridescenza superficiale, alterazione del sapore con maderizzazione (gusto marsalato).

<sup>3</sup> Il deossivalenolo (o DON o vomitossina) è una micotossina appartenente al gruppo dei tricoteceni prodotta da alcune specie di *Fusarium*. Una delle micotossine più diffuse negli alimenti e nei mangimi. Causa nausea, gastroenteriti, malfunzionamento del sistema ematopoietico.

<sup>4</sup> Zearalenone (o ZEA), conosciuta anche come RAL e F-2, è una micotossina ad attività estrogenica non steroidea. Il nome deriva da *Gibberella zeae*, il primo organismo produttore studiato.



## 2. SCOPO

Il grappolo d'uva in fase di maturazione è caratterizzato da molteplici processi tra i quali risultano importanti gli incrementi di zuccheri e della concentrazione delle PR-proteins. Tra queste le più abbondanti sono, come visto, le chitinasi e le thaumatin-like proteins, molecole cui è attribuito da tempo un ruolo attivo nella difesa della pianta nei confronti dei patogeni fungini. Dalla letteratura si evince come con il progredire della maturazione l'acino, nonostante l'accumulo di PR-proteins, divenga maggiormente suscettibile ad attacchi di *B. cinerea*, e nel contempo acquisisce una crescente resistenza a *G. bidwellii*.

Per capire se la resistenza ontogenetica di vite a *G. bidwellii* può essere correlata alla maggiore suscettibilità di questo fungo all'azione di proteine PR, nel presente lavoro sono stati effettuati saggi di attività con due delle principali proteine PR dell'uva, chitinasi e Thaumatin like protein, verso *G. bidwellii*. In particolare è stato analizzato l'effetto di queste proteine sulla germinazione delle spore. Inoltre, poiché i geni codificanti per chitinasi e TLP di piante vengono utilizzati per aumentare la resistenza ai funghi patogeni (Sanghyun et al. 2008, Bliffeld et al. 1999), sono state condotte prove su un patogeno che non attacca la vite, quale è *F. graminearum*, al fine di evidenziare eventuali effetti delle proteine in esame anche su organismi non ospiti della pianta.



### 3. EFFETTO DI CHITINASI E TAUMATINA UVA SULLA GERMINABILITÀ DI SPORE FUNGINE

#### 3.1 Materiali e metodi

##### 3.1.1 Le proteine

Nel presente lavoro di tesi sono state impiegate proteine, purificate da uve della cultivar “Incrocio Manzoni” 6.0.13, gentilmente fornite dal dott. Simone Vincenzi del CIRVE. In particolare, la chitinasi usata per le prove è identificata come O24531\_VITIVI (Classe IV endochitinasi di *Vitis Vinifera*) e codificata dal gene VvChi4B. Sequenza amminoacidica, informazioni su lunghezza di questa e peso molecolare della proteina sono riportate in figura 8.

#### Sequences

Sequence	Length	Mass (Da)	Tools
<input type="checkbox"/> O24531 [UniParc]. <a href="#">FASTA</a> Last modified January 1, 1998. Version 1. Checksum: D4BFB917105E7207	264	27,537	Blast <input type="button" value="go"/>

10	20	30	40	50	60
MAAKLLTVLL	VGALFGAAVA	QNCGCASGLC	CSKYGYRGTG	SDYCGDGCQS	GPCDSGSGSG
70	80	90	100	110	120
SSVSDIVTQA	FFDGIINQAA	SSCAGKNFYT	RAAFLSALNS	YSGFGNDGST	DANKREIAAF
130	140	150	160	170	180
FAHVTHETGH	FCYIEEINGA	SHNYCDSSNT	QYPCVSGQNY	YGRGPLQLTW	NYNYGAAGNS
190	200	210	220	230	240
IGFNGLSNPG	IVATDVVTSF	KTALWFWMNN	VHSVLSQGFG	ATIQAINGAV	ECNGGNTAAV
250	260				
NARVQYYKDY	CSQLGVSPGD	NLTC			

[« Hide](#)

Figura 8. Sequenza amminoacidica di chitinasi O24531\_VITIVI (Uniprot.org).

La TLP usata per le prove è identificata con il codice O04708\_VITIVI (VVTL1 di *Vitis vinifera*), ed il gene di riferimento è situato nel cromosoma 2 (NC\_012008.2); la sequenza amminoacidica ed altre informazioni sono riportate in figura 9.

## Sequences

Sequence	Length	Mass (Da)	Tools
<input type="checkbox"/> O04708 [UniParc]. Last modified July 1, 1997. Version 1. Checksum: 3DCAEBCF7C4BA877	FASTA	222	23,969
<pre> 10      20      30      40      50      60 MRFTTLPIL IPLLSSLLFT STHAATFDIL NKCTYTVWAA ASPGGGRRLD SGQSWTITVN 70      80      90      100     110     120 PGTTNARIWG RTSCTFDANG RGK CETGDCN  GLEECQGYGS PPNTLAEFAL NQPNNLDYID 130     140     150     160     170     180 ISLVDGFNIP MDFSGCRGIQ CSVDINGQCP SELKAPGGCN NPCTVFKTNE YCCTDGP GSC 190     200     210     220 GPTTYSKFFK DRCPDAYSYP QDDKTSLFTC PSGTNYKVTF CP </pre>			
<a href="#">« Hide</a>			

Figura 9. Sequenza amminoacidica di Thaumatin-like protein O04708\_VITIVI (Uniprot.org).

Di ciascuna delle due proteine sono state preparate soluzioni in acqua deionizzata sterile alla concentrazione di 2 mg/ml.

### 3.1.2 Materiale biologico e preparazione spore

I due funghi ospiti di vite sono stati fatti crescere su piastre con PDA (potato dextrose agar) con fotoperiodo naturale fino al riempimento della superficie della piastra. Si sono effettuati, inoltre, dei passaggi su uva inoculata con il ceppo impiegato per mantenerne la virulenza. Per la raccolta delle spore di *F. graminearum* le piastre contenenti evidenti fruttificazioni sono state lavate delicatamente con acqua sterile, la sospensione, quindi, filtrata con garza sterile in modo da eliminare i filamenti di micelio. Per *G. bidwellii*, data l'ampia produzione di picnidi, contenenti ciascuno milioni di conidiospore, si è seguito un procedimento diverso che prevedeva il distacco dei picnidi con ansa sterile, la sospensione in acqua sterile e, in seguito a vigorosa agitazione con vortex, il filtraggio con garza sterile.

La concentrazione di spore delle sospensioni così ottenute sono state determinate

al microscopio ottico con l'ausilio di una cella di Thoma-Zeiss. Per le prove, le spore sono poste introdotte in una soluzione salina CZAPEK Dox modificata (tabella 4), preparata a concentrazione doppia (2x).

ELEMENTI	CZ (1X), 1L	CZ (2X), 100mL
NaNO <sub>3</sub>	4 g	0,4 g
KCl	0,5 g	0,1 g
MgGlicerofosfato	0,5 g	0,1 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,35 g	0,07 g
FeSO <sub>4</sub> 1%	0,01 g	0,002 g
ZnSO <sub>4</sub> 1% + CuSO <sub>4</sub> 0,5%	1 mL	0,2 mL
Glucosio	20 g	4 g

Tabella 4. Composizione della soluzione salina; CZAPEK Modificato (Dhingra et Sinclair, 1995).

Rispetto al mezzo classico è stato usato MgGlicerofosfato e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in sostituzione rispettivamente di MgSO<sub>4</sub> e K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, al fine di ridurre il fenomeno di precipitazione in soluzione dei sali, e glucosio al 22%. Infine la soluzione è stata portata a pH 3,5 con acido tartarico 1M; il primo è valore di pH che si riscontra nell'acino d'uva, il secondo è un acido normalmente contenuto nello stesso.

### 3.1.3 Saggio biologico

Il saggio biologico consisteva nel determinare l'effetto di CHIT e di TLP sulla germinabilità delle spore. Oltre al controllo non trattato (tesi I), sono stati posti a confronto due diversi livelli di CHIT e TLP (100 e 200 µg/mL), somministrati separatamente ed in combinazione tra loro (100+100 e 200+200 µg/mL) nel mezzo colturale descritto nel paragrafo precedente (tabella 4).

Le prove di germinazione sono state ripetute tre volte utilizzando piastre a pozzetti per test E.L.I.S.A; ciascun pozzetto conteneva un in totale 200 µL di sospensione conidiale (tabella 5). Le piastre sono state mantenute ad una temperatura di 25°C, al buio.

TESI	PROTEINE	SPORE DI		CZ (2X)	VOLUME
		G	F		
I	-----	$7,5 \cdot 10^5 / \text{mL}$	$4 \cdot 10^5 / \text{mL}$	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
II	CHIT 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$7,5 \cdot 10^5 / \text{mL}$	$4 \cdot 10^5 / \text{mL}$	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
III	TLP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$7,5 \cdot 10^5 / \text{mL}$	$4 \cdot 10^5 / \text{mL}$	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
IV	CHIT 100 + TLP 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$7,5 \cdot 10^5 / \text{mL}$	$4 \cdot 10^5 / \text{mL}$	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
V	CHIT 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$7,5 \cdot 10^5 / \text{mL}$	$4 \cdot 10^5 / \text{mL}$	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
VI	TLP 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$7,5 \cdot 10^5 / \text{mL}$	$4 \cdot 10^5 / \text{mL}$	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
VII	CHIT 200 + TLP 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$7,5 \cdot 10^5 / \text{mL}$	$4 \cdot 10^5 / \text{mL}$	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$

Tabella 5. Componenti e quantitativi di essi nelle sette tesi realizzate per ciascuna delle tre prove; (G) *Guignardia bidwellii* e (F) *Fusarium graminearum*.

La germinabilità è stata determinata al microscopio dopo 13, 15 e 19 ore per *G. bidwellii* e dopo 8, 10, 12 ore per *F. graminearum*, avendo i funghi tempi diversi di germinazione. Per ogni fungo sono stati contati diversi campi ottici a 250 ingrandimenti per un totale di 60 -100 spore ciascun pozzetto (tesi).

## 3.2 Risultati

### 3.2.1 Germinabilità di *G. bidwellii*

I valori di germinabilità sono stati determinati dopo 13, 15 e 19 ore.

In figura 10 sono riportati i dati relativi alla germinabilità rilevati a 13 ore dall'inizio dell'esperimento. Questi hanno evidenziato una germinabilità media del controllo non trattato del  $71,38 \pm 4,5\%$ (SD) ed una spiccata capacità di inibizione da parte di entrambe le proteine PR già al dosaggio più basso (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Sia per chitina- si che per TLP l'inibizione aumenta leggermente raddoppiando il dosaggio (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

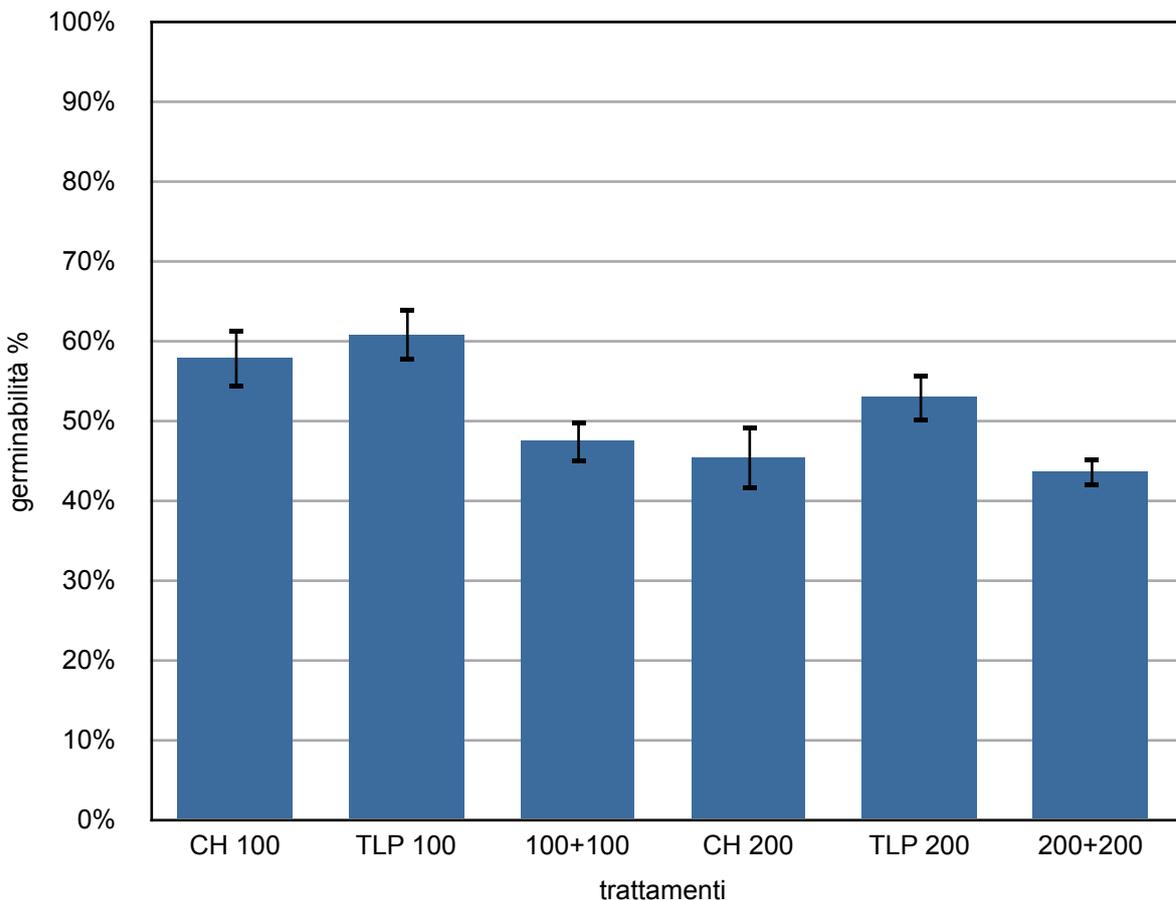


Figura 10. Effetto di chitinasi (CH) e thaumatin-like protein (TLP) a diverse concentrazioni (100 e 200  $\mu\text{g/ml}$  singole e combinate) sulla germinabilità di spore di *G. bidwelli*; i valori di germinabilità sono stati determinati dopo 13 ore dall'inizio del trattamento ed espressi in % rispetto al controllo non trattato (100%)  $\pm$  SD.

Come si può evincere dalla figura 10, l'inibizione di germinabilità più alta ( $57,77 \pm 2,84\%$  rispetto al controllo) è stata osservata nella tesi caratterizzata dalla combinazione CH e TLP alle concentrazioni di 200  $\mu\text{g/ml}$ . Inoltre, a parità di concentrazione, mediamente si è osservato che la chitinasi inibisce maggiormente la germinazione rispetto alla TLP.

Oltre le 13 ore dall'inizio dell'esperimento, si è osservata una diminuzione dell'effetto inibitorio delle due proteine. Dopo 15 e 19 ore, infatti, mentre nel controllo non trattato le germinabilità si manteneva su valori prossimi al 71%, le tesi trattate mostravano tutte valori crescenti di germinabilità delle spore, più evidenti però alla concentrazione minore (figura 11). Oltre le 19 ore i campioni di tutte le tesi erano caratterizzati da un accrescimento del micelio tale da provocare affastellamento, condizione che ha impedito ulteriori osservazioni sufficientemente accurate da poter essere oggetto di studio.

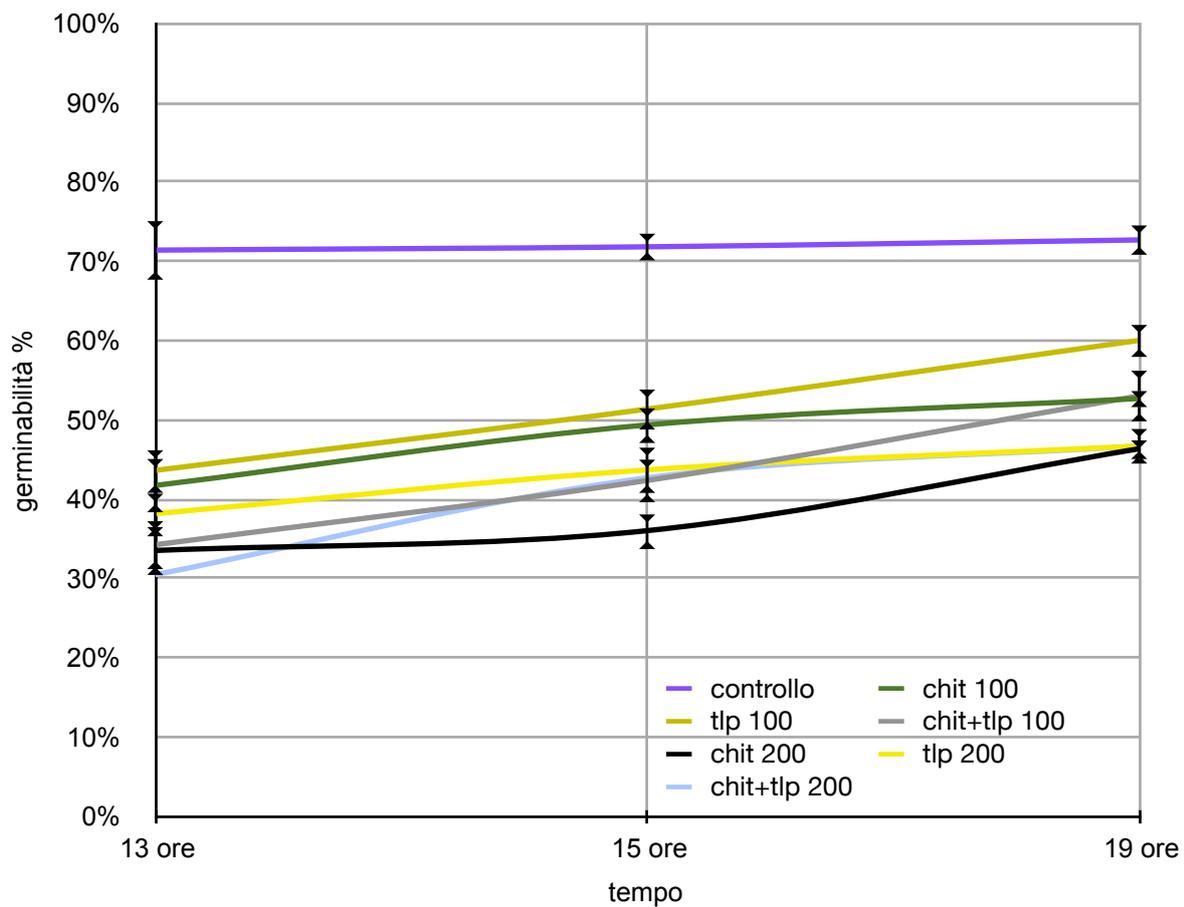


Figura 11. Andamento nel tempo della germinabilità di spore di *G. bidwellii* e relativa alle sette tesi analizzate.

Osservando i pozzetti con ingrandimento 100X dopo 72 ore l'inizio dell'esperimento è stato riscontrato anche un rallentamento nello sviluppo della colonia; tale effetto è evidente soprattutto nelle tese trattate con chitinasi (figura 12).

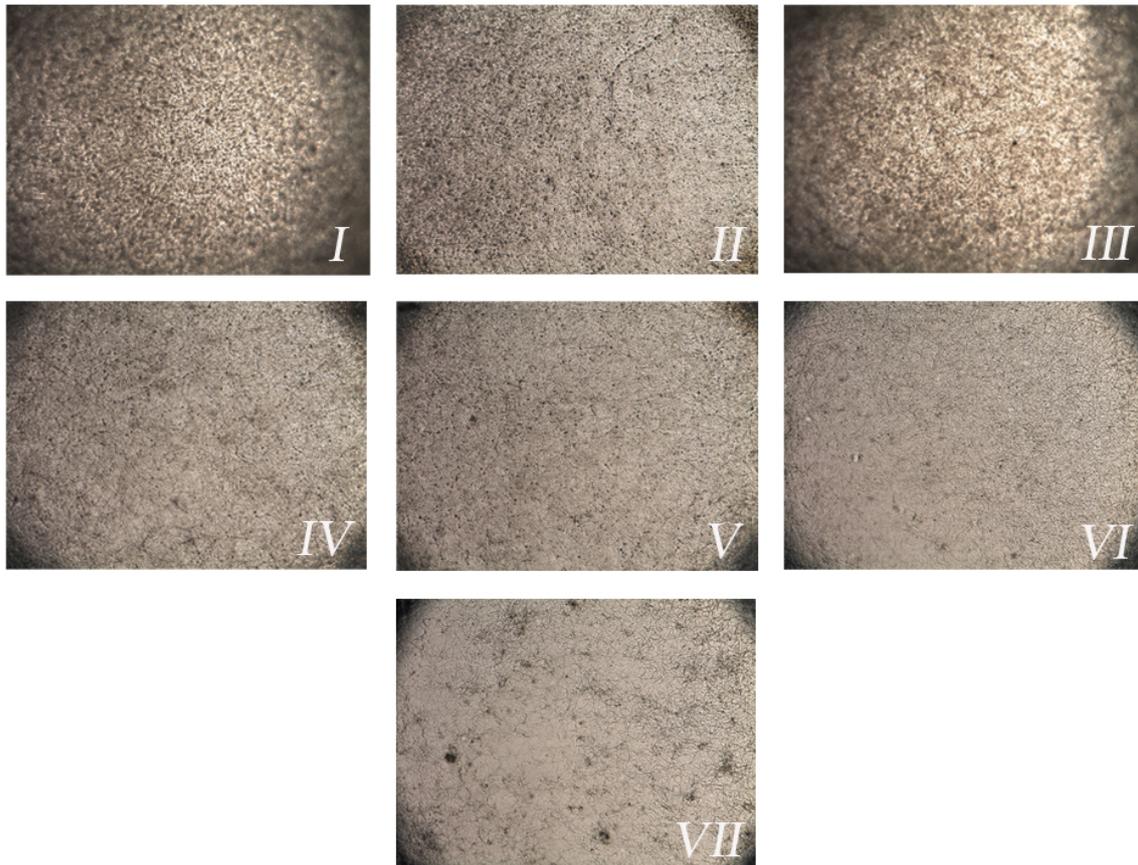


Figura 12. Colonie di *G. bidwellii* dopo 72 ore dall'inizio del trattamento; le immagini sono state acquisite con microscopio ottico ad ingrandimento 100X: (I) controllo, (II) CHIT 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (III) TLP 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (IV) CHIT +TLP 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (V) CHIT 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (VI) TLP 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (VII) CHIT+TLP 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 3.2.2 Germinabilità di *F. graminearum*

I valori di germinabilità sono stati determinati dopo 7, 9 e 13 ore.

In figura 13 sono riportati i dati relativi alla germinabilità rilevati a 7 ore dall'inizio dell'esperimento. Nel controllo non trattato la germinabilità media è stata del  $43,15 \pm 1,23\%$ . I più alti livelli di inibizione, circa 50%, sono stati osservati con la chitinasi soprattutto alla dose più elevata (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); modesto è stato, invece, l'effetto della TLP, con una riduzione di germinabilità del 15-20%, senza differenze significative tra le due dosi utilizzate (TLP 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Le tesi con combinazione di chitinasi e TLP mostrano valori non molto dissimili da quelli osservati nelle tesi trattate con la sola chitinasi.

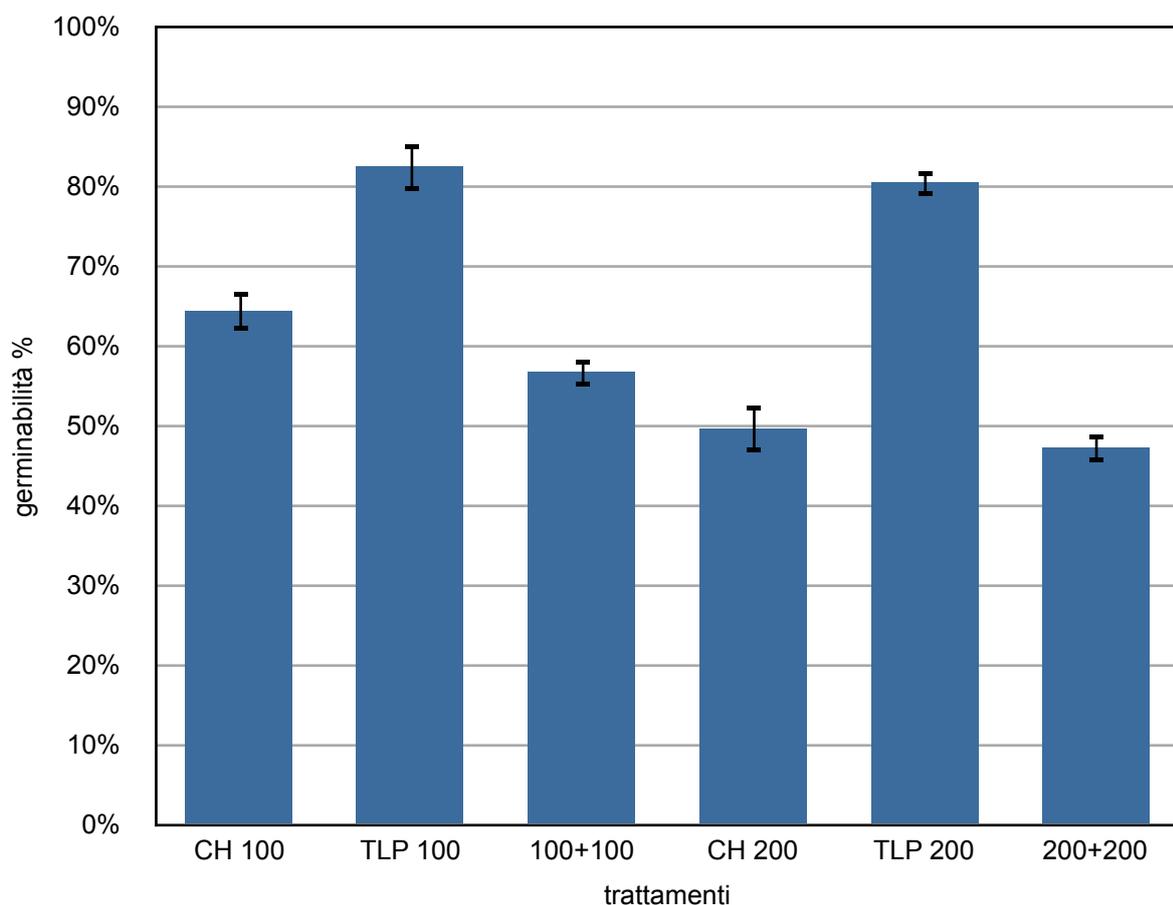


Figura 13. Effetto di chitinasi (CH) e thaumatin-like protein (TLP) a diverse concentrazioni (100 e 200  $\mu\text{g/ml}$  singole e combinate) sulla germinabilità di spore di *F. graminearum*; i valori di germinabilità sono stati determinati dopo 7 ore dall'inizio del trattamento ed espressi in % rispetto al controllo non trattato (100%)  $\pm$  SD..

Negli esperimenti in cui la germinabilità è stata monitorata oltre le 7 ore, si è osservata una diminuzione dell'effetto inibitorio delle due proteine. Dopo 9 e 13 ore, infatti, oltre al controllo non trattato, le germinabilità delle tesi trattate mostravano valori crescenti (figura 14). Oltre le 13 ore, poi, i campioni di tutte le tesi erano caratterizzati da un accrescimento del micelio tale da provocare affastellamento, condizione che ha impedito, come osservato anche per *G.bidwellii*, ulteriori determinazioni di germinabilità. Si vede, inoltre, come, pur decrescendo gli effetti delle due proteine PR, passando dalle 7 alle 9 ed alle 13 ore si mantenga evidente le differenze tra le tesi.

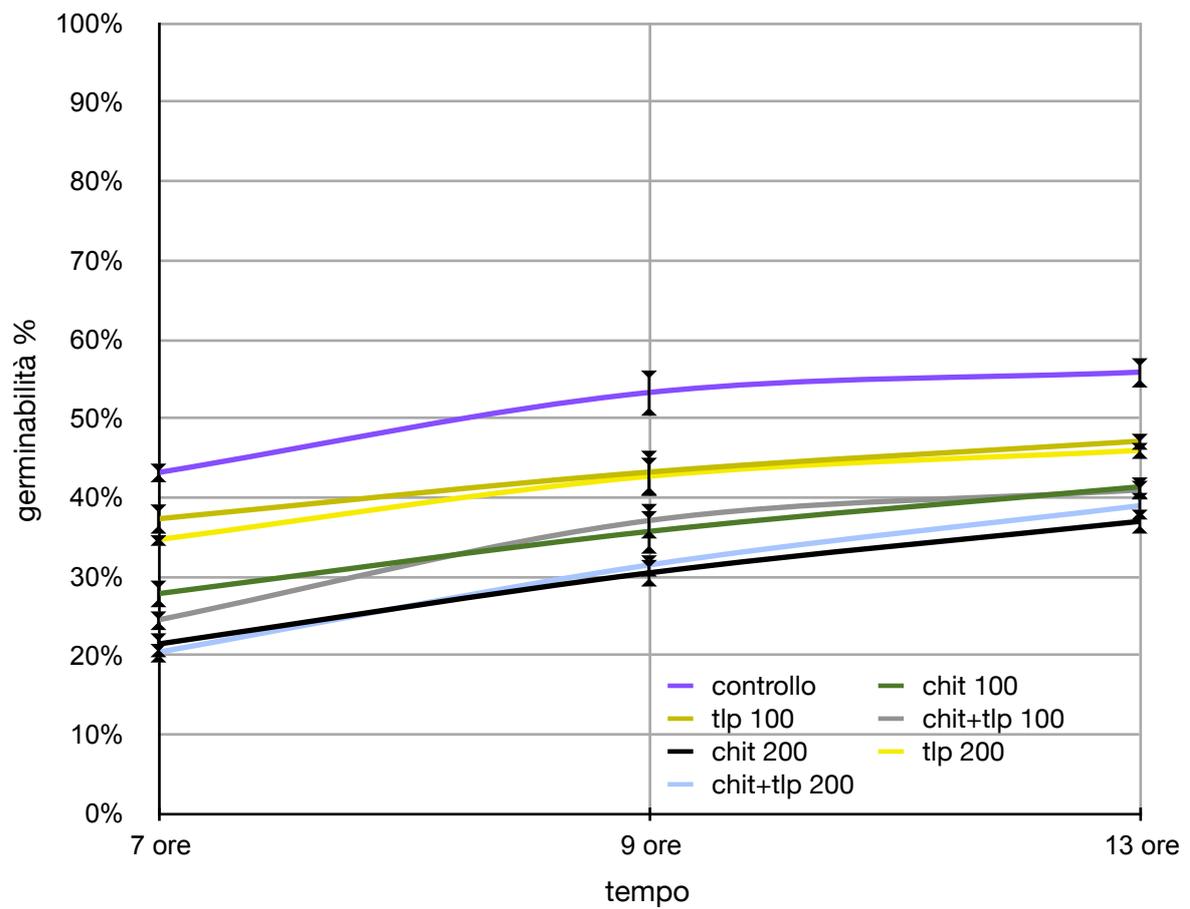


Figura 14. Andamento nel tempo della germinabilità di spore di *F. graminearum* relativa alle sette tesi analizzate.



## 4. DISCUSSIONE

L' uva in fase di maturazione è caratterizzata da molteplici processi quali l'incremento di zuccheri e di PR-proteins. Tra quest'ultime le più abbondanti sono, come visto, le chitinasi e le thaumatin-like proteins. Con il progredire della maturazione l'acino acquisisce una crescente resistenza a *G.bidwellii*, agente patogeno che causa il marciume nero di vite. Per accertare se i livelli crescenti di proteine PR presenti nell'uva nel corso della maturazione possono spiegare la maggiore resistenza al marciume nero, nel presente lavoro è stata studiata la capacità di una chitinasi e di una TLP di vite di inibire la germinazione delle spore di *G. bidwellii*.

Nelle prove è stato riscontrato che, a parità di concentrazione proteica, la chitinasi inibisce maggiormente la germinazione rispetto alla TLP, soprattutto alla concentrazione più elevata (200 µg/mL). La presenza simultanea delle due proteine nel mezzo colturale indica un leggero aumento dell'inibizione della germinazione solo con la dose minore delle due proteine.

In precedenza, l'effetto di queste era stato determinato nei confronti di *B. cinerea*, agente della muffa grigia di vite (Marcato 2011). Rispetto a *G. bidwellii*, *B. cinerea* manifesta minor suscettibilità a chitinasi e TLP alle dosi più basse impiegate (100 µg/mL), mentre alle dosi maggiori mostra valori di inibizione della germinabilità simili a quelli osservati per *G. bidwellii*. Differenze marcate tra i due funghi emergono dall'analisi dell'andamento nel tempo della germinabilità. Infatti, l'inibizione di germinazione in *B. cinerea* è un evento transitorio, in quanto, passando da 8 a 10 e 12 ore, le spore di questo fungo raggiungono valori di germinabilità pressoché simili a quelli del controllo non trattato. Invece, in *G. Bidwellii* l'inibizione della germinazione sembra più durevole. Da notare che l'effetto delle PR proteins nei confronti di *G. bidwellii* si manifesta anche come un rallentamento nello sviluppo del micelio. La maggior sensibilità di *G. bidwellii* alle proteine PR può contribuire a spiegare quanto riportato da alcuni autori, i quali hanno osservato che l'uva prossima a maturazione, contenente elevate quantità di proteine PR e di zuccheri (Derckel et al. 1998), allunga il periodo di incubazione necessario allo sviluppo del

fungo (Hoffman et al. 2002). A quest'ultimo aspetto può, a sua volta, essere ricondotta la maggior resistenza dell'uva matura verso *G. bidwellii*. La capacità di *B. cinerea* di tollerare alti livelli di PR-proteins concorda, invece, con quanto osservato circa la crescente suscettibilità al patogeno dell'acino in maturazione, malgrado l'accumulo di chitinasi e TLP. È presumibile che la capacità di *B. cinerea* di tollerare l'effetto delle proteine PR, sia dovuta ai polisaccaridi sintetizzati dal fungo e secreti esternamente per proteggere la parete dall'azione degli enzimi degradativi dell'ospite (Nitoda et al. 2003, Saguez et al. 2008).

L'espressione di geni eterologhi è spesso effettuata per ottenere piante resistenti alle malattie. Al fine di comprendere se le chitinasi e le TLP di vite possono essere utilmente impiegate per contrastare anche organismi patogeni non ospiti di questa pianta, sono stati condotti esperimenti di inibizione contro *F. graminearum*, agente di fusariosi su frumento ed orzo. In letteratura è descritta l'azione inibitoria di chitinasi contro il fungo *F. graminearum*. L'efficacia di una chitinasi contro questo patogeno è stata osservata in piante di frumento trasformate con un gene d'orzo codificante una chitinasi di classe II (Sanghyun et al. 2008). Le piante trasformate presentavano una riduzione dei sintomi da fusariosi ed i semi avevano un minor contenuto di DON. I più alti livelli di inibizione contro *F. graminearum* sono stati osservati con la chitinasi, soprattutto alla dose più elevata (200 µg/mL); modesto è stato, invece, l'effetto della TLP, senza differenze significative tra le due dosi utilizzate (100 e 200 µg/mL). Le tesi con chitinasi e TLP insieme mostrano valori non molto dissimili da quelli osservati nelle tesi trattate con la sola chitinasi. Rispetto a quanto osservato per *G. bidwellii* e *B. cinerea*, sembra, quindi, che la TLP di vite sia poco efficace contro *F. graminearum*.

Va considerato, infine, che tutte le prove sono state eseguite in presenza di elevate concentrazioni di glucosio. Elevati livelli di glucosio sono necessari per potenziare l'effetto di chitinasi e TLP nei confronti di *B. cinerea* e *G. bidwellii* (Salzman et al. 1998). Rimane da verificare se alte concentrazioni di glucosio possono modificare anche la risposta di *F. graminearum* alle proteine PR.

Cocludendo, i risultati ottenuti evidenziano una diversa capacità di chitinasi e TLP di vite nell'inibire la germinazione delle spore fungine. In generale la prima è più efficace rispetto alla seconda. Sono evidenti anche differenze di suscettibilità tra i

tre funghi alla chitinasi con la dose più bassa utilizzata (100 µg/mL); alla dose di 200 µg/mL, invece, la germinabilità dei funghi considerati è comparabile e circa del 40% rispetto al controllo non trattato. Dati i livelli non particolarmente elevati di contenimento dello sviluppo dei patogeni, sarebbe auspicabile identificare proteine PR da altre piante con superiore attività biologica da utilizzare in progetti di lotta e miglioramento genetico contro specifici funghi fitopatogeni.



## BIBLIOGRAFIA

- Agrios G.N. 1964. Plant Pathology – Fifth edition (2005). University of Florida. ELSEVIER Academic Press.
- Batalia M.A., Monzingo AF, Ernst S, Roberts W, Robertus JD. 1996. The crystal structure of the antifungal protin zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. Nat. Struct. Biol. 3: 19-23.
- Bliffeld M., Mundy J., Potrykus I., Fuktterer J. 1999. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease
- Bowles D.J. 1990. Defence-related proteins in higher plants. Annual Review of Biochem. 59: 873-907.
- Cappellini R.A, Petterson J.L. 1965. Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. Mycologia. 57: 962-966.
- Collinge D.B., Kargh K.M., Mikkelsen J.D., Rasmussen U. and Vad K. 1993. Plant chitinase. Plant j. 3: 31-40.
- Dafoe J.N., Gowen B., Constabel P. 2010. Thaumatin-like proteins are differentially expressed and localized in phloem tissues of hybrid poplar. BMC Plant Biol. 2010; 10: 191. Published online.
- Derckel J.P., Audran J., Haye B., Lambert B., Legendre L. 1998. Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and  $\alpha$  1,3-glucanases of ripening grape berries. Phsylogia Plant. 104:56-64.
- Derckel J.P., Legendre L., Audran J.C., Haye B., Lambret B. 1996. Chitinase of the grapevine. Five isoforms induced in leaves by salicylic acid are consitutively expressed in other tissute. Plant Sci. 119: 31-37.
- De Jong A.J., Cordewener J., Schiavo F.L., Terzi M., Vandekerckhove J., Van Kammen A., De Vries S.C. 1992. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. Plant cell. 4: 425-433.

- Dhingra OD., Sinclair JB. 1995. Basic Plant pathology Methods. CRC Lewis Publishers: Boca Raton, Florida.
- Flach J., Pilet P.E., Jolles P. 1992. What's new in chitinase research? *Experientia* 48: 701–716.
- Ferreira R.B., Monteiro S., Freitas R., Santos C.N., Chen Z., Batiata L.M., Durante J., Broges A., Teixeira A.R. 2007. The role of plant proteins in fungal pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.* 8: 1-24.
- Fierens E., Rombouts S., Gebruers K., Goesaert H., Brijs K., Beaugrand J., Volckaert G., Van Campenhout S., Proost P., Courtin C.M., Delcour J.A. 2007. A novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family. *Biochem.* 403: 583-591.
- Fils-Lycaon B.R., Wirsma P.A., Eastwell K.C., Sautiere P. 1996. A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like. *Plant Physiol.* 111: 1313-1319.
- Frendo P., Didierjean L., Passelegue E., Burkard G. 1992. Abiotic stresses induce a thaumatin-like protein in maize: cDNA isolation and sequence analysis. *Plant Sci.* 15: 61-69.
- Goidanich G. 1964. *Manuale di Patologia vegetale*. Bologna: Edagricole.
- Gonzalez-Bosch C., Brummel D.A., Bennett A.B. 1996. Differential expression of two endo-1,3- $\beta$ -glucanase genes in pericarp and locules of wild-type and mutant tomato fruit. *Plant Physiol.* 111: 1313-1319.
- Grenier A., Dehoux M., Boutten A., Arce-Vicioso M., Durand G., Gougerot-Pocidalo M.A., Chollet-Martin S. 1999. Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 93: 1413–1421.
- Hinton D.M., Pressy R. 1980. Glucanase in fruits and vegetable. *J. Am. Soc Hortic. Sci.* 105: 499-502.
- Hoffman L.E., Wilcox W.F., Gadoury D.M., Seem R.C. 2002. Influence of grape berry age on susceptibility to *Guignardia bidwellii* and its incubation period length. *Phytopathol.* 92:1068-1076.

- Jacobsen S., Hauschild M.Z., Rasmussen U., 1992. Induction by chromium ions of chitinase and polyamines in barley (*Hordeum vulgare*) and rape (*Brassica napus*). Plant sci. 84: 119-128.
- Kuo K., Hoch H.C. 1996. The parasitic relationship between *Phyllosticta ampellicida* and *Vitis vinifera*. Mycologia 88: 626-634.
- Manns T.F. 1928. Grape disease control in Delaware. Univ. Del. Agric. Exp. Stn. Bull. 154.
- Marcato R. 2011. Effetto di proteine dell'uva sulla crescita di *Botrytis cinerea*. Relatore Favaron F. Dipartimento di Territorio e sistemi agro-forestali, Istituto di Patologia Vegetale, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Padova, Legnaro.
- McLeod L.C., Poole P.R. 1994. Changes in enzymic activities after harvest and in early stages of Botrytis Cinerea infection of kiwifruit. J. Sci. Food Agric. 64: 95-100.
- Navarre C. 1991. Enologia. Milano: Hoepli Editore.
- Nitoda T., Usuki H., Kanzaki H. 2003. A potent insect chitinase inhibitor of fungal origin. Naturforsch Nov-Dec 58(11-12): 891-4.
- Reddick D. 1911. The black rot disease of grapes. Cornell Univ. Agric. Exp. Stn. Bull. 293: 289-364.
- Reuveni M., Agapov V., Reuveni R. 1993. Induction of systemic resistance to powdery mildew and growth increase in cucumber by phosphates. Biological Agriculture and Horticulture. 9: 305-315. Scribner, F. L., and Viala, P. 1888. Black Rot (*Laestadia bidwellii*). Dep. Agric. Bot. Div. Bull. 7.
- Robert N., Roche K., Lebeau Y., Breda C., Boulay M., Esnault R., Buffard D. 2002. Expression of grapevine chitinase genes in barriers and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. Plant Sci. 162: 389-400.
- Robinson S.P., Andrew K.J., Ian B.D. 1997. A Class IV Chitinase Is Highly Expressed in Grape Berries during Ripening. Plant Physiol. 114: 771-778.
- Salzman R., Thikhonova I., Bordelon B.P, Hasegawa M.P., Bressan R.A. 1998. Coordinate Accumulation of Antifungal Proteins and Hexoses Constitutes a De-

developmentally Controlled Defense Response during Fruit Ripening in Grape. *Plant Physiol* 117: 465-472.

- Sadanand A., Zhijian T.L., Dennis J.G. 2011. Grapevines engineered to express cisgenic *Vitis vinifera* thaumatin-like protein exhibit fungal disease resistance. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 47: 458-466.
- Saguez J., Vincent C., Giordanengo P. 2008. Chitinase Inhibitors and Chitin Mimetics for Crop Protection. *Pest Tech.* 2: 81-86.
- Sanghyun S., Caroline A.M., Janet L., Shane J.H., Lorien R., Ruth DM., Gerald D.B., Richard J.Z., Gary J.M. 2008. Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 59, No. 9: 2371–2378.
- Sassa T., Ishizaki A., Nukina M., Ikeda M., Sugiyama T. 1998. Isolation and identification of new antifungal macrophorins E, F and G as malonyl meroterpenes from *Botryosphaeria berengeriana*. *Biosci. Biotech. Bioch.* 62: 2260-2262.
- Tattersall D.B., van Heeswijck R., Hoj P.B. 1997. Identification and characterization of a fruit-specific thaumatin-like protein which accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in *Vitis vinifera*. *Plant Physiol.* 114: 759–769.
- Tortel-Aziz P., Couderchet M., Vernet G., Aziz A. 2006. Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 114: 405-413.
- Uknes S., Mauch-Mani B., Moyer M., Potter S., Williams S., Dincher S., Chandler C., Slusarenko A., Ward E., Ryals J. (1992) Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4: 645–656.
- Watanabe T., Kobori K., Miyashita T., Sakai H., Uchida M., Tanaka H. 1998. Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans*. WL-12 as essential residues for chitinase activity. *J. Biochem.* 268: 567-572.
- Siti consultati: [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) ; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)