

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



## Facoltà di Scienze Agrarie

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL SUOLO DELLA PIANTA DELL' AMBIENTE E DELLE  
PRODUZIONI ANIMALI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN AGROBIOLOGIA ED AGROCHIMICA  
INDIRIZZO CHIMICA AGRARIA  
XIX CICLO

## STUDIO DELL'INTERAZIONE OSPITE-PATOGENO TRA IL BATTERIO FITOPATOGENO *RALSTONIA SOLANACAERUM* E PATATA

TUTOR

*Prof. Antonio Evidente*

DOTTORANDO

*Dr. Nunzio Esposito*

CO-TUTOR

*Prof.ssa Amalia Barone*

COORDINATORE DEL DOTTORATO

*Prof. Antonio Violante*

ANNO ACCADEMICO 2006-2007



<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
1.1	LA PATATA COLTIVATA ( <i>SOLANUM TUBEROSUM</i> ).....	1
1.2	I BATTERI FITOPATOGENI .....	2
1.3	<i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i> .....	5
1.3.1	<i>Biologia del batterio</i> .....	6
1.3.2	<i>Il Genoma di Ralstonia solanacearum</i> .....	10
1.4	L'AVVIZZIMENTO BATTERICO DELLA PATATA .....	14
1.4.1	<i>Diffusione del patogeno</i> .....	18
1.4.2	<i>Importanza economica della malattia</i> .....	19
1.4.3	<i>Il controllo della malattia</i> .....	19
1.5	LA SPECIE SELVATICA <i>SOLANUM COMMERSONII</i> .....	21
1.6	GENI DI RESISTENZA IN PIANTA .....	22
1.6.1	<i>Geni di resistenza a Ralstonia solanacearum</i> .....	24
1.7	L'ANALISI DEI PROFILI DI TRASCRIZIONE MEDIANTE cDNA AFLP-TP .....	25
<b>2</b>	<b>SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>29</b>
3.1	MATERIALE VEGETALE .....	29
3.2	TEST DI PATOGENICITÀ <i>IN VIVO</i> E CAMPIONAMENTO DEL MATERIALE VERDE	30
3.3	ANALISI MOLECOLARI.....	30
3.3.1	<i>Estrazione dell'mRNA</i> .....	30
3.3.2	<i>Quantizzazione degli acidi nucleici</i> .....	33
3.3.3	<i>Tecnica AFLP-TP</i> .....	34
3.3.4	<i>Clonaggio dei frammenti di cDNA</i> .....	42
3.3.5	<i>Estrazione del DNA plasmidico</i> .....	43
3.3.6	<i>Sequenziamento dei frammenti</i> .....	44
3.4	ANALISI BIOINFORMATICHE .....	45
3.5	ANALISI BIOCHIMICHE.....	46
3.5.1	<i>Coltura dei batteri</i> .....	46

3.5.2	<i>Precipitazione frazionata con etanolo degli EPS di Ralstonia solanacearum</i> .....	47
3.5.3	<i>Estrazione degli LPS di Ralstonia solanacearum con il metodo acqua-fenolo</i> .....	47
3.5.4	<i>Determinazione della struttura dell'o-chain e del Lipide A</i> .....	48
3.6	<b>SAGGI BIOLOGICI SU METABOLITI DI RALSTONIA SOLANACEARUM</b> .....	48
3.6.1	<i>Saggi di fitotossicità</i> .....	48
3.6.2	<i>Saggi sull'attività in vivo degli LPS</i> .....	49
<b>4</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>50</b>
4.1	<b>INDIVIDUAZIONE DEI PUTATIVI GENI COINVOLTI NELLA RESISTENZA AL BATTERIO RALSTONIA SOLANACEARUM IN PATATA</b> .....	50
4.2	<b>SOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DEGLI LPS DI RALSTONIA SOLANACEARUM</b> .....	77
4.3	<b>ATTIVITÀ IN VIVO DEGLI LPS</b> .....	83
4.4	<b>ATTIVITÀ IN VIVO DEL FILTRATO COLTURALE E DEGLI EPS</b> .....	87
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>93</b>

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 LA PATATA COLTIVATA (*SOLANUM TUBEROSUM*)

La patata è originaria dell'America centrale e meridionale, dove è diffusa fino all'estremità meridionale del Cile. Le antiche popolazioni della Cordigliera delle Ande hanno addomesticato questa pianta da circa 7000 anni (Hawkes, 1990).

Le patate coltivate oggi afferiscono a sette gruppi diversi, di volta in volta indicati come sottospecie della specie *Solanum tuberosum* o come specie a sé stanti. La classificazione di Hawkes prevede che le cultivar moderne afferiscano a 7 specie: *Solanum ajanhuiri*, *Solanum stenotomum*, *Solanum phureja*, *Solanum chaucha*, *Solanum juzepczukii*, *Solanum curtilobum* e *Solanum tuberosum*, nelle sue sottospecie *andigena* e *tuberosum*.

Gran parte degli autori concorda nell'affermare che le cultivar moderne diffuse in tutto il mondo e le specie coltivate in Cile afferiscano tutte alla specie *Solanum tuberosum* sottospecie *tuberosum* ( $2n=4x=48$ ) in quanto accomunate da foglie larghe e capacità di fiorire in condizioni di giorno lungo. La loro origine è più controversa, anche se pare sufficientemente accreditata l'ipotesi che esse si siano originate tutte, ma in maniera indipendente, da *Solanum tuberosum* sottospecie *andigena* e che siano state interincrociate solo in un secondo momento.

Il patrimonio genetico delle patate europee e nord americane risale tutto ai pochi cloni introdotti in Europa dall'America centro-meridionale durante il XVI secolo. Portata in Europa dagli Spagnoli nel 1570 (Hawkes et al., 1993), solo nel 1610 la patata arrivò in Inghilterra e in Irlanda, dove fu immediatamente accettata come importante prodotto agricolo ed entrò nella dieta delle classi meno abbienti. I Francesi la esclusero dalle loro tavole perché credevano che causasse la lebbra e soltanto a partire dal 1780, grazie ad A.A. Parmentier, il suo impiego fu diffuso in Francia. La patata arrivò negli Stati Uniti attraverso l'Irlanda nel 1719.

Le patate europee e nord americane sono derivate essenzialmente da due introduzioni di *Solanum tuberosum* sottospecie *andigena* in Europa dal Sud America nel tardo XVI secolo, da possibili successive introduzioni casuali nel XVII e XVIII secolo, dall'introduzione della cultivar *Daber* in Germania nel 1830 e della cultivar *Rough Purple Chili* negli Stati Uniti nel 1851 (Plaisted et al., 1989). La propagazione vegetativa di pochi cloni, protratta per cinque secoli ed interrotta solo da incroci occasionali, ha fatto sì che l'evoluzione ed il riassortimento dei caratteri fossero ridotti al minimo.

Esistono tuttavia molte specie del genere *Solanum*, per lo più diploidi ( $2n = 2x = 24$ ) ma anche tetraploidi ed esaploidi, che possono essere utilizzate come fonte di

variabilità genetica per il miglioramento della patata coltivata. Oltre alle sei specie sopramenzionate coltivate solo in Sud America perché non adatte a fiorire e tuberizzare in condizioni di giorno lungo, esistono nell'areale d'origine circa 130 specie selvatiche di *Solanum* che possiedono caratteri interessanti soprattutto di resistenza a stress biotici ed abiotici.

Un catalogo completo di tali specie selvatiche è reperibile presso il sito del Centro Internacional de la Papa (CIP), il cui database sul web si trova all'indirizzo <http://research.cip.cgiar.org/smta/customview1list.php?filter3=WILD&ot=yot3> ed è stato recentemente pubblicato (Salas et al., 2006).

La patata, attualmente, rappresenta la quarta coltura più diffusa al mondo, importantissima fonte di calorie per l'alimentazione umana. Nelle più recenti stime la superficie coltivata di patata nel mondo è pari a 19 milioni di ha, con una produzione che nel 2006 ha raggiunto 315 milioni di tonnellate (Tabella 1.1), più della metà dei quali prodotti in paesi in via di sviluppo (FAOSTAT).

**Tabella 1.1.** Produzione mondiale di patata nel 2005.

<b>AREE GEOGRAFICHE</b>	<b>Superficie coltivata (1.000 Ha)</b>	<b>Produzione (1.000 t)</b>	<b>Rese medie (Kg/Ha)</b>	<b>Consumi annui (1.000 t)</b>
<b>AFRICA</b>	1.499	16.201	10.806	12.850
<b>AMERICA</b>	1.553	39.342	25.339	32.476
<b>ASIA</b>	8.210	132.848	16.182	100.374
<i>CINA</i>	<i>4.884</i>	<i>73.462</i>	<i>15.043</i>	<i>52.882</i>
<b>EUROPA</b>	7.585	130.795	17.243	71.087
<i>UE 27</i>	<i>2.302</i>	<i>62.636</i>	<i>27.209</i>	<i>38.760</i>
<i>ITALIA</i>	<i>70</i>	<i>1.754</i>	<i>25.082</i>	<i>2.310</i>
<b>OCEANIA</b>	49	1.791	36.631	1.382
<b>Totale MONDO</b>	<b>18.896</b>	<b>320.978</b>	<b>16.978</b>	<b>218.172</b>

Nonostante le elevate produzioni, ogni anno le coltivazioni di patata subiscono forti perdite a causa di fattori abiotici e soprattutto patogeni e parassiti biotici quali insetti, come la dorifora della patata (*Leptinotarsa decemlineata*), funghi come la peronospora della patata (*Phitophthora infestans*) e batteri come *Erwinia* spp. e *Ralstonia solanacearum*.

## **1.2 I BATTERI FITOPATOGENI**

I batteri sono organismi procariotici, unicellulari, che si moltiplicano asessualmente per scissione binaria. Delle circa 1600 specie di batteri conosciute, circa 300 causano malattie alle piante, la maggior parte delle quali appartengono a due generi soli: *Xanthomonas* e *Pseudomonas*.

Ad eccezione dei cosiddetti batteri "esigenti" (dall'inglese *fastidious*) per fonti nutrizionali, tutti i batteri fitopatogeni sono saprofiti facoltativi e possono essere facilmente coltivati su substrati artificiali, sono inoltre tutti asporigeni e per lo più hanno forma a bastoncino.

I batteri sono microrganismi tendenzialmente termofili e per questo sono tipicamente patogeni degli animali a sangue caldo, mentre risultano patogeni meno importanti per le piante, rispetto ad altri microrganismi fitopatogeni come i funghi, sia in termini di numero di *taxa* che di perdite complessivamente causate.

Le limitazioni dei batteri nel colonizzare i vegetali sono da attribuite a diverse cause:

1. I batteri fitopatogeni non formano strutture particolari di resistenza perciò la loro sopravvivenza, più difficoltosa di quella dei funghi, è soprattutto garantita dalla stessa pianta ospite.
2. Diversamente dai funghi, essi sono incapaci di penetrazione diretta e, come nell'uomo e negli animali, penetrano nella pianta solo attraverso aperture naturali o attraverso ferite.
3. Tendono a preferire un ambiente sub-alcalino, mentre il pH dei liquidi cellulari della pianta è generalmente acido.
4. La diffusione su lunghe distanze dei batteri è ostacolata dal loro aggregarsi in masserelle mucillaginose, difficilmente staccate e trasportate dal vento.

Nonostante queste limitazioni, i batteri fitopatogeni causano malattie in tutti gli ambienti e su ogni tipo di pianta e, in condizioni ambientali favorevoli, possono essere estremamente distruttivi grazie anche alle loro capacità di produrre, in un breve periodo di tempo, un elevato numero di cellule. La loro pericolosità è poi accresciuta dal fatto che, fra i fitofarmaci utilizzabili in agricoltura, solo i composti rameici hanno un qualche effetto nel prevenirne e contenerne le infezioni, mentre non esistono formulati ad azione curativa.

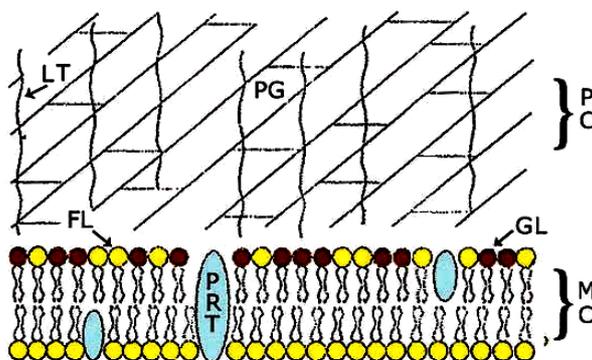
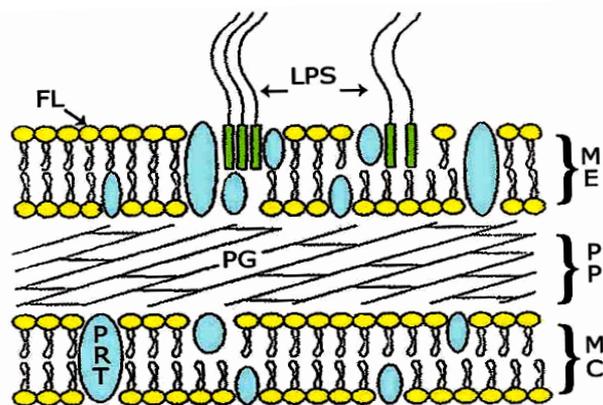
I batteri sono microrganismi strutturalmente molto semplici, il corpo vegetativo è infatti privo di vacuoli, di reticolo endoplasmatico, di nucleo e di ogni altro organello citoplasmatico replicantesi e delimitato da membrana. Il genoma è rappresentato da un unico groviglio di DNA a doppia elica incluso nel citoplasma.

La parete cellulare conferisce forma e rigidità alla cellula e presenta composizione chimica differente nei Gram-positivi e nei Gram-negativi. In questi ultimi, oltre al peptidoglicano, che rappresenta, però solo il 5-10% del peso secco della parete, troviamo, nella membrana esterna, fosfolipidi, diverse proteine e lipopolisaccaridi (LPS), una famiglia complessa di molecole anfipatiche, le quali giocano un ruolo

molto importante nell'interazione dei batteri con l'ambiente extracellulare inclusi gli ospiti eucarioti (Rietschel et al., 1994).

Nei Gram-positivi prevale il peptidoglicano (dal 40 al 90% del peso secco della parete) associato ad acidi tecoici (polimeri idrosolubili costituiti da residui di glicerolo o ribitolo uniti da legami fostodiesterici), polisaccaridi e, solo raramente, proteine. Il peptidoglicano forma una struttura molecolare a rete, una sorta di sacco mono o bistratificato nei Gram-negativi (Figura 1.1), pluristratificato nei Gram-positivi (Figura 1.2), che avvolge completamente il protoplasto.

**Figura 1.1** Modello di parete cellulare e di membrana di un batterio Gram-negativo:  
**LPS:** lipopolisaccaridi  
**FL:** fosfolipide  
**ME:** membrana esterna  
**PP:** periplasma  
**PG:** peptidoglicano  
**PRT:** proteina  
**MC:** membrana citoplasmatica



**Figura 1.2.** Modello di parete cellulare e di membrana di un batterio Gram-positivo:  
**PC:** parete cellulare  
**PG:** peptidoglicano  
**LT:** acido lipoteicoico  
**GL:** glicolipide  
**FL:** fosfolipide  
**PRT:** proteina  
**MC:** membrana citoplasmatica.

La principale funzione dello strato rigido di peptidoglicano è quella di dare una forma alla cellula ma anche di contrastare la pressione di turgore e, quindi, contribuire a prevenire la lisi osmotica. La membrana esterna presenta in superficie cariche elettriche negative e molecole che fungono anche da recettori di batteriofagi e batteriocine, detergenti e altri agenti tossici.

Particolare importanza rivestono poi gli LPS, sia per il ruolo svolto nel riconoscimento batterio-pianta sia per le proprietà antigeniche. Gli LPS sono anche utilizzati a fini tassonomici poiché la composizione chimica della catena laterale può variare da specie a specie e persino tra ceppi di una stessa specie batterica.

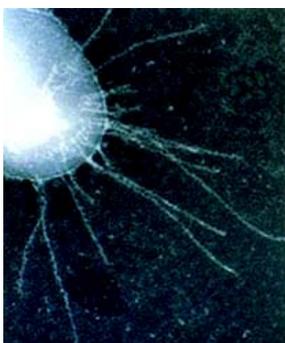
Molti batteri presentano esternamente alla parete cellulare la cosiddetta capsula, uno strato più o meno spesso di polimeri extracellulari che avvolgono

uniformemente la cellula. Lo strato mucoso è invece la porzione di esopolimeri che in virtù della loro abbondanza ed elevata idrosolubilità si accumula in modo disperso e non aderente alle cellule. La composizione degli esopolimeri è alquanto variabile: alcune specie (*Bacillus*) producono esopolipeptidi, altre, la maggior parte, esopolisaccaridi (EPS). La sintesi degli EPS avviene a partire da zuccheri attivati da nucleotidi come nel caso del glucano di *Agrobacterium tumefaciens* oppure direttamente dal saccarosio con produzione di destrani o levani (*Pseudomonas spp.*, *Xanthomonas spp.* e *Bacillus spp.*). La capsula, presente in molti batteri fitopatogeni, non è essenziale per le funzioni cellulari ma può fungere da recettore per i virus, proteggere la cellula dall'essiccamento o dall'azione di fagociti e favorire l'adesività a superfici solide.

Gli EPS sono poi considerati, nei batteri fitopatogeni, importanti fattori di virulenza. In particolare, gli EPS di diverse patovar di *Pseudomonas syringae* contribuiscono alla patogenesi causando la congestione idrica dei tessuti (sintomi idropici). Nel caso, invece, di malattie vascolari da avvizzimento gli EPS sembrano contribuire, insieme alle stesse cellule, all'ostruzione meccanica dei vasi conduttori (Matta, 1996).

### **1.3 RALSTONIA SOLANACEARUM**

*Ralstonia solanacearum* (Figura 1.3) è un batterio Gram-negativo a forma bastoncellare, lungo 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ , con un singolo flagello polare. Si distingue da *Erwinia* per la reazione positiva alla colorazione di granuli di poli- $\beta$ -idrossibutirato con Sudan Black-B o Nile Blue, inoltre si colora intensamente ai poli con carbolfucsina. Le colonie in agar sono inizialmente lisce, brillanti ed opalescenti, ma con il tempo diventano marroni (Lelliott et al., 1987; Saddler, 1994).



**Figura 1.3.** Immagine al microscopio di *Ralstonia solanacearum*.

Il batterio fitopatogeno fu descritto per la prima volta come *Bacillus solanacearum* da Smith nel 1896 (OEPP/EPPO Bulletin, 2004), in seguito fu assegnato al genere *Pseudomonas*, prima che studi più approfonditi su alcune specie non-fluorescenti

del genere *Pseudomonas* (Yabuuchi et al., 1992) portarono alla identificazione del genere *Burkholderia*, all'interno del quale fu catalogato il batterio con il nome di *Burkholderia solanacearum*. Successive indagini su questo genere, infine, hanno rilevato che *Burkholderia solanacearum* era sufficientemente distinta dagli altri membri del genere per giustificarne la sua assegnazione al recente genere proposto *Ralstonia* (Yabuuchi et al., 1995).

Dato che la classificazione del batterio ha subito diverse revisioni nel corso degli anni, in letteratura è possibile ritrovarlo con i sinonimi di *Bacterium solanacearum* (Smith) Chester, *Burkholderia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi et al., 1992), *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith.

L'attuale classificazione tassonomica del batterio è la seguente:

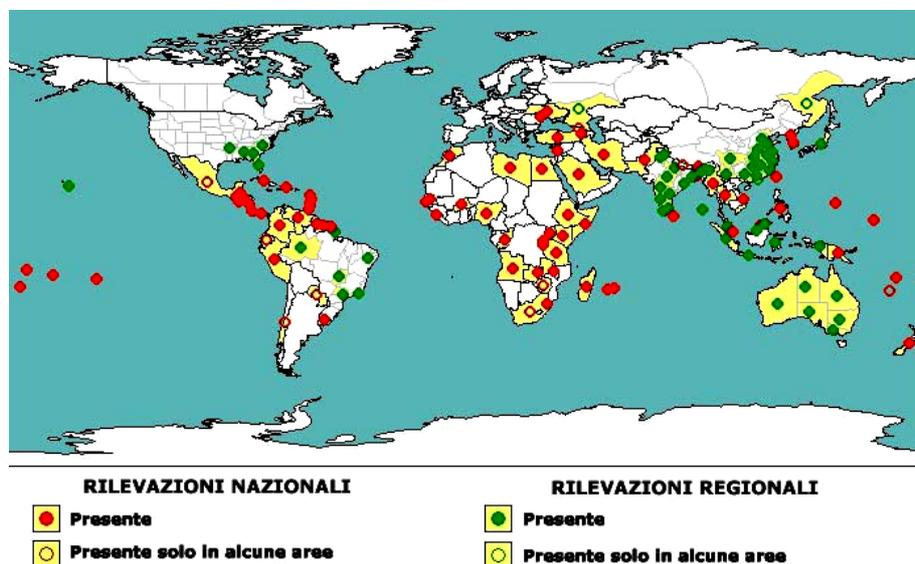
- REGNO: *Prokaryotae*
- DIVISIONE: *Gracilicutes*
- CLASSE: *Proteobacteria* sottodivisione  $\beta$
- FAMIGLIA: *Pseudomonadaceae*
- GENERE: *Ralstonia*
- SPECIE: *Ralstonia solanacearum*

*Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi et al., 1995) è un batterio fitopatogeno che complessivamente presenta un *range* di ospiti estremamente ampio, anche se le differenti razze in cui si suddivide possono mostrare *range* di ospiti molto limitati. Complessivamente sono ospiti potenziali del patogeno più di 200 specie, soprattutto tropicali e subtropicali, tra cui: patata (*Solanum tuberosum*), pomodoro (*Lycopersicon esculentum*), banano (*Musa spp.*), tabacco (*Nicotina tabacum*), peperone (*Capsicum annum*), arachide (*Arachis hypogaea*), cotone (*Gossypium hirsutum*), albero della gomma (*Hevea brasiliensis*), anturio (*Anthurium spp.*), tapioca (*Manihot esculenta*), ricino (*Ricinus communis*), melanzana (*Solanum melongena*) e zenzero (*Zingiber officinalis*) (Kelman, 1953; Bradbury, 1986; Persley, 1986a; Hayward, 1994a).

### **1.3.1 Biologia del batterio**

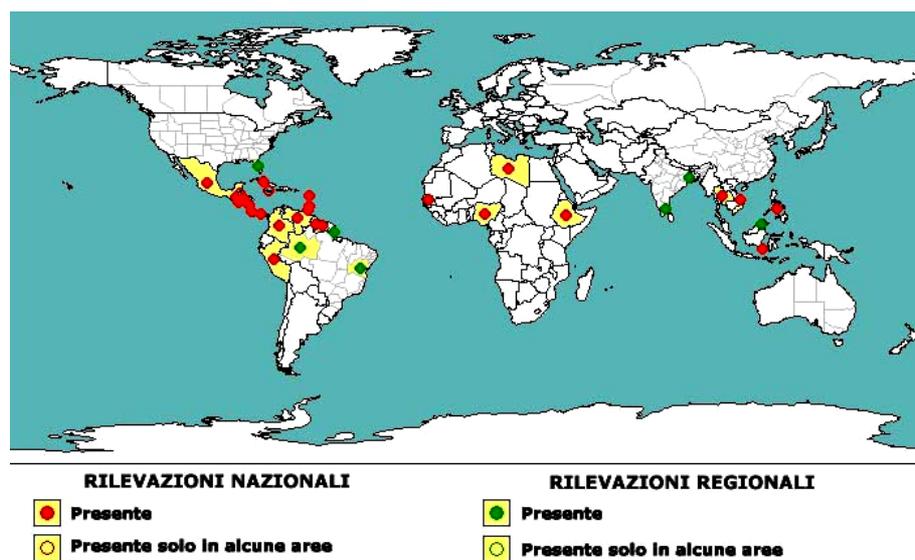
*Ralstonia solanacearum* non ha una biologia e un *range* di ospiti uniforme, ma è formato da un complesso di varianti, descritte in letteratura come gruppi, razze, biovar, biotipi, sub-razze e ceppi. Nel corso degli anni, con il susseguirsi degli studi sono state descritte almeno 5 razze e 5 biovar (Buddenhagen et al., 1962).

Razza 1 (temperatura ottimale di crescita di 35-37°C): attacca tabacco, pomodoro, patata, melanzana, banano diploide e numerose altre colture ed erbe spontanee dell'area tropicale (Figura 1.4).



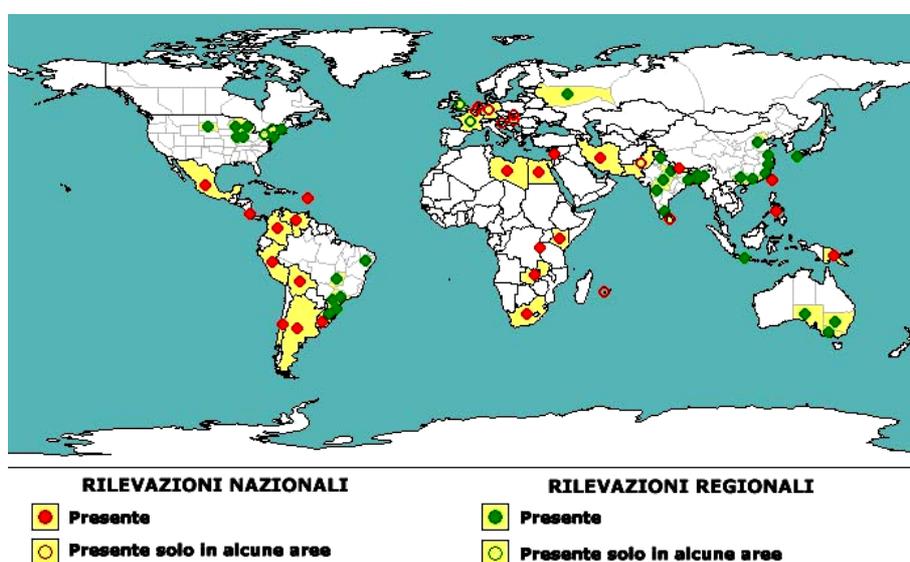
**Figura 1.4.** Mappa di distribuzione della **razza 1** di *Ralstonia solanacearum*.

Razza 2 (temperatura ottimale di crescita di 35-37°C): tipica delle aree tropicali del Sud America (Figura 1.5), attacca banano triploide (causando il così detto "Moko") e *Heliconia spp*, ma si ritrova anche nelle Filippine dove causa il "bugtok" del plantano.



**Figura 1.5.** Mappa di distribuzione della **razza 2** di *Ralstonia solanacearum*.

Razza 3 (temperatura ottimale di crescita di 27°C): si ritrova nelle alture delle zone tropicali e subtropicali nonché nei climi temperati (Figura 1.6), attacca principalmente patata e pomodoro, non mostrando elevata virulenza nei confronti delle altre Solanacee. Altri ospiti sono le erbe spontanee *Solanum dulcamara*, *Solanum nigrum*, *Solanum cinereum* (in Australia), la composita *Melampodium perfoliatum* (in Costa Rica) e *Pelargonium hortorum*. Spesso si ritrova in maniera non sintomatica su specie selvatiche non appartenenti alla famiglia delle Solanacee (Pradhanang et al., 2000; Strider et al., 1981; Wenneker et al., 1999; Janse et al., 2004).



**Figura 1.6.** Mappa di distribuzione della **razza 3** di *Ralstonia solanacearum*.

Razza 4 (temperatura ottimale di crescita di 35-37°C): particolarmente aggressiva nei confronti dello zenzero.

Razza 5 (temperatura ottimale di crescita di 35-37°C): specializzata nei confronti del genere *Morus spp.*

Hayward (1964) ha distinto 4 biotipi (biovar) in base alla loro capacità di produrre acidi a partire da diversi disaccaridi ed alcoli. Il ceppo che attacca il gelso è stato descritto come biovar 5 (Buddenhagen, 1986). Questi biotipi non sono correlati con le razze descritte da Buddenhagen et al. (1962). Solo la razza 3, che attacca la patata, è equivalente al biotipo 2 (Hayward, 1983).

Razze e biovar, in base ad analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP), sono stati classificati in due gruppi principali (Cook et al., 1988 e 1994). Ceppi asiatici della razza 1 (biovars 3,4,5) si comportano come un gruppo

uniforme, ceppi americani di razza 1 (biovar 1), razza 2 (biovar 1) e razza 3 (biovar 2) come un altro.

La razza 3 (biovar 2) è apparsa essere molto eterogenea in molti studi filogenetici. Dagli studi condotti su ceppi sudamericani della razza 3 (biovar 2), è stata osservata maggiore variabilità:

- a. ceppi "normali" sono stati trovati ad est della linea di demarcazione delle Ande con il resto del mondo;
- b. ceppi che sono biochimicamente differenti, fino ad ora trovati solo ad ovest della linea di demarcazione delle Ande;
- c. ceppi che si comportano in maniera intermedia tra la razza 1 e la razza 3, presenti nelle regioni meridionali del Sud-America (chiamate anche 2N o 2T).

Non è noto, in ogni modo, se le tipologie b) e c) siano state ritrovate anche in altre parti del mondo (Janse, 1991; Gillings et al., 1994; Hayward, 1994). Questi ritrovamenti, unitamente al riscontro di resistenza nella specie selvatica di patata *Solanum phureja* (Sequiera et al., 1969) fanno ipotizzare che il Sud America sia il centro di origine della razza 3.

Una recente classificazione di *Ralstonia solanacearum*, basata sull'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) ed altri studi molecolari (Hayward, 2000) raggruppano il batterio in:

- Divisione I: che comprende le biovar 3, 4 e 5 originarie dell'Asia;
- Divisione II: che comprende le biovar 1, 2A e 2T originarie del Sud America.

La razza 3, capace di crescere a temperature relativamente più basse (27°C), è quella potenzialmente più pericolosa per i paesi dell'Europa e dell'area mediterranea, dove potrebbe adattarsi e diffondersi in maniera stabile. In seguito alle segnalazioni di tale razza avutesi negli anni novanta, sono stati emanati nei vari paesi decreti di lotta obbligatoria e si effettuano controlli scrupolosi sulle importazioni di materiale potenzialmente pericoloso (EPPO/CABI, 1996).

In Italia il Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali ha emanato il Decreto Ministeriale 23 febbraio 2000, recepimento della direttiva n. 98/57/CE del Consiglio concernente la lotta contro *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi et al., 1995).

La razza 1 può essere introdotta in zone a clima temperato attraverso materiale vegetale, essenzialmente curcuma (*Curcuma longa*), anturio (*Anthurium spp.*) ed epipremnum (*Epipremnum spp.*), proveniente da zone tropicali e allevato in serra.

Il batterio si può diffondere nel suolo, nel quale sopravvive per parecchio tempo, e nelle acque d'irrigazione. Nelle aree tropicali, molte specie selvatiche possono fungere da ospiti alternativi. Il basso grado di sviluppo del batterio sulle specie selvatiche, permette loro di resistere all'infezione, ed allo stesso tempo permettono al batterio di sopravvivere tra una coltivazione e l'altra (ospiti muti).

La penetrazione nelle piante ospiti avviene attraverso ferite presenti su radici e fusto oppure attraverso gli stomi. All'interno della pianta, il batterio si muove nei fasci vascolari, con velocità maggiore in presenza di alte temperature. La velocità del movimento dipende anche dalla parte della pianta che è stata colonizzata, ad esempio nel tabacco il batterio si muove più velocemente nello stelo che nelle radici (Ono et al., 1984). Il patogeno colonizza lo xilema (Xiao et al., 1983), dove aderisce alle pareti dei vasi o ne invade il lume. L'adesione avviene attraverso attrazioni polari nei confronti della superficie cellulare e, in seguito, diviene localizzata su siti preferenziali del mesofillo (Petroliini et al., 1986). La causa principale dell'avvizzimento che si registra nella pianta ospite è proprio l'ostruzione dei fasci vascolari.

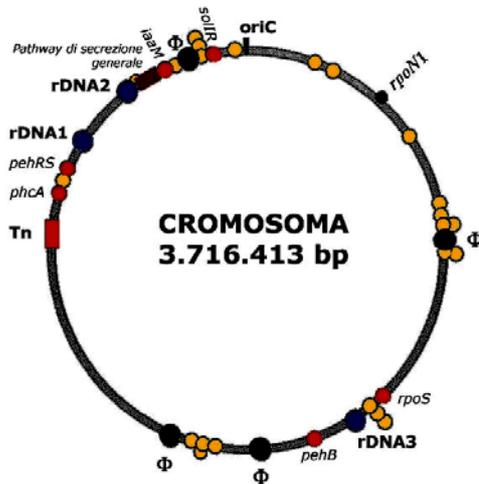
Il batterio produce danni più importanti con temperature di 24-35°C, raramente si ritrova in zone a clima temperato dove le temperature medie durante i mesi invernali scendono sotto ai 10°C. Le varie razze (biovar) esigono differenti livelli di temperatura per lo sviluppo e la riproduzione (Swanepol, 1990).

L'elevata umidità del suolo e stagioni umide o piovose sono associate con un'alta intensità della malattia. L'umidità del suolo è anche uno dei fattori più influenti sulla riproduzione e la sopravvivenza del patogeno; i valori ottimali di umidità del suolo sono -0,5/-1 bar, mentre risultano sfavorevoli umidità di -5/-15 bar (Nesmith et al., 1985).

Condizioni climatiche leggermente sfavorevoli, come basse temperature, influenzano la manifestazione dei sintomi. In Kenya, tuberi di patate certificate e apparentemente sane, ma infette latentemente infette, prodotte all'altitudine di 1520-2120 msl, manifestavano l'infezione una volta coltivate ad altitudini inferiori (Nyangeri et al., 1984).

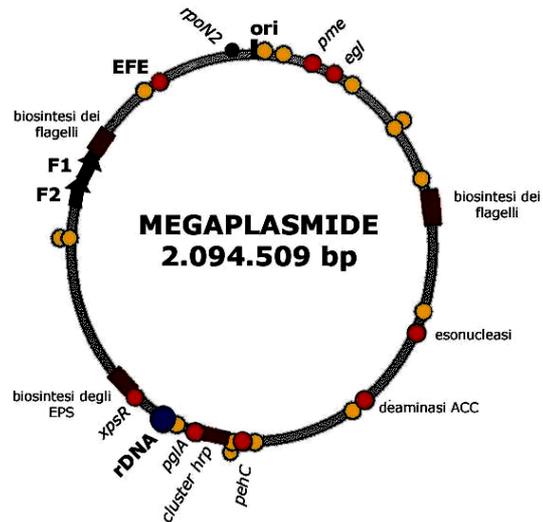
### **1.3.2 Il Genoma di *Ralstonia solanacearum***

*Ralstonia solanacearum* possiede un genoma bipartito composto da due molecole circolari di DNA, una maggiore, che rappresenta il vero e proprio cromosoma (Figura 1.7), di 3.716.413 coppie di basi ed una minore, detta anche megaplasmide (Figura 1.8), di 2.094.509 coppie di basi. Il complesso del materiale genetico del patogeno è capace di codificare 5.129 proteine (Salanoubat et al., 2002).



**Figura 1.7.** Rappresentazione schematica del cromosoma di *Ralstonia solanacearum*. **Ori**: origine della replicazione; **rDNA**: loci di DNA ribosomiale; **Tn**: trasposone coniugativo di 44kb; **φ**: sequenza di profago; **rpoS**: locus del gene codificante il fattore sigma S; **pehRS** e **pehB**: loci di geni della poligalatturonasi; **rpoN1**: locus del gene codificante un fattore sigma 54; **phcA**: regolatore di trascrizione; **iaaM**: locus del gene potenzialmente coinvolti nella sintesi dell'auxina; **solIR**: sistema di regolazione dell'acilomoserina-lattone.

**Figura 1.8.** Rappresentazione schematica del megaplasmide di *Ralstonia solanacearum*. **Ori**: origine della replicazione; **EFE**: locus di enzima che produce etilene; **rDNA**: loci di DNA ribosomiale; **F**: regioni ripetute a tandem di 31 kb; **xpsR**: locus del gene regolatore della biosintesi degli EPS; **rpoN2**: locus del gene codificante un fattore sigma 54; **pglA** e **pehC**: loci di geni della poligalatturonasi; **pme**: locus del gene della pectin-metilesterasi; **egl**: locus di endonucleasi.



La presenza di un genoma bipartito sembra essere una caratteristica di *Ralstonia solanacearum* dal momento che un megaplasmide è stato ritrovato nella maggior parte dei ceppi appartenenti a questa specie di fitopatogeni (Rosenberg et al., 1982).

Tutti i meccanismi di base richiesti per la sopravvivenza del batterio, replicazione e riparazione del DNA, divisione cellulare, trascrizione e traduzione, sono localizzati sulla molecola di DNA più grande, che è considerata il vero e proprio cromosoma; i geni *hrp* (Boucher et al., 1986), necessari per infettare le piante, i geni che codificano per i costituenti dei flagelli e quelli per la sintesi degli esopolisaccaridi sono situati sul megaplasmide, che acquista una significativa funzione per l'adattamento del batterio alle variabili condizioni ambientali (Salanoubat et al., 2002).

Analizzando il genoma di *Ralstonia solanacearum* si evidenziano numerosi geni che potrebbero avere un ruolo nella patogenesi quali:

- geni coinvolti nella produzione di enzimi idrolitici per la degradazione della parete cellulare;
- geni richiesti per la produzione di ormoni vegetali (auxine ed etilene) o per degradazione dei segnali di difesa molecolare delle piante (etilene ed acido salicilico);
- geni codificanti proteine coinvolte nella resistenza a stress ossidativi, che potrebbero agire detossificando l'ossigeno attivo, molecola descritta da Alvarez et al. (1998) come primaria difesa delle piante nei confronti dell'invasione dei patogeni;
- geni coinvolti nella produzione di tossine ed antibiotici.

Una caratteristica inusuale del genoma di *Ralstonia solanacearum* è che contiene un grosso numero di geni codificanti proteine della membrana esterna o elementi di appendici batteriche (pili e fimbrie) implicate nell'adesione del batterio alle superfici esterne. Si ritrovano inoltre 35 geni raggruppati in 5 cluster, coinvolti nella biogenesi dei pili di tipo IV, noti per essere fattori di adesione, oltre che essere responsabili del movimento dei batteri su superfici epiteliali senza l'uso di flagelli (Wall et al., 1999).

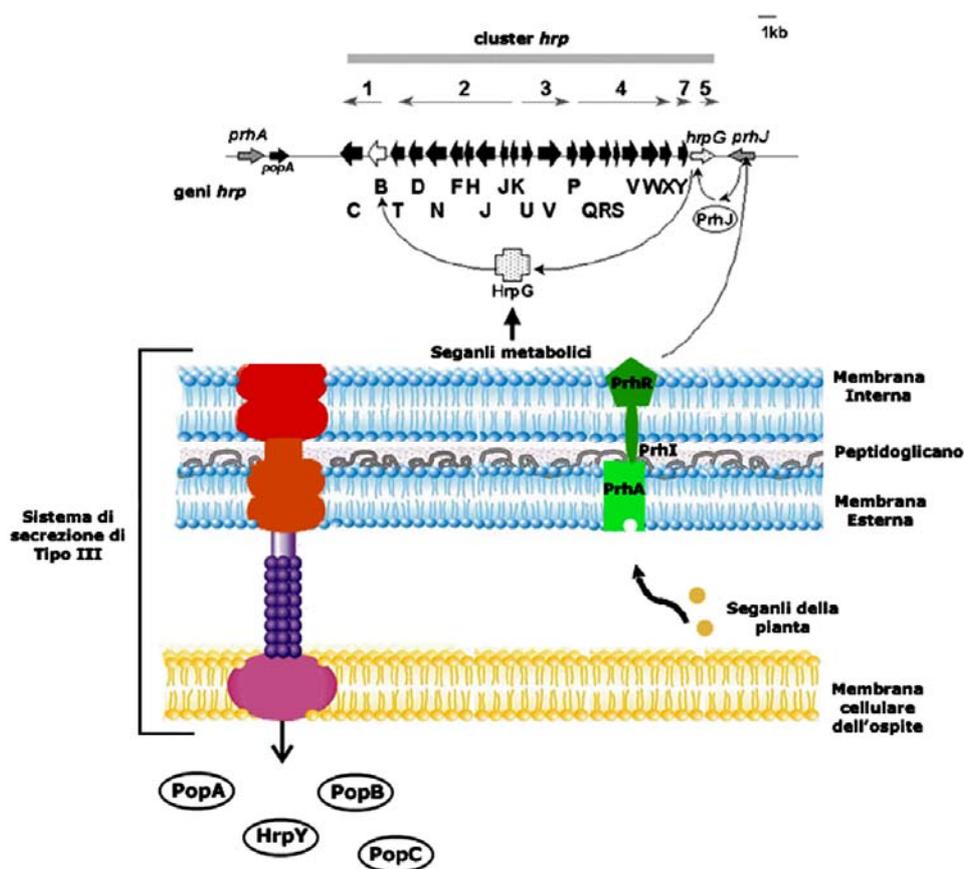
La presenza di numerose copie di geni strutturali della pilina all'interno di sistemi codificanti pili o fimbrie, suggerisce la possibilità che i geni siano espressi in differenti contesti o possano avere ruoli strutturali leggermente differenti, allargando, in questo modo, la capacità di questo patogeno di adattarsi a diversi substrati, inclusa l'epidermide delle piante ospiti (Salanoubat et al., 2002).

Un'altra particolarità riguardo l'abbondanza di meccanismi di adesione presenti in *Ralstonia solanacearum* è rappresentata da una classe di molecole di superficie codificate da una grossa regione del genoma, che mostra omologia con le adesine (emiagglutinine filamentose) prodotte da altri batteri fitopatogeni (Salanoubat et al., 2002). È stata identificata, infine, una famiglia di proteine che presentano alcune somiglianze con le proteine AttM e AttZ di *Agrobacterium tumefaciens*, entrambe richieste per l'adesione alla cellula vegetale e per la virulenza (Matthysse et al., 2000).

La ricchezza in fattori di adesione del genoma di *Ralstonia solanacearum* è, probabilmente, la caratteristica funzionale che permette al patogeno di avere un così largo range di piante ospiti (Salanoubat et al., 2002).

*Ralstonia solanacearum* possiede un insieme di geni *hrp* codificanti per un sistema di secrezione di tipo III (Figura 1.9) (TTSS), esso è richiesto per la patogenicità sulla specie ospiti e per indurre la reazione di ipersensibilità nelle piante non ospiti (Boucher et al., 1987).

Il sistema di secrezione di tipo III è tipicamente formato da 11 proteine conservate, alcune delle quali riunite in un organello macromolecolare (un complesso aghiforme e/o un pilo) che attraversa la parte interna ed esterna della membrana batterica e mediante il quale vengono mobilitate le proteine. Gli effettori proteici, che spesso sono unici, sono secreti in prossimità delle cellule bersaglio o iniettati direttamente nel citoplasma, essi vanno ad influenzare la risposta difensiva dell'ospite in modo da favorire la sopravvivenza, la moltiplicazione e la colonizzazione del patogeno. I patogeni vegetali producono due tipi di effettori: arpine e proteine di avirulenza (Cornelis et al., 2000).



**Figura 1.9.** Il sistema di secrezione di tipo III di *Ralstonia solanacearum*.

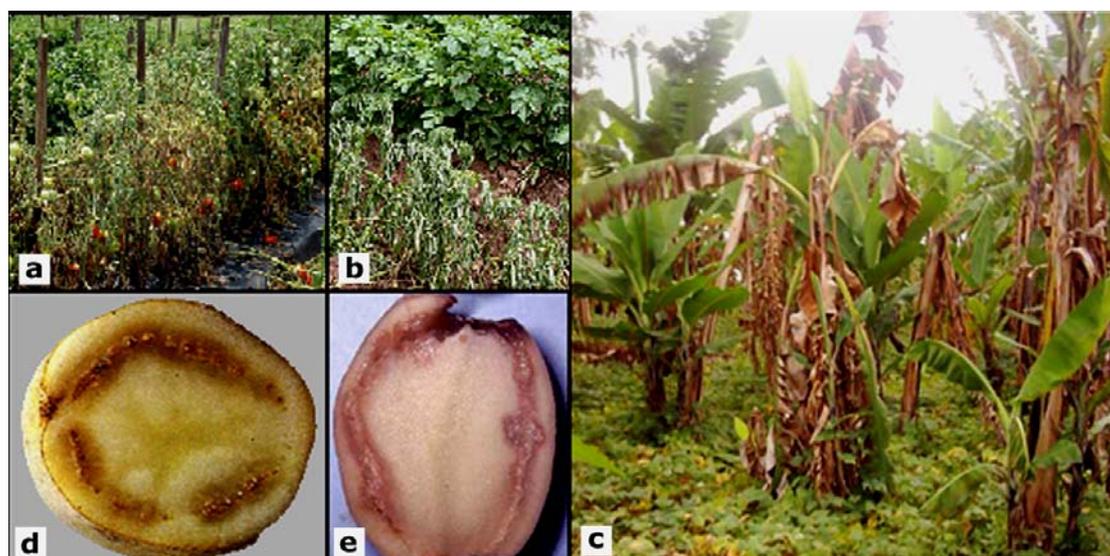
I sistemi TTSS batterici sono presenti sia fra i patogeni animali, che quelli vegetali e traslocano proteine effettrici nel citoplasma delle piante ospiti (Staskawicz et al., 2001; Cornelis et al., 2000). L'analisi del genoma di *Ralstonia solanacearum* evidenzia, su entrambe le molecole di DNA, la presenza di diversi geni collegati ai geni di avirulenza (*avr*) descritti in diversi batteri fitopatogeni, (Salanoubat et al., 2002). Questi geni *avr* codificano per delle proteine effettrici, che presumibilmente sono iniettate nelle cellule ospiti tramite il sistema di secrezione TTSS, codificato dai

geni *hrp* (Cornelis et al., 2000). Tale presenza è particolare, in quanto i geni *avr* sono stati descritti solo in patogeni con un ristretto range di piante ospiti (Leach et al., 1996). Secondo Salanoubat et al. (2002) è sorprendente che, nonostante in *Ralstonia solanacearum* sia evidenziata la presenza di geni *avr*, non sia mai stata descritta una resistenza monogenica nei confronti dell'avvizzimento batterico nelle Solanacee. Secondo Kjemtrup et al. (2000) è possibile che queste proteine di avirulenza conferiscano vantaggi selettivi agendo collettivamente come fattori di patogenicità su un largo range di piante ospiti. È anche possibile, come riporta Salanoubat et al. (2002), che *Ralstonia solanacearum* possieda alcuni soppressori generali della risposta difensiva delle piante, attivati dall'individuazione delle proteine di avirulenza da parte di fattori vegetali.

Infine, un secondo insieme di 9 proteine, individuate per omologia con quelle presenti in altri batteri fitopatogeni, e che probabilmente possono essere traslocate attraverso il sistema di secrezione TTSS, sono disseminate in tutto il genoma (Salanoubat et al., 2002).

#### 1.4 L'AVVIZZIMENTO BATTERICO DELLA PATATA

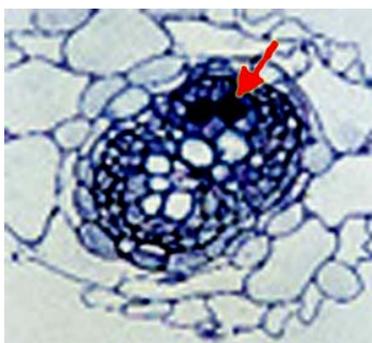
L'avvizzimento batterico causato da *Ralstonia solanacearum* (Figura 1.10) fu descritto per la prima volta alla fine del XIX secolo su patata, tabacco, pomodoro ed arachide in Asia, America del nord e Sud America (OEPP/EPPO Bulletin, 2004).



**Figura 1.10.** Avvizzimento batterico provocato da *Ralstonia solanacearum*. **a**: sintomatologia della malattia su pomodoro; **b**: sintomatologia della malattia su patata; **c**: sintomatologia della malattia su banana; **d** ed **e**: tuberi infetti.

Si tratta di una malattia sistemica particolarmente dannosa nelle zone a clima caldo e umido. La penetrazione nella pianta avviene, tipicamente, attraverso ferite provocate sugli organi ipogei dagli strumenti di lavorazione del terreno, da insetti o nematodi fitofagi, da infezioni fungine o da altre cause naturali e non (ad es. nel punto di origine delle radici secondarie). L'infezione è comunque possibile anche attraverso soluzioni di continuità aperte sulle parti aeree della pianta. Penetrato nell'ospite, il batterio raggiunge le strutture xilematiche, attraverso le quali si diffonde in tutte le direzioni. Lo sviluppo della malattia è favorito da elevata umidità del terreno e da temperature superiori a 20°C (Matta A., 1996).

La colonizzazione sistemica dei tessuti vascolari dell'ospite richiede la produzione, da parte di *Ralstonia solanacearum*, di polisaccaridi extracellulari ad alto peso molecolare (EPS) e di numerose proteine extracellulari (EXPs) (Schell, 2000), che finiscono per occludere lo xilema (Figura 1.11).



**Figura 1.11.** Sezione di fasci vascolari occlusi da cellule di *Ralstonia solanacearum*.

Studi *in planta* di Denny et al. (1991) e Kao et al. (1992) sui mutanti EPS I carenti, evidenziano che tale molecola, ostruendo il sistema vascolare ed alterando il movimento dell'acqua, è la causa dell'appassimento nelle piante infettate. Successivi studi (Araud-Razou et al., 1998; Saile et al., 1997), hanno messo in luce che questi mutanti EPS I carenti manifestano difficoltà nella colonizzazione dei fusti delle piante infettate, pur conservando una leggera patogenicità, dimostrando che gli EPS possono contribuire a ridurre od evitare il riconoscimento delle strutture di superficie batteriche da parte dei meccanismi di difesa delle piante.

*Ralstonia solanacearum*, oltre agli EPS, secerne vari enzimi degradanti della parete cellulare delle piante, tra questi vi sono tre poligalatturonasi (PglA, PehB e PehC) (Huang et al., 1997; Schell et al., 1988), una endoglucanasi (Egl) (Roberts et al., 1988) e una pectin-metilesterasi (Pme) (Tans-Kersten et al., 1998).

Tuttavia, analisi molecolari hanno dimostrato che il ruolo dei singoli enzimi degradatori della parete cellulare nel determinare l'avvizzimento batterico delle piante è relativamente secondario (Genin et al., 2002).

Alcune proteine EXPs, come gli enzimi che attaccano la parete cellulare, vengono secrete attraverso il principale terminale della via secretiva generale (secrezione di tipo II), ed intensificano il tasso e la severità dell'appassimento. Altre proteine EXPs, che hanno un ruolo meno chiaro nella patogenesi e nel provocare la risposta difensiva delle piante, sono trasportate nelle cellule dell'ospite attraverso un sistema di secrezione di tipo III (van Gijsegem et al., 1995; Lindgren, 1997; Cornelis et al., 2000).

*Ralstonia solanacearum* regola il suo sistema di secrezione di tipo III attraverso una complessa cascata di traduzione di segnali che risponde almeno a due stimoli ambientali: il primo è quando i batteri si sviluppano in un mezzo di crescita che riproduce l'apoplasto, il secondo è un segnale d'induzione specifico percepito in presenza di cellule vegetali (Brito et al., 2002; Marena et al., 1998; Schell, 2000). Alcuni patogeni animali sembrano possedere sistemi di percezione che rispondono al contatto con le cellule ospiti, garantendo così alle proteine effettrici di raggiungere la destinazione voluta (Hueck, 1998; Petterson et al., 1996).

Aldon et al., nel 2000 hanno dimostrato, tramite microscopia a fluorescenza di cellule di *Ralstonia solanacearum* marcate con *hrpB-gfp*, che l'espressione del gene regolatore *hrpB* è massima in risposta al contatto fisico dei batteri con cellule o frammenti di parete cellulare di tabacco, pomodoro, *Arabidopsis* e *Medicago truncatula*. L'attivazione contatto-dipendente dei geni regolati *hrpB* assicura la traslocazione delle proteine effettrici solo al momento opportuno e nelle cellule ospiti bersaglio.

La percezione delle cellule vegetali richiede, a monte, la presenza di sensori sulla membrana esterna e, a valle, una catena di traduzione del segnale percepito (Marena et al., 1998; Brito et al., 1999). Il recettore maggiormente indiziato per questa induzione non diffusibile del cluster *hrp* da parte dei composti della parete cellulare della pianta è la proteina della membrana esterna PrhA (Aldon et al., 2000; Marena et al., 1998). PrhA, con i due altri componenti regolatori PrhI e PrhR, forma un sistema di trasduzione del segnale che permette la modulazione dell'espressione del gene *hrp* in risposta ad uno stimolo superficiale della cellula batterica, fornendo al batterio stesso un modo per riconoscere una cellula della pianta ospite (Brito et al., 2002).

Queste osservazioni suggeriscono che *Ralstonia solanacearum* può rispondere specificamente al contatto con le cellule vegetali (Denny, 2000).

La natura dell'induttore vegetale non è ancora conosciuta, tuttavia, dal momento che questo segnale che induce il gene *hrp* è resistente alla proteasi ed al calore, e che risultano forti induttori frammenti della parete sia di piante ospiti che di non

ospiti, Aldon et al. (2000) ipotizzano che si possa trattare di una molecola di natura saccarifica ubiquitaria presente nella frazione pectico/cellulosica.

La natura e l'entità del contatto tra *Ralstonia solanacearum* e le cellule vegetali affinché sia indotto il gene *hrpB* non sono ben chiari. Considerando che oligosaccaridi rilasciati dalla parete cellulare di funghi e piante possono rappresentare potenti segnali molecolari (John et al., 1997), sembra possibile che l'induzione avvenga tramite segnali diffusibili rilasciati dalla parete cellulare attraverso l'azione di poligalatturonasi ed endoglucanasi secrete dal patogeno (Denny, 2000).

Il primo sintomo visibile è un avvizzimento delle foglie, che può interessare anche solo una parte della pianta (appassimento asimmetrico), durante le ore più calde, seguito da ripresa della vegetazione durante la notte; col progredire della malattia l'avvizzimento diventa irreversibile e porta nel giro di poco tempo la pianta al collasso.

Nelle prime fasi di sviluppo della malattia si può osservare una striatura di colore marrone sul fusto a circa 2,5 cm sopra la linea del suolo, mentre le foglie assumono una tonalità bronzea, con epinastia del picciolo. Se si incide la pianta si può osservare la fuoriuscita dai fasci vascolari di aggregati batterici viscosi di colore bianco. Immergendo in un contenitore con acqua un fusto di patata infetto, si nota la spontanea fuoriuscita di queste masse batteriche mucillaginose sotto forma di tipici filamenti, tale fenomeno non viene prodotto da altre specie batteriche, per cui il test assume valore diagnostico presuntivo in campo.

In funzione dello stato di sviluppo della malattia possono essere visibili sintomi esterni sui tuberi, anche se tali manifestazioni possono essere confuse con quelle del marciume ad anello dovuto a *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* (EPPO/CABI, 1996). L'infezione di *Ralstonia solanacearum* può essere distinta grazie al tipico essudato batterico che spesso fuoriesce dalle gemme e dall'attaccatura del fusto dei tuberi infetti, che quando l'essudato si secca, viene ricoperto da una massa di terra.

Tagliando i tuberi infetti si rivela imbrunimento e necrosi dell'anello vascolare e dei tessuti immediatamente adiacenti, qualche minuto dopo il taglio in genere fuoriesce dall'anello di fasci vascolari un fluido cremoso, mentre nel caso del marciume ad anello dovuto a *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, il tubero deve essere premuto per osservare la fuoriuscita di una massa giallognola di tessuto vascolare disfatto misto a mucillagine batterica.

Infezioni a partire dalle lenticelle sui tuberi, provocano sintomi atipici quali macchie necrotiche dell'epidermide (Rodrigues-Neto et al., 1984).

Piante con sintomi fogliari causati da *Ralstonia solanacearum* possono produrre sia tuberi sani che infetti, mentre piante che non mostrano nessun segno della malattia possono a volte produrre tuberi infetti.

L'isolamento del batterio da materiale con evidenti sintomi dell'infezione è facilmente effettuato usando un substrato YPGA non selettivo, mentre sono disponibili diversi substrati colturali selettivi per l'isolamento del patogeno da materiale infetto in maniera latente o da substrati difficili come acque superficiali, suoli o rifiuti.

Per l'identificazione del patogeno si possono effettuare test biochimici, analisi degli acidi grassi, RFLP e analisi proteiche (Seal et al., 1993 e 1994).

La diagnosi di infezioni latenti può essere effettuata mediante immunofluorescenza indiretta (IFAS), piastraggio su substrato SMSA combinato con un saggio PCR, test ELISA o ibridazione con fluorescenza *in-situ*, prelevando un campione di almeno 200 tuberi per ogni 25 tonnellate di prodotto; come ulteriore conferma, si possono eseguire test di patogenicità sul pomodoro per confermare i campioni positivi (OEPP/EPPO Bulletin, 2004).

#### **1.4.1 Diffusione del patogeno**

La diffusione naturale della maggior parte delle razze di *Ralstonia solanacearum*, è molto limitata. La disseminazione del patogeno su brevi e grandi distanze avviene con particelle di terreno contaminato, materiale di propagazione infetto, oppure anche ad opera di insetti o dell'acqua di irrigazione o di pioggia (Matta A., 1996).

La razza 2, agente causale della malattia del moko della banana, possiede un alto potenziale di diffusione naturale, grazie all'azione degli insetti. La razza 3 può diffondersi tramite le acque superficiali, quando piante di *Solanum dulcamara* infette crescono con le radici aeree in acqua; il batterio può in seguito essere diffuso su altri ospiti quando l'acqua contaminata è utilizzata per l'irrigazione (Olsson, 1976).

Il principale mezzo di diffusione del patogeno nel mondo è il commercio di materiale di propagazione infetto in maniera latente, solo per l'arachide è stata confermata l'infezione naturale di seme, sporadiche segnalazioni si hanno per pomodoro, peperone e melanzana. Le infezioni latenti dei tuberi di patata possono essere dovute alle condizioni climatiche sfavorevoli, a cultivar parzialmente resistenti oppure alla bassa virulenza di alcuni ceppi di patogeno (Persley, 1986b; Kelman et al., 1994; Singh, 1995).

#### **1.4.2 Importanza economica della malattia**

Il batterio fitopatogeno *Ralstonia solanacearum* costituisce un serio ostacolo alle coltivazioni di molte Solanacee sia nelle regioni tropicali che in quelle temperate. I maggiori danni economici sono descritti su patata, tabacco e pomodoro nel Sud-Est degli USA, Indonesia, Brasile, Colombia e Sud Africa. Nelle Filippine, nel periodo 1966-1968, si sono avute perdite di raccolto di circa il 15% per il pomodoro, 10% per melanzana e peperone, e 2-5% per il tabacco (Zehr, 1969).

Nella regione amazzonica del Perù, circa metà delle piantagioni di banana sono infette e la rapida diffusione del patogeno minaccia di distruggere le piantagioni della giungla peruviana (French et al., 1968). In India, in alcuni casi, si è arrivati a perdite di produzione totali per il pomodoro; in Israele, le perdite si verificarono soprattutto in patata, e sono state più ingenti per le coltivazioni primaverili rispetto alle invernali, per via delle più alte temperature (Volcani et al., 1960). Grosse perdite su patata sono state descritte anche in Grecia nel periodo 1951-1953 (Zachos, 1957).

La gravità della malattia è maggiore se *Ralstonia solanacearum* si trova in associazione con nematodi radicali. In tabacco, l'infestazione da nematodi modifica la fisiologia delle piante, causando suscettibilità all'avvizzimento batterico (Chen, 1984). Esperimenti in India mostrarono che i danni prodotti dall'associazione tra *Ralstonia solanacearum* e il nematode galligeno *Meloidogyne javanica*, sono maggiori dei danni prodotti singolarmente dai patogeni (Sitaramaiah et al., 1984).

#### **1.4.3 Il controllo della malattia**

La possibilità che *Ralstonia solanacearum* selezioni razze adattate a differenti condizioni ambientali, rappresenta un reale pericolo per le coltivazioni europee e mediterranee di patata e pomodoro. Da questo punto di vista le zone più calde di queste aree sono quelle più esposte al rischio. La razza 3 (biovar 2) è quella che ha la maggior possibilità di adattarsi ai climi temperati, dove può arrivare attraverso importazioni di patate e tuberi-seme infetti in maniera latente, provenienti da aree dove è presente la malattia. L'introduzione di patate da foraggio secco o ad uso industriale infette può essere una fonte di inoculo qualora tale materiale possa essere impiegato in agricoltura.

Il controllo dell'avvizzimento batterico è molto difficile, specialmente quello causato dalla razza 1, a causa del suo ampio *range* di piante ospiti. Il controllo chimico del patogeno è poco efficace. Disinfestazioni del suolo mostrano effetti molto limitati (Murakoshi et al., 1984); antibiotici quali streptomina, ampicillina, tetraciclina e penicilline difficilmente hanno effetto (Farag et al., 1982) o addirittura aumentano

l'incidenza della malattia, come nel caso della streptomicina in prove effettuate in Egitto, (Farag et al., 1986).

Il controllo biologico è ancora in fase sperimentale, ma qualche risultato positivo si è avuto con l'impiego di antagonisti quali *Bacillus polymyxa* e *Pseudomonas fluorescens* in prove di laboratorio nelle Filippine (Aspiras et al., 1985).

In Cile *Pseudomonas fluorescens* ha dato risultati positivi nel controllo di *Ralstonia solanacearum* su coltivazioni di patata e prove di laboratorio. Alcuni studi hanno impiegato anche mutanti avirulenti del batterio (Ciampi-Panno et al., 1989; Gallardo et al., 1989; Hartman et al., 1994).

Il miglioramento genetico ha fornito diverse cultivar di patata ed altre colture, resistenti al patogeno, ma la molteplicità di razze e ceppi del patogeno rendono difficile il loro utilizzo nei differenti paesi. Cultivar di patata sviluppate in Colombia utilizzando come materiale resistente *Solanum phureja* e *Solanum demissum* hanno mostrato resistenza a *Ralstonia solanacearum* in 7 diversi paesi (French, 1985; Hartman et al., 1994).

L'avvicendamento colturale della patata con mais o fagiolo, in certi casi, riduce la densità d'inoculo e lo sviluppo della malattia (Autrique et al., 1987), ma il ritrovamento di microlesioni sulle piante evidenzia che *Ralstonia solanacearum* può conservarsi in maniera silente su tali colture (Granada et al., 1983).

Il frazionamento dei tuberi seme può incrementare l'incidenza della malattia di 2,5 volte e la perdita in campo di circa il 40% (Vijayakumar et al., 1985).

Rotazioni lunghe (5-7 anni) con specie non suscettibili sono raccomandabili in casi di aree infestate dal patogeno. La variazione del pH del suolo, abbassamento a valori di 4-5 in estate e successivo innalzamento a 6 in autunno, mediante l'uso di appropriati concimi, può eradicare il patogeno dal suolo. La malattia è più dannosa in suoli sabbiosi, argillosi e torbosi, mentre non è stata mai riscontrata in terreni di marna. In Australia la razza 3 è sopravvissuta per 2-3 anni in terreni incolti grazie a residui vegetali di piante ospiti e tuberi infetti presenti negli strati più profondi di suolo (Graham et al., 1979a; Graham et al., 1979b).

Per evitare la diffusione della razza 3 nelle regioni a clima temperato è necessario:

- a. usare tuberi seme di patate sani e certificati esenti dal patogeno;
- b. rapida e puntuale identificazione e denuncia della presenza del patogeno;
- c. applicazione delle misure di quarantena sui campi e sulle aziende contaminate;
- d. sufficiente rotazione delle coltivazioni;
- e. controllo delle erbe infestanti ospiti del patogeno;
- f. controllo delle infestazioni di nematodi;

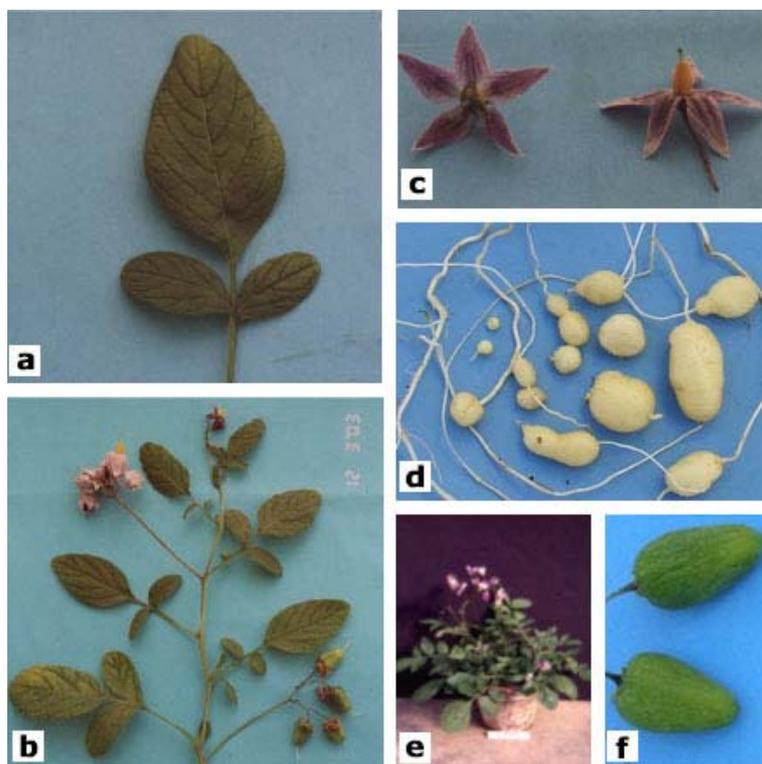
- g. evitare l'utilizzo di acqua di superficie per l'irrigazione;
- h. sensibilizzazione degli agricoltori nei confronti del problema.

### 1.5 LA SPECIE SELVATICA *SOLANUM COMMERSONII*

Le specie selvatiche di patata rappresentano un'utile fonte di geni non presenti nelle varietà coltivate, nonché di diversità allelica necessaria per ottenere l'eterosi al fine di migliorare la produzione di tuberi ed altri caratteri quantitativi (Hanneman 1989). Diverse specie selvatiche, quali *Solanum circaeifolium*, *Solanum vernei*, *Solanum sparsipilum*, *Solanum chacoense*, e *Solanum hougasii*, sono state utilizzate nel miglioramento genetico della patata come fonte di resistenza a diversi agenti patogeni ed insetti (Louwes et al., 1992; Watanabe et al., 1992; Ortiz et al., 1997; Brown et al., 1999).

La maggior parte delle specie selvatiche del genere *Solanum* però è poco utilizzata a causa dell'enorme lavoro di *breeding* necessario per eliminare i caratteri indesiderati che si trasmettono, insieme a quelli utili, dalla specie selvatica (Pavek et al., 2001).

La specie diploide *Solanum commersonii* Dun. (Figura 1.12) è una specie selvatica che tuberizza, appartenente alla sezione *Petota* Dumontier, sottosezione *Potato* G.Don del genere *Solanum*; essa è diffusa come specie selvatica in Uruguay, dove cresce spontaneamente in campi incolti.



**Figura 1.12.** *Solanum commersonii*:  
**a:** particolare della foglia  
**b:** branca della pianta  
**c:** particolare del fiore  
**d:** tuberi  
**e:** pianta adulta  
**f:** bacche.

*Solanum commersonii* è una delle maggiori risorse per il miglioramento genetico della patata, sia per la resistenza alle basse temperature e ad alcuni comuni patogeni della patata (Hawkes, 1992), che per l'elevata variabilità genetica (Pianzola et al., 2005).

Vazquez et al. (1997), da una dettagliata analisi fitochimica condotta su piante di *Solanum commersonii* proveniente dall'Uruguay, hanno evidenziato la presenza dei glicoalcaloidi demissina ( $\Delta^5$ -demissina), commersonina ( $\Delta^5$ -commersonina) e tomatina. Questi metaboliti secondari sono attivi nei confronti di insetti quali *Leptinotarsa decemlineata* ed *Empoasca fabae* (Tingey et al., 1978; Tingey, 1984). *Solanum commersonii*, inoltre, è stata descritta come resistente a *Ralstonia solanacearum*, agente causale dell'avvizzimento batterico della patata (La Ferriere et al., 1999).

L'utilizzo di *Solanum commersonii* per il miglioramento genetico della patata è, però, reso difficile dalla presenza di numerosi caratteri indesiderati come l'alto contenuto in glicoalcaloidi dei tuberi; la presenza di lunghi stoloni; la mancanza di tuberizzazione in condizioni di giorno lungo e l'isolamento sessuale da cloni aploidi di *Solanum tuberosum*, a causa di barriere di incompatibilità post-zigotica (Johnston et al., 1980; Johnston et al., 1982). Nel 1997 Carputo et al., hanno sviluppato uno schema di incrocio basato sulle ploidie ponte per superare queste barriere.

## **1.6 GENI DI RESISTENZA IN PIANTA**

I geni di resistenza sono i componenti chiave nei sistemi di difesa vegetali perché codificano per prodotti che possono direttamente o indirettamente percepire la presenza di un patogeno ed innescare le risposte di difesa nella pianta. Più di 40 geni di resistenza provenienti da varietà monocotiledoni e dicotiledoni sono stati clonati fino ad oggi (Martin et al., 2003; Hammond-Kosak et al., 2003). Questi geni conferiscono resistenza a diversi patogeni come batteri, funghi, virus, insetti e nematodi.

I geni di resistenza sono composti da diversi domini proteici molto spesso comuni e conservati come il CC (Coiled-Coil), NBS (Nucleotide Binding Site), TIR (Toll-interleukin region), LRR (Leucine Rich Repeats), LZ (Leucine Zipper) (Meyers et al., 1999; Kuang et al., 2005). I motivi CC sono sequenze amminoacidiche che portano alla produzione di  $\alpha$ -eliche, importantissime nelle interazioni proteina-proteina ed in particolare nella formazione di dimeri od oligomeri. I domini NBS hanno la funzione di legare nucleotidi e quindi avviare cascate di fosforilazioni. I TIR hanno funzione citoplasmatica e sono importanti nella trasduzione del segnale (Fluhr, 2001; Martin

et al., 2003). I domini LRR sono implicati nelle interazioni proteina-proteina e raramente nella formazione di oligomeri.

I geni di resistenza possono essere classificati in cinque classi, in base ad omologie di sequenza, e ognuna è caratterizzata da combinazioni di differenti. La classe più ampia è costituita da recettori che hanno come dominio funzionale una NBS-LRR (Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat). Questa classe può essere ulteriormente suddivisa in due gruppi in base alle caratteristiche strutturali del dominio N-terminale: il primo presenta un omologo al dominio Toll di *Drosophila* e al recettore dell'interleuchina-1 dei mammiferi ed è detto TNL (McHale et al., 2006) e l'altro, detto CNL, contiene un dominio Coiled-Coil (Dangl et al., 2001).

La struttura ipotizzata per questa classe di geni lascia pensare che il recettore rileva la presenza del patogeno e attiva direttamente la traduzione del segnale all'interno della cellula senza intermediari aggiuntivi. A questo gruppo appartiene ad esempio il gene *Mi* che conferisce resistenza a due artropodi *Meloidogyne incognita* e *Macrosiphum euphorbiae* (Vos et al., 1998) e il gene N di tabacco che dà resistenza al Virus del Mosaico del Tabacco (TMV).

Nella seconda classe si ritrovano tutti i geni *Cf* che conferiscono resistenza a *Cladosporium fulvum*. I geni di resistenza *Cf* presentano una porzione transmembrana (TM) e una regione LRR extra-cellulare che probabilmente lega il prodotto del gene *avr*.

Nella terza classe si trovano quei geni che hanno similarità con *Pto* e che hanno come dominio funzionale una chinasi. Il gene *Pto*, in pomodoro, codifica per una serina-treonina chinasi e conferisce resistenza nei confronti di isolati di *Pseudomonas syringae* che esprimono il gene di avirulenza *avrPto* o *avrB* (Martin et al., 1993). Questo gene è importante perché è il primo gene di resistenza isolato nelle Solanaceae e perché trasduce direttamente il segnale dall'esterno all'interno della cellula vegetale. All'interno della cellula si ha l'attivazione di *Prf*, il quale attraverso delle fosforilazioni porta all'attivazione di geni di difesa specifici.

La quarta classe comprende geni come *Xa21* (che conferisce resistenza a *Xanthomonas oryzae*) che presentano come domini funzionali una chinasi citoplasmatica e un recettore transmembrana che presenta una lunga regione LRR extracellulare.

Nella quinta classe si trovano geni che codificano piccole proteine di membrana con un dominio coiled coil minimo e con nessun'altra omologia con proteine conosciute. Un esempio di gene appartenente a questa classe è l'*RPW8* di *Arabidopsis* (Dangl et al., 2001).

### 1.6.1 Geni di resistenza a *Ralstonia solanacearum*

Nel 2002 Deslandes et al. hanno identificato in *Arabidopsis thaliana* due geni capaci di conferire resistenza a diversi ceppi di *Ralstonia solanacearum*. Sia l'allele recessivo del gene (RRS1-R) che conferisce la resistenza, che l'allele dominante (RRS1-S) che conferisce suscettibilità, codificano per proteine molto simili, ma di differente lunghezza.

L'analisi della sequenza di aminoacidi della proteina RRS1 rileva una struttura inedita per i geni di resistenza delle piante, con la presenza di numerosi domini strutturali già descritti (TIR, NBS e LRR) in associazione al fattore di trascrizione WRKY (Figura 1.13).



**Figura 1.13.** Composizione in aminoacidi dei geni RRS1-R ed RRS1-S. i riquadri evidenziano i differenti domini conservati, mentre in nero sono riportate le differenze aminoacidiche tra le due proteine.

All'estremità NH<sub>2</sub>- terminale della sequenza di aminoacidi della proteina RRS-1 vi è un dominio TIR che, sulla base di similitudini strutturali e funzionali con il recettore IL-1 dei mammiferi e il dominio di segnalazione Toll di *Drosophila*, può giocare un ruolo nella specificità del gene di resistenza e nel meccanismo di traduzione del segnale di resistenza; successivamente vi è la presenza di un sito di legame di nucleotidi (NBS), che contiene un motivo altamente conservato tra le proteine che legano ATP o GTP ed, infine, vi è un dominio LRR, composto da 6 motivi ripetuti imperfetti di 22/25 aminoacidi (Deslandes et al., 2002).

La struttura della proteina RRS-1 si completa con il dominio strutturale WRKY, caratterizzato da un motivo di 60 aminoacidi tipico dei fattori trascrizionali delle piante, coinvolto in numerosi processi biologici. Deslandes et al. (2002)

suggeriscono che tale dominio possa avere un ruolo di regolazione nell'espressione delle vie biosintetiche che portano alla reazione di resistenza. Questo potenziale ruolo nell'attivazione della trascrizione è suffragato dalla presenza di un segnale di localizzazione nucleare (NLS).

Sebbene RRS1-R è geneticamente definito come un allele recessivo, esso agisce come un gene di resistenza dominante. La struttura modulare dei prodotti del gene RRS1, suggerisce una duplice funzione della proteina. Infatti l'estremità NH<sub>2</sub>-terminale può legare un segnale derivato dal patogeno, attraverso l'azione del motivo LRR, conosciuto per la sua capacità di mediare l'interazione proteina-proteina ed attivare, quindi, il fattore di trascrizione WRKY localizzato all'estremità C-terminale. Quest'ultimo, direttamente o tramite un segnale a cascata, attiverebbe i geni di difesa, che portano la pianta alla risposta di resistenza (Deslandes et al., 2002).

Lavori recenti hanno sottolineato l'importanza delle proteine contenenti WRKY e siti di legame per il DNA nel riconoscimento dei patogeni. Infatti alcuni fattori WRKY si trovano a monte dei prodotti dei geni di difesa come le proteine correlate alla patogenesi (PR-proteins) o il regolatore positivo della resistenza inducibile (NPR1), che ne regola l'espressione (Yang et al., 1999; Yu et al., 1999).

L'analisi del trascrittoma di *Arabidopsis thaliana*, mentre era in atto una manifestazione della resistenza sistemica acquisita (SAR) (Ryals et al., 1996), ha portato all'identificazione di un fattore di trascrizione WRKY, come il potenziale comune dei geni del regulone PR-1, il quale contiene proteine correlate alla patogenesi note e geni che funzionano durante la risposta di difesa (Maleck et al., 2000).

L'identificazione di RRS1-R ed RRS1-S descrive un tipo di resistenza nel quale entrambi gli alleli sono funzionali e possono competere per un dato DNA bersaglio o per un fattore limitante necessario per la crescita/propagazione di un patogeno o per il manifestarsi di resistenza/suscettibilità nelle piante infette. Attualmente RRS1-R è il primo gene R che conferisce resistenza a *Ralstonia solanacearum* (Deslandes et al., 2002).

### **1.7 L'ANALISI DEI PROFILI DI TRASCRIZIONE MEDIANTE cDNA AFLP-TP**

Diverse ricerche su DNA genomico e sul cDNA hanno permesso l'identificazione di numerosi geni per i quali, però non è nota la funzione biologica. L'analisi dell'espressione genica è un efficace strumento per determinare la funzione dei geni ed il loro profilo di espressione spaziale e temporale. La tecnica dei *microarray* è stata utilizzata con successo a tale scopo in numerosi studi (Breyne et al., 2001), e

rapidamente è diventata la tecnica più usata per l'analisi del trascrittoma. Tuttavia il suo utilizzo è limitato ad un ristretto numero di organismi, a causa della mancanza di un rappresentativo set di geni utilizzabili per tutte le specie. Tale tecnica presenta, inoltre, una limitata sensibilità e una difficoltà nel discriminare i trascritti di geni omologhi, due problemi intrinseci delle tecniche basate sull'ibridazione.

Metodiche alternative per l'analisi dell'espressione genica, basate sul sequenziamento o sull'amplificazione mediante PCR di frammenti dei trascritti, permettono di superare alcuni dei limiti della tecnica *microarray*, e sono state usate con successo in molti differenti organismi (Breyne et al., 2001). La metodica cDNA-AFLP (Bachem et al., 1996) e le tecniche da essa derivate, sono state ampiamente usate per la scoperta di geni (Durrant et al., 2000; Qui net al., 2000; Sutcliffe et al., 2000; van der Biezen et al., 2000; Kornmann et al., 2001).

Nel 2003, basandosi su tale metodica, Breyne et al. hanno messo appunto una tecnica efficace e riproducibile per l'analisi quantitativa dell'espressione genica la cDNA-AFLP-TP. La metodica consiste essenzialmente nel generare un unico frammento di restrizione per ogni RNA messaggero retrotrascritto, seguita da una serie di amplificazioni selettive di sottoinsiemi di questi frammenti, che vengono poi separati e visualizzati su gel ad alta risoluzione. Come per ogni altro studio di trascrittomica, la ricerca di geni differenzialmente espressi in un genoma basata sul cDNA-AFLP, richiede da un lato che siano analizzati quanti più trascritti possibili in un'unica procedura, e dall'altro che i dati ottenuti siano abbastanza informativi da consentire la caratterizzazione dei trascritti.

Le modifiche dell'originario protocollo di cDNA-AFLP proposto da Bachem et al. sono essenzialmente 3:

1. il numero di frammenti per ogni trascritto è stato ridotto ad 1, in modo da ridurre significativamente il numero di frammenti totali da analizzare e, soprattutto, consentire una valutazione quantitativa dei geni differenzialmente espressi.
2. gli enzimi di restrizione sono stati scelti per garantire l'ottenimento di frammenti di lunghezza sufficiente e derivati, almeno parzialmente, dalla regione codificante, così da facilitare la successiva caratterizzazione dei trascritti.
3. la scelta del numero di nucleotidi selettivi e delle combinazioni di primer da utilizzare, in modo da visualizzare e selezionare sia i geni maggiormente espressi, ma anche quelli meno abbondanti. La sensibilità della tecnica è stata ampliata riducendo la complessità della miscela

iniziale, che è stata suddivisa in due sottoinsiemi, e aggiungendo l'appropriato numero di nucleotidi selettivi ai primer. Così facendo si amplificano meno frammenti e così quelli provenienti da trascritti meno abbondanti sono meglio rappresentati.

La tecnica così perfezionata può essere applicata su ogni sistema biologico, soprattutto quando sono carenti le informazioni di sequenza sul genoma. L'analisi quantitativa dei profili di espressione, inoltre, conduce a dati del tutto comparabili a quelli ottenuti dai *microarray*, consentendo l'utilizzo della tecnica non solo per l'identificazione di geni, ma anche per studi di espressione genica globale.

## 2 SCOPO DELLA TESI

*Ralstonia solanacearum*, per via della sua distruttività, della capacità di sopravvivere da saprofita nel suolo per lunghi periodi di tempo e per la capacità di causare malattia in numerose specie coltivate appartenenti a diverse famiglie botaniche, tra le quali, pomodoro e patata, è un batterio fitopatogeno tra i più pericolosi.

Il rischio che il batterio, ed in particolare la razza 3, selezioni ceppi capaci di adattarsi a condizioni climatiche di tipo mediterraneo e/o continentale, rappresenta un reale pericolo per le coltivazioni europee di patata.

La difesa delle colture dai batteri fitopatogeni risulta alquanto critica per carenza di principi attivi efficaci e per le capacità di diffusione nell'ambiente dei patogeni; l'unica metodologia efficace di contenimento è il ricorso a mezzi di difesa agronomici, tra cui assume particolare importanza il miglioramento genetico delle specie coltivate mediante introduzione di geni di resistenza.

Pur essendo riportati in letteratura specie selvatiche di patata (*Solanum chacoense*, *Solanum sparsipillum*, *Solanum multidissectum*, *Solanum commersonii*, *Solanum stenotomum* e *Solanum phureja*) resistenti o altamente tolleranti a tale patogeno, le determinanti genetiche di tale controllo non sono ancora note, mentre un gene di resistenza, il gene RRS1, che conferisce resistenza a parecchi ceppi di *Ralstonia solanacearum*, è stato individuato, clonato e sequenziato in *Arabidopsis thaliana*.

Gli scopi dell'attività della presente tesi di dottorato si possono riassumere in due punti principali:

- A. Individuazione dei putativi geni coinvolti nella resistenza al batterio *Ralstonia solanacearum* in patata, da utilizzare per future strategie di *breeding* volte ad ottenere cultivar resistenti a tale avversità;
- B. Isolamento e caratterizzazione chimica dei lipopolisaccaridi e dei metaboliti fitotossici prodotti da tale microrganismo durante l'interazione con la pianta, e la valutazione del loro effetto *in vivo* su piante ospiti e non ospiti.

A tal fine si è utilizzata la razza 3 del batterio fitopatogeno *Ralstonia solanacearum*, testata su materiale vegetale resistente rappresentato dalla specie selvatica di patata *Solanum commersonii* e sul materiale vegetale suscettibile rappresentato dalla varietà "Blondy" della patata coltivata (*Solanum tuberosum*).

### 3 MATERIALI E METODI

#### 3.1 MATERIALE VEGETALE

Il materiale vegetale costituito dalla specie coltivata di patata *Solanum tuberosum* cv. Blondy suscettibile e dalla specie selvatica *Solanum commersonii* resistente è stato fornito dal Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, sezione di Genetica Vegetale.

Dal momento che gli studi molecolari da svolgere imponevano l'utilizzo di materiale vegetale uniforme dal punto di vista genetico, le due specie utilizzate per l'inoculo con il patogeno sono state ottenute per micropropagazione vegetativa *in vitro*, a partire da un'unica pianta rispettivamente di *Solanum tuberosum* cv Blondy e *Solanum commersonii*, allevate poi *in vivo* nelle camere di crescita del Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, sezione di Genetica Vegetale.

La propagazione delle piantine è stata condotta in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare. Le piantine sono state ottenute a partire da microtalee, formate da una porzione di fusto recante una gemma ascellare, collocate per la radicazione in appositi vasetti di plastica sterili richiudibili, contenenti substrato agarizzato a base di sali di Murashige & Skoog con vitamine (Tabella 3.1). Prima dell'uso, il substrato, il cui pH è stato portato a 5,8 con una soluzione di KOH 1M, è stato sterilizzato mediante autoclave (20 minuti a 121°C).

**Tabella 3.1.** Ricetta del substrato di crescita per micropropagazione.

Sostanza/Reagente	Quantità
Sali di Murashige & Skoog + vitamine	4,3 gr
Saccarosio	30 gr
Agar	9 gr
Acqua distillata per un volume di	1000 ml

La radicazione delle microtalee e la crescita delle piantine è avvenuta in apposite camere di crescita, con condizioni controllate di illuminazione (18 ore di luce e 6 ore di buio) e temperatura (24°C). Le piantine, una volta raggiunti i 5 cm di altezza, sono state trapiantate in vasetti di 6 cm di diametro contenenti terriccio sterilizzato e, successivamente, sottoposte ad un periodo di acclimatamento in un'apposita cella condizionata, durante il quale è stata prestata particolare attenzione al tasso di umidità che gradualmente passava dal 100% all'85%.

### **3.2 TEST DI PATOGENICITÀ *IN VIVO* E CAMPIONAMENTO DEL MATERIALE VERDE**

Per lo svolgimento delle prove sperimentali è stata utilizzata la razza 3 del batterio fitopatogeno *Ralstonia Solanacearum*, fornita dal Professor Astolfo Zoina del Dipartimento di Arboricoltura Botanica e Patologia Vegetale dell'Università degli studi di Napoli Federico II.

Quando le piantine hanno raggiunto i 10 cm di altezza, sono state inoculate con 2 ml di una sospensione del batterio fitopatogeno alla concentrazione di  $2,5 \times 10^7$  cfu. Al fine di facilitare la penetrazione del batterio, prima dell'inoculo, l'apparato radicale è stato ferito artificialmente con un bisturi.

Tutte le fasi dell'esperimento condotto in cella condizionata sono state svolte in condizioni standardizzate di luce (12 ore di luce e 12 ore di buio), temperatura (21°C durante le ore di buio e 27/28°C durante le ore di luce) ed umidità (85%). Per valutare l'effettiva virulenza del patogeno, a 5 piantine di *Solanum tuberosum* cv. Blondy e 5 piantine di *Solanum commersonii* è stato inoculato direttamente nei fasci vascolare come sospensione batterica, mentre altrettante piante, utilizzate come testimoni, non sono state inoculate né attraverso le radici né attraverso i fasci vascolari. Nelle successive 24/48 ore è stato monitorato il manifestarsi dei classici sintomi della malattia sulle piante di *Solanum tuberosum* cv. Blondy così inoculate. Durante il test è stato effettuato il campionamento del materiale verde sottoposto ai due diversi trattamenti, controllo non inoculato e campione inoculato con il batterio, a 12, 24, 48 e 72 ore dall'inoculo.

Il materiale raccolto è stato immediatamente immerso in azoto liquido (-196°C) e successivamente, fino al momento dell'utilizzo per i successivi esperimenti, riposto in un congelatore alla temperatura di -80°C.

Come ulteriore verifica dell'esito del test, sulle piantine inoculate e sui testimoni, che non sono stati precedentemente campionati, sono stati rilevati i sintomi della malattia dopo 6, 9 e 12 giorni dall'inoculo.

### **3.3 ANALISI MOLECOLARI**

#### **3.3.1 Estrazione dell'mRNA**

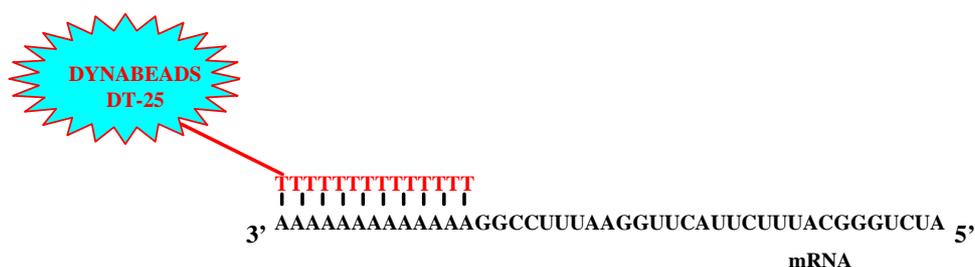
L'estrazione dell'RNA ed il successivo isolamento dell'RNA messaggero (mRNA), sono stati condotti simultaneamente tramite l'utilizzo del Dynabeads® mRNA DIRECT™ KIT.

La procedura è basata sull'appaiamento tra le basi azotate adenina e timina; brevi sequenze di oligonucleotidi contenenti come base azotata la timina (oligo-dT), sono

legati in maniera covalente sulla superficie di sferette superparamagnetiche o Dynabeads (Figura 3.1).

In condizioni ottimali, la coda di adenine, che negli Eucarioti è aggiunta all'mRNA nelle modifiche post-trascrizionali, si ibriderà all'oligo-dT delle sfere magnetiche, consentendo una semplice e rapida estrazione dell'mRNA, utilizzando un apposito magnete.

Il DNA, le proteine e gli altri tipi di RNA che non contengono la coda di poli-A, non si legheranno alle sferette e saranno quindi eliminate con i successivi lavaggi.



**Figura 3.1.** Rappresentazione schematica dell'isolamento selettivo degli mRNA tramite l'utilizzo del Dynabeads® mRNA DIRECTTM KIT.

La tecnica, operando con lisati cellulari nativi, prevede l'utilizzo di agenti inibitori delle RNasi, per evitare l'azione degradativa di tali enzimi, tale accorgimento insieme all'utilizzo di stringenti condizioni di ibridizzazione e successivi passaggi di lavaggio consentono l'isolamento di mRNA puro ed integro a partire direttamente da campioni di tessuto.

Nel presente studio si è partiti da una quantità di tessuto vegetale fresco pari a 50/100 mg, utilizzando 250 µl di una sospensione contenente 5 mg/ml di Dynabeads.

Procedura:

1. Risospendere le Dynabeads Oligo(dT<sub>25</sub>) prima dell'uso con l'aiuto di una micropipetta;
2. Trasferire il volume desiderato (250 µl) di Dynabeads Oligo(dT<sub>25</sub>) dal tubo stock ad un nuovo tubo *Rnase-free* da 1,5 ml, e riporre questo sul magnete per almeno 30 secondi;
3. Trascorsi i 30 secondi, eliminare il surnatante;
4. Togliere il tubo dal magnete e lavare le Dynabeads Oligo(dT<sub>25</sub>) con un ugual volume di *Lysis/Binding Buffer*;
5. Inserire 750 µl di *Lysis/Binding Buffer* in nuovi tubi *Rnase-free* da 2 ml;
6. Macinare 300 mg di tessuto vegetale fresco o congelato a -80°C, con l'aiuto dell'azoto liquido e di un mortaio sterile;

7. Trasferire la polvere ottenuta nel tubo con il *Lysis/Binding Buffer* ed agitare con l'aiuto di un agitatore fino ad ottenere la completa lisi (circa 2 minuti);
8. Porre le Dynabeads Oligo(dT<sub>25</sub>) sul magnete ed attendere che il surnatante si separi bene;
9. Centrifugare il lisato a 17900 x g per 1 minuto, in modo da eliminare i detriti più grossi;
10. Eliminare il surnatante dalle Dynabeads Oligo(dT<sub>25</sub>) e togliere il tubo che le contiene dal magnete;
11. Inserire il supernatante del lisato nel tubo con le Dynabeads Oligo(dT<sub>25</sub>) ed omogenizzare bene il tutto;
12. Incubare la sospensione ottenuta in continua agitazione a temperatura ambiente per 5-10 minuti, in modo da favorire l'annealing tra la coda di poli-A dell'mRNA e l'estremità con l'oligo dT delle Dynabeads.
13. Riporre il tubo sul magnete per 2-5 minuti e rimuovere il surnatante;
14. Togliere il tubo dal magnete e lavare le Dynabeads Oligo(dT<sub>25</sub>) con 1,35 ml di *Washing Buffer A* a temperatura ambiente;
15. Ripetere i passaggi 13 e 14;
16. Riporre il tubo sul magnete per 2-5 minuti e rimuovere il surnatante;
17. Togliere il tubo dal magnete e lavare le Dynabeads Oligo(dT<sub>25</sub>) con 1,2 ml di *Washing Buffer B* a temperatura ambiente;
18. Riporre il tubo sul magnete per 2-5 minuti e rimuovere il surnatante;
19. Aggiungere 25 µl di *Elution Solution* ed incubare il tutto a 65-80 °C per 2 minuti;
20. Porre il tubo immediatamente sul magnete a trasferire il surnatante in un nuovo tubo *Rnase-free* da 0,5 ml, e porre il tubo immediatamente in ghiaccio e successivamente a -80°C.

### **Buffer Utilizzati**

#### *Lysis/Binding Buffer*

100 mM Tris-HCl (pH 7,5); 500 mM LiCl; 10 mM EDTA (pH 8); 1% LiDS; 5 mM Ditiotreitolo (DTT)

#### *Washing Buffer A*

10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM LiCl; 1 mM EDTA pH 8; 0,1% LiDS

#### *Washing Buffer B*

10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM LiCl; 1 mM EDTA (pH 8)

#### *Elution Solution*

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

### **3.3.2 Quantizzazione degli acidi nucleici**

La quantizzazione degli acidi nucleici presenti nelle soluzioni utilizzate nel corso delle analisi molecolari, nonché la loro dimensione in bp, sono stati determinati mediante valutazione dell'intensità della fluorescenza emessa dal Bromuro di Etidio. Tale metodica risulta rapida ed accurata anche con concentrazioni iniziali di DNA inferiori ai 250 ng/ml. Il principio del metodo è quello di utilizzare la fluorescenza emessa dalle molecole di bromuro di etidio intercalate nel DNA in seguito all'eccitazione indotta dai raggi UV. Poiché l'intensità della fluorescenza è proporzionale alla massa totale del DNA, la quantità di DNA presente nel campione può essere stimata per paragone con la fluorescenza emessa da dei campioni standard a quantità nota di DNA. Con questo metodo si possono rilevare anche quantità di DNA molto piccole dell'ordine di 1-5 ng (Sambrook J. Et al., 2001).

A tale scopo è stato preparato un gel di agarosio in tampone TAE, con percentuale di agarosio dell'1%, a cui sono stati aggiunti, prima della solidificazione, 0,03 µl/ml di Bromuro di Etidio. I campioni da visualizzare su gel sono stati preparati aggiungendo a 3-10 µl di DNA, a seconda della concentrazione che ci si aspettava, 2 µl di colorante, e 5 µl di acqua. Il colorante ha la duplice funzione di tracciare il percorso del campione e di facilitarne il caricamento nel pozzetto del gel.

Gli standard di riferimento sono rappresentati da soluzioni a concentrazione note di DNA derivate dal Fago λ per la quantità e dal marcatore di peso molecolare *1Kb Plus* (Invitrogen) per la grandezza del frammento in bp. Il gel viene poi visualizzato e fotografato al transilluminatore (Biorad) e successivamente sottoposto a scansione mediante Typhoon (Amersham) e quantizzato tramite analizzatore d'immagine ImageQuant.

#### **Buffer Utilizzati**

##### *Colorante*

4M Urea, 50% Saccarosio, 50 mM EDTA pH 8.0, 0.1% Bromofenolo Blu.

##### *TAE*

10 mM Tris-Cl pH 7.8, 5 mM Acetato di Sodio, 0.5 mM EDTA, pH 7.8 con Acido Acetico.

### 3.3.3 Tecnica AFLP-TP

Il protocollo AFLP-TP (*Amplified Fragment Length Polymorphism—Transcript Profiling*) utilizzato nella presente studio è una versione perfezionata da Breyne et al. nel 2003 del metodo descritto da Bachem et al. nel 1996. Tale tecnica prevede diverse fasi:

#### A) Sintesi del cDNA

La reazione di retrotrascrizione è stata condotta in due step successive; nel primo si è sintetizzato un filamento singolo di DNA utilizzando 1 µg di mRNA come stampo, in un volume finale di reazione (Tabella 3.2) di 40 µl. La sintesi è avvenuta per 2 ore alla temperatura di 42°C, mantenuta costante mediante un bagno termostatico o un termociclatore.

**Tabella 3.2.** Reazione di sintesi del primo filamento di cDNA

Sostanza/Reagente	Volume (µl)
mRNA (1µg)	20
oligi DT <sub>25</sub> biotinilati (700 ng/µl)	1,5
dNTPs (10 mM)	2
DTT (0,1 mM)	4
5X First Strand Buffer Invitrogen	8
Superscript II (200U/µl)	1
Acqua DEPC	3,5

Nel secondo step si è sintetizzato un filamento di DNA complementare al primo, aggiungendo ai 40 µl precedentemente ottenuti, 120 µl di miscela di reazione (Tabella 3.3), per un volume finale di 160 µl. La sintesi del secondo filamento di DNA, avviene per 1 ore alla temperatura di 12°C, seguita da 1 ora alla temperatura di 22°C, entrambe le temperature sono mantenute costanti mediante un bagno termostatico o un termociclatore.

**Tabella 3.3.** Reazione di sintesi del secondo filamento di cDNA

Sostanza/Reagente	Volume (µl)
10X <i>E. coli</i> ligasi buffer Invitrogen	16
Rnase-H (2U/µl)	0,8
dNTPs (10 mM)	3
DTT (0,1 mM)	6
<i>E. coli</i> Ligasi (10U/µl)	1,5
<i>E. coli</i> Polimerasi I (10U/µl)	5
Acqua DEPC	87,7

### **B) Purificazione del cDNA e dei prodotti di reazione PCR**

Una volta terminata la sintesi del secondo filamento del cDNA, il prodotto della reazione è stato purificato utilizzando il "QIAquick PCR Purification Kit" della Qiagen. Il kit permette la rimozione di dNTPs, primers, sali, RNA e proteine dal prodotto PCR con la seguente procedura:

1. Aggiungere 5 volumi di Buffer PB ad 1 volume di prodotto di PCR o cDNA da purificare;
2. Inserire una colonnina *QIAquick spin* in un tubo da 2 ml;
3. Inserire il volume di campione miscelato ai 5 volumi di buffer PB nella colonna e centrifugare il tutto a 17900 x g per 1 minuto; N.B. se il volume da centrifugare è superiore ai 700 µl, l'operazione va fatta in due o più passaggi, eliminando il liquido eluito ogni volta.
4. Eliminare il liquido raccolto nel tubo da 2 ml e riporre la colonna nello stesso tubo;
5. Lavare la colonna con 750 µl di Buffer PE e centrifugare a 17900 x g per 1 minuto;
6. Eliminare il liquido raccolto nel tubo da 2 ml e riporre la colonna nello stesso tubo;
7. Centrifugare la colonna vuota, in maniera da farla seccare bene, a 17900 x g per 1 minuto;
8. Riporre la colonna in un nuovo tubo da 1,5 ml;
9. Aggiungere 50 µl di Buffer EB oppure acqua sterile al centro della colonna e centrifugare a 17900 x g per 1 minuto.

L'integrità e la quantità di cDNA sintetizzato sono state valutate mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% in TAE come descritto al punto 3.3.2.

La composizione dei buffer utilizzati non è stata dichiarata dalla Qiagen.

### **C) Digestione del cDNA**

La procedura AFLP-TP, per consentire l'isolamento di un solo frammento per cDNA e quindi per messaggero, prevede una doppia restrizione del cDNA, con due diversi enzimi di restrizione: *Bst*YI ed *Mse*I.

*Bst*YI taglia in corrispondenza della sequenza di basi:

<b>5'</b>	RGATCY	<b>3'</b>
<b>3'</b>	YCTAGR	<b>5'</b>

dove Y rappresenta le basi pirimidiniche (timina o citosina) ed R rappresenta le basi puriniche (guanina e adenina). *MseI* taglia in corrispondenza della sequenza di basi:

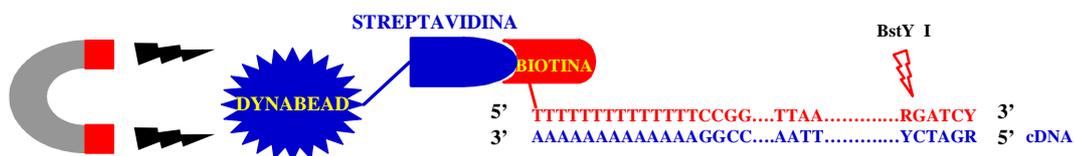


Nella prima reazione 30  $\mu$ l di cDNA sono stati digeriti con l'enzima *BstYI*, con l'aggiunta di 10  $\mu$ l di miscela di reazione (Tabella 3.4), per 2 ore alla temperatura di 60°C, mantenuta costante mediante un bagno termostatico o un termociclatore.

**Tabella 3.4.** Restrizione del cDNA con l'enzima *BstYI*

Sostanza/Reagente	Volume ( $\mu$ l)
Buffer <i>BstYI</i> 10X (RL Buffer)	4
BSA 100X	0,4
<i>BstYI</i> (10U/ $\mu$ l)	1
DTT (0,1 mM)	0,2
Acqua distillata sterile	4,4

Successivamente i frammenti di cDNA aventi l'estremità 3' con dell'oligo DT<sub>25</sub> biotilato, sono stati separati da quelli non biotilati, ossia i frammenti di restrizione, mediante l'utilizzo di sfere magnetiche recanti sulla propria superficie una molecola di streptavidina. A tale scopo 10  $\mu$ l di Dynabeads con streptavidina, prima dell'uso, sono state lavate e risospese in 4 volumi del buffer STEX 2x e poi aggiunte al cDNA così da ottenere un volume finale di 80  $\mu$ l. La miscela è stata lasciata in incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente in modo da favorire il legame biotina-streptavidina, successivamente le sfere magnetiche sono state recuperate utilizzando un magnete (Figura 3.2), lavate 5 volte con 100  $\mu$ l di una soluzione di STEX 1x ed, infine, risospese in 30  $\mu$ l di Buffer TE.



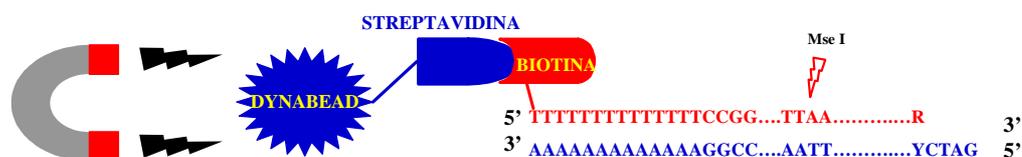
**Figura 3.2.** Rappresentazione schematica dell'isolamento selettivo dei frammenti di cDNA, mediante Dynabeads streptavidinate, dopo la prima digestione con l'enzima *BstYI*.

Per la seconda reazione, i 30  $\mu$ l di cDNA recuperati in precedenza sono stati digeriti con l'enzima *Mse*I, mediante l'aggiunta di 10  $\mu$ l di miscela di reazione (Tabella 3.5), per 2 ore in costante agitazione alla temperatura di 37°C, mantenuta costante mediante una stufa munita di agitatore.

**Tabella 3.5.** Restrizione del cDNA con l'enzima *Mse*I

Sostanza/Reagente	Volume ( $\mu$ l)
Buffer <i>Bst</i> YI 10X (RL Buffer)	4
BSA 100X	0,4
<i>Mse</i> I (10U/ $\mu$ l)	1
DTT (0,1 mM)	0,2
NaCl (0,5M)	4
Acqua distillata sterile	0,4

Successivamente sono state immobilizzate al magnete le sferette recanti ancora una porzione di cDNA ed è stata raccolta, in tubi da 1,5 ml puliti, la soluzione contenente i frammenti di interesse (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Rappresentazione schematica dell'isolamento selettivo dei frammenti di cDNA, mediante Dynabeads streptavidinate, dopo la seconda digestione con l'enzima *Mse*I.

Tale soluzione è costituita da una miscela di due tipologie diverse di frammenti di restrizione: la prima con un'estremità che presenta il sito di restrizione di *Mse*I ed un'altra estremità con il sito di restrizione di *Bst*YI, la seconda con entrambe le estremità che presentano il sito di restrizione di *Mse*I.



**D) Ligazione degli adattatori**

Le estremità dei frammenti ottenuti dalla digestione enzimatica sono state dotate, mediante apposita reazione di legazione (Tabella 3.6), di specifici adattatori a sequenza nota. Questi adattatori servono da punto di partenza per le successive reazioni di amplificazione.

**Tabella 3.6.** Reazione di legazione degli adattatori ai frammenti di restrizione

Sostanza/Reagente	Volume ( $\mu$ l)
Buffer <i>Bst</i> YI 10X (RL Buffer)	1
T4 DNA ligase (1U/ $\mu$ l)	1
<i>Bst</i> YI (10U/ $\mu$ l)	1
ATP (10 mM)	1
Adattatore a doppia elica <i>Bst</i> YI (5 pmol)	1
Adattatore a doppia elica <i>Mse</i> I (50 pmol)	1
Digerito con <i>Mse</i> I e <i>Bst</i> YI	40
Acqua distillata sterile	4

La reazione è stata condotta per 3 ore alla temperatura di 37°C, mantenuta costante mediante un bagno termostatico o un termociclatore. Trascorse le 3 ore il prodotto della miscela di reazione è stato diluito 10 volte con il buffer TE.

Le sequenze degli adattatori non fosforilati sono riportate di seguito:

Adattatore *Bst*YI Forward: **5' CTCGTAGACTGCGTAGT 3'**

Adattatore *Bst*YI Reverse: **5' GATCACTACGCAGTCTAC 3'**

Adattatore *Mse*I Forward: **5' GACGATGAGTCCTGAG 3'**

Adattatore *Mse*I Reverse: **5' TACTCAGGACTCAT 3'**

#### **E) Amplificazione dei frammenti**

La reazione di amplificazione è stata eseguita mediante l'utilizzo di un termociclatore capace di combinare tempi e temperature diverse in maniera ciclica e consentire all'enzima DNA polimerasi di effettuare la "polymerase chain reaction" o "PCR".

L'amplificazione dei frammenti si articola in due fasi consecutive: la pre-amplificazione e l'amplificazione selettiva. Nella prima fase i frammenti di DNA sono stati amplificati con dei primer per AFLP complementari alle estremità generate nella precedente reazione di legazione, senza utilizzo di basi selettive all'estremità 3'.

Dato che l'enzima *Bst*YI ha un sito di taglio la cui ultima base può essere indistintamente una purina (adenina o guanina), l'estremità con l'adattatore *Bst* è amplificata con due tipologie di primer differenti *Bst*T<sub>0</sub> (con ultima base timina) e *Bst*C<sub>0</sub> (con ultima base citosina) che, combinandosi alternativamente con il primer *Mse*<sub>0</sub>, generano due differenti pre-amplificati identificati come T<sub>0</sub> e C<sub>0</sub>.

In tale reazione (Tabella 3.7), vengono amplificati solo i frammenti di digestione che presentano entrambe le tipologie di taglio (*Mse*I e *Bst*YI), alla fine quindi sarà amplificato un solo frammento per ogni mRNA retrotrascritto.

**Tabella 3.7.** Reazione di pre-amplificazione dei frammenti di restrizione

Sostanza/Reagente	Volume ( $\mu$ l)
Ligato diluito 1:10	5
Primer Bst C <sub>0</sub> /T <sub>0</sub> (50 ng/ $\mu$ l)	1,5
Primer Mse <sub>0</sub> (50 ng/ $\mu$ l)	1,5
dNTP (10 mM)	1,5
10X Buffer PCR	5
MgCl <sub>2</sub>	1,5
Taq polimerasi (5U/ $\mu$ l)	0,2
Acqua distillata sterile	33,8

La pre-amplificazione del ligato è stata effettuata utilizzando il seguente ciclo PCR:

94°C per 5 minuti	}	Ripetuto 20 volte
94°C per 40 secondi		
56°C per 1 minuto		
72°C per 1 minuto		
72°C per 2 minuti		

Le sequenze dei primer utilizzati sono riportate di seguito:

Primer BstC<sub>0</sub>: **5' CTCGTAGACTGCGTAGT 3'**

Primer BstT<sub>0</sub>: **5' GATCACTACGCAGTCTA 3'**

Primer Mse<sub>0</sub>: **5' GACGATGAGTCCTGAG 3'**

I prodotti della preamplificazione sono stati diluiti 1:20 con TE e impiegati per la successiva reazione di amplificazione selettiva (Tabella 3.8) mediante l'utilizzo di primer marcati con fluorofori. I primer Bst ed Mse presentano una sola base selettiva per cui le possibili combinazioni sono 4 (basi selettive di Bst) X 4 (basi selettive di Mse) X 2 (tipologie di preamplificati) = 32.

**Tabella 3.8.** Reazione di amplificazione selettiva

Sostanza/Reagente	Volume ( $\mu$ l)
Preamplificato 1:20	5
Primer Bst marcato (10 ng/ $\mu$ l)	0,4
Primer Mse (50 ng/ $\mu$ l)	0,6
dNTP (10 mM)	0,4
10X Buffer PCR	2
MgCl <sub>2</sub>	0,6
Taq polimerasi (5U/ $\mu$ l)	0,2
Acqua distillata sterile	10,8

L'amplificazione selettiva è stata effettuata utilizzando il seguente ciclo PCR:

94°C per 2 minuti	}	Ripetuto 13 volte, diminuendo la temperatura di annealing di 0,7°C ad ogni ciclo
94°C per 30 secondi		
65°C per 30 secondi		
72°C per 1 minuto		
94°C per 30 secondi	}	Ripetuto 27 volte, diminuendo il tempo di elongazione a 72°C di 1 secondo ad ogni ciclo
54°C per 30 secondi		
72°C per 1 minuto		
72°C per 5 minuti		

Il prodotto della reazione di amplificazione selettiva (20 µl) è stato miscelato con un ugual volume di Formammide dye, che mantiene i filamenti denaturati e traccia la loro corsa sul gel, e denaturato quindi a 90°C per 10 minuti. Successivamente 4 µl di tale miscela sono stati sottoposti a separazione elettroforetica su gel denaturante al 6% di acrilammide/urea in tampone TBE ad un voltaggio costante di 1600 V.

### **Buffer Utilizzati**

*5X First Strand Buffer Invitrogen*

250 mM TrisHCl (pH 8,3); 375 mM di KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>

*Buffer BstYI10X (RL Buffer)*

10 mM TrisAcido acetico (pH 7,5); 10 mM Acetato di Magnesio; 50 mM Acetato di Potassio; 5 mM DTT; BSA 50 ng/pl.

*STEX 2x*

2 M NaCl; 20 mM TrisHCl; 2 mM EDTA; 0,2% Triton X-100 (pH8,0)

*10X Buffer PCR*

50 mM di KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 9,0); 0,1% Triton 100

*TE Buffer*

10 mM Tris (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)

*TBE*

45 mM Tris borato; 1 mM EDTA

*Formammide dye*

10 ml Formammiide 98%; 200ml EDTA 0,5 M; 10 mg di bromofenolo; 10 mg Xilene-cyanolo.

**F) Analisi del gel ed estrazione dei frammenti**

Il gel di acrilammide su cui sono stati separati i frammenti AFLP-TP, dopo che uno dei due vetri entro i quali è racchiuso è stato rimosso, è stato digitalizzato mediante scanner Typhoon (Amersham).

L'immagine così ottenuta è stata studiata tramite analizzatore d'immagine ImageQuant al fine di individuare bande differenzialmente espresse. Successivamente è stata effettuata una stampa in dimensioni reali dell'immagine, su cui sono stati evidenziate a mano le bande di interesse individuate dalla precedente analisi.

In seguito, utilizzando i riferimenti laterali, è stato asportato in maniera precisa il gel in corrispondenza delle bande di interesse.

I frammenti di cDNA sono stati estratti riponendo i pezzi di gel tagliati in tubi da 1,5 ml contenenti 100 µl di acqua per 24 ore alla temperatura di 4°C. Successivamente è stata effettuata un'amplificazione selettiva (Tabella 3.9) del frammento ottenuto.

**Tabella 3.9.** Reazione di amplificazione selettiva dei frammenti estratti dal gel

<b>Sostanza/Reagente</b>	<b>Volume (µl)</b>
Frammento recuperato	20
Primer Bst (10 ng/µl)	0,8
Primer Mse (50 ng/µl)	1,2
dNTP (10 mM)	0,8
10X Buffer PCR	4
MgCl <sub>2</sub>	1,2
Taq polimerasi (5U/µl)	0,4
Acqua distillata sterile	11,6

La rispondenza del frammento amplificato a quello individuato al momento dell'analisi del gel è stata verificata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% in TAE, in presenza del marcatore di peso molecolare *1Kb Plus* (Invitrogen), con le modalità descritte al punto 3.3.2.

Accertata l'identità della banda selezionata, il prodotto della reazione di amplificazione viene purificato con il "QIAquick PCR Purification Kit" della Qiagen, secondo la procedura riportata nel paragrafo 3.3.2. e quantizzato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% in TAE, secondo la procedura riportata nel paragrafo 3.2.2.

### 3.3.4 Clonaggio dei frammenti di cDNA

Il prodotto di amplificazione dei frammenti di cDNA estratti dal gel, è stato clonato mediante Qiagen PCR cloning kit.

Il vettore è stato ligato ai frammenti PCR e poi utilizzato per la trasformazione di cellule competenti di *Escherichia coli* tipo [F'::Tn10(Tc<sup>r</sup>) *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup> *lac*<sup>Δ</sup> ZΔM15] *recA1 endA1 hsdR17*(r<sub>k12</sub><sup>-</sup> m<sub>k12</sub><sup>+</sup>) *lac gln V44 thi-1 gyrA96 relA1*, in seguito a shock termico (Quiagen EZ Competent Cells).

Per la trasformazione con prodotti PCR di circa 500bp sono stati usati circa 40 ng di amplicato per 50 ng di plasmide (rapporto molare di circa 6:1).

La trasformazione (Tabella 3.10) è stata condotta in 10 μl di volume totale utilizzando 50 ng di *p-drive cloning vector* ed un quantitativo di amplicato tale da essere in rapporto molare di 5:1 con il vettore calcolato mediante la seguente formula:

$$\frac{50 \text{ ng} \times \text{grandezza del frammento(bp)} \times \text{rapporto molare voluto}}{3851}$$

La reazione di ligazione è stata incubata in frigorifero (circa 5°C) per mezz'ora o più e poi conservata a 20°C o utilizzata direttamente per gli step di trasformazione.

**Tabella 3.10.** Reazione di ligazione dei frammenti al plasmide

Sostanza/Reagente	Volume (μl)
pDrive Cloning Vector (50 ng/μl)	1
frammento da clonare	da 1 a 4
Acqua distillata sterile	da 0 a 3
Ligation Master Mix 2X	5

Per la trasformazione le cellule competenti Qiagen EZ sono state scongelate, unite a 2 μl di reazione di ligazione ed incubate in ghiaccio per 5 minuti. Lo *shock* termico è stato procurato ponendo le cellule a 42°C per 30 secondi e poi nuovamente in ghiaccio per 2 minuti.

Le cellule così trattate sono state addizionate con 250 μl di SOC medium e immediatamente piastrate su substrato LB (Luna Bertani) solido contenente ampicillina (100 μg/ml), X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galattopiranoside, 80 μg/ml) e IPTG (isopropil-β-D-thiogalattopiranoside 50 μM) e incubate a 37°C per una notte.

Dato che l'antibiotico seleziona le colonie contenenti il plasmide da quelle non trasformate e la colorazione bianca distingue le colonie in cui il gene *Lac Z* del

plasmide è interrotto dall'insero, le colonie bianche sono state prelevate e propagate individualmente in tubi contenenti 5 ml di substrato LB liquido e sottoposte ad estrazione del DNA plasmidico dopo un ulteriore giorno di incubazione a 37°C.

Contemporaneamente, l'ansa contaminata con ciascuna colonia è stata stemperata in 10 µl di acqua distillata. Un'aliquota di 3 µl è stata utilizzata per verificare la presenza dell'insero, mediante una amplificazione di controllo (Tabella 3.11) effettuata direttamente su colonia.

**Tabella 3.11.** Amplificazione di controllo su colonia

<b>Sostanza/Reagente</b>	<b>Volume (µl)</b>
Colonia	3
Primer M13 forward (50 ng/µl)	0,4
Primer M13 reverse (50 ng/µl)	0,6
dNTP (10 mM)	2
10X Buffer PCR	5
MgCl <sub>2</sub>	1,5
Taq polimerasi (5U/µl)	0,2
Acqua distillata sterile	34,3

L' amplificazione è stata effettuata utilizzando il seguente ciclo PCR:

94°C per 5 minuti	} Ripetuto 25 volte
94°C per 30 secondi	
52°C per 52 secondi	
72°C per 1 minuto	
72°C per 5 minuti	

### 3.3.5 Estrazione del DNA plasmidico

Le colonie di batteri propagate in LB liquido sono state centrifugate, per ottenere la precipitazione del pellet che, una volta raccolto in tubi da 1,5 ml, è stato sottoposto ad estrazione del DNA plasmidico mediante NucleoSpin® PLasmid Mini Kit. Il protocollo prevede diverse fasi:

1. Centrifugare il pellet per 30 secondi ad 11.000 x g e rimuovere il surnatante;
2. Aggiungere 250 µl di buffer A1 e risospendere le cellule agitando;
3. Aggiungere 250 µl di buffer A2 e miscelare con delicatezza capovolgendo il tubo per 6-8 volte ed incubare a temperatura ambiente per 5 minuti;
4. Aggiungere 300 µl di buffer A3 e miscelare con delicatezza capovolgendo il tubo per 6-8 volte;

5. Centrifugare per 10 minuti ad 11.000 x g;
6. Trasferire il surnatante in un tubo da 2 ml con colonnina NucleoSpin® PLasmid e centrifugare per 1 minuto ad 11.000 x g;
7. Aggiungere 500 µl di buffer AW riscaldato a 50°C e centrifugare per 1 minuto ad 11.000 x g ed eliminare l'eluato;
8. Aggiungere 600 µl di buffer A4 e centrifugare per 1 minuto ad 11.000 x g, successivamente eliminare l'eluato;
9. Asciugare la colonnina NucleoSpin® PLasmid centrifugando per 2 minuti ad 11.000 x g;
10. Trasferire la colonnina NucleoSpin® PLasmid su un nuovo tubo da 2 ml ed aggiungere 50 µl di buffer AE, incubare a temperatura ambiente per 1 minuto e successivamente centrifugare per 1 minuto ad 11.000 x g.

Il DNA ottenuto è stato separato e quantizzato mediante elettroforesi su gel d'agarosio allo 0,8% in TAE secondo le procedure descritte al punto 3.2.2.

La composizione dei buffer A1, A2, A3, A4, AE E AW utilizzati non è stata dichiarata dalla Macherey Nagel.

### **Buffer Utilizzati**

#### *SOC Medium*

Tryptone, estratto di lievito, NaCl, KCl, glucosio, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> e acqua sterile.

*Substrato LB (Luna Bertani)*: 10 gr di triptone, 5 gr di estratto di lievito, 10 gr di NaCl, acqua bidistillata fino a 1000 ml. Il pH è stato portato a 7,0; per ottenere il substrato solido sono stati aggiunti 15 gr di agar prima di portare a volume.

### **3.3.6 Sequenziamento dei frammenti**

Per le reazioni di sequenza (tabella 3.12) è stato utilizzato il BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit basato sul metodo di Sanger (metodo dei dideossinucleotidi). La quantità di DNA clonato occorrente è stata calcolata in base alla sua grandezza in bp sapendo che per sequenziare un frammento di 1.000 bp occorrono 25 ng di DNA.

L' amplificazione è stata effettuata utilizzando il seguente ciclo PCR:

96°C per 1 minuti	}	Ripetuto 25 volte
96°C per 10 secondi		
50°C per 5 secondi		
60°C per 4 minuti		

**Tabella 3.12.** Reazione di sequenza

<b>Sostanza/Reagente</b>	<b>Volume (<math>\mu</math>l)</b>
RR 100	2
Primer Bst o Mse	1,6
DNA	da 1 a 6,4
Acqua distillata sterile	da 0 a 5,4

La purificazione del prodotto è stata effettuata utilizzando un protocollo basato sulla precipitazione con Etanolo e Sodio Acetato che è raccomandata quando si vuole ottenere un buon segnale già dalla prima base o quando i terminatori non incorporati sono presenti ad elevata concentrazione.

Al prodotto dell'amplificazione è stato quindi aggiunto 1/10 del volume di Sodio Acetato 3 M, 2 volumi e mezzo d'etanolo assoluto freddo ed il tutto è stato incubato in ghiaccio per 30 minuti. Successivamente, è stata effettuata una centrifugazione a temperatura ambiente per 30 minuti a 11.000 x g. Eliminato il surnatante, al precipitato sono stati aggiunti 125  $\mu$ l di etanolo al 70% freddo. Successivamente, dopo una centrifugata a 11.000 x g per 20-30 minuti a temperatura ambiente, è stato eliminato il surnatante. Al precipitato sono stati aggiunti nuovamente 125  $\mu$ l di etanolo al 70% freddo. Dopo una nuova centrifuga a 11.000 x g per 20-30 minuti a temperatura ambiente è stato eliminato il surnatante. Il precipitato, quindi è stato asciugato a temperatura ambiente per 20 minuti e risospeso in 20  $\mu$ l di Formammide.

I prodotti della reazione di sequenziamento sono stati caricati sul capillare di un sequenziatore ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER o ABI PRISM 3100 GENETIC ANALYZER.

### **3.4 ANALISI BIOINFORMATICHE**

I frammenti ottenuti dal clonaggio e dalla reazione di sequenziamento, sono stati sottoposti ad analisi bioinformatica al fine di determinarne l'annotazione funzionale, tramite il software KAAS (*KEGG Automatic Annotation Server*: <http://www.genome.jp/kegg/kaas/>). Le sequenze per le quali non è stata possibile effettuare un'annotazione funzionale tramite il KAAS, sono state annotate manualmente tramite analisi BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) nei seguenti database:

CAB UNINA: <http://biosrv.cab.unina.it/>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

TIGR: [http://www.tigr.org/tdb/potato/disease\\_db/disease\\_blast.shtml](http://www.tigr.org/tdb/potato/disease_db/disease_blast.shtml)

SGN: <http://www.sgn.cornell.edu>

Le sequenze per le quali non è stata individuata né un'annotazione funzionale né un'omologia a funzione sconosciuta significative, ossia con un *e-value* per l'analisi BLAST superiore a  $10^{-7}$ , sono state raggruppate in una categoria definita "sequenze con nessuna omologia".

Le sequenze nucleotidiche sono state inoltre sottoposte a numerose applicazioni del software "BIOEDIT": editing, allineamento di due sequenze con matrice "Identif" e "Blosum", multi-allineamento di più sequenze con l'applicazione ClustalW, composizione in aminoacidi, creazione di sequenze consenso, analisi dei polimorfismi.

Per aggregare le sequenze ottenute in cluster con sequenze presenti in database, è stato utilizzato il programma CAP3 (*Sequence Assembly Program* <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>).

### 3.5 ANALISI CHIMICHE

#### 3.5.1 Coltura dei batteri

Tutte le colture batteriche utilizzate per l'estrazione dei metaboliti prodotti da *Ralstonia Solanacearum* sono state prodotte dal Laboratorio del Professor Astolfo Zoina del Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e patologia Vegetale dell'Università degli studi di Napoli Federico II.

La moltiplicazione delle cellule batteriche è stata ottenuta utilizzando un substrato non agarizzato (Tabella 3.13) mantenuto in agitazione continua a temperatura controllata (28°C) per 24/48 ore. Prima dell'uso il substrato, il cui pH è stato portato a 7,0 con una soluzione 1 M di NaOH, è stato sterilizzato mediante autoclave (20 minuti a 121°C).

**Tabella 3.13.** Ricetta del substrato di crescita di *Ralstonia solanacearum*.

Sostanza/Reagente	Volume (μl)
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 gr
KCl	0,2 gr
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	9 gr
Peptone	1 gr
Glucosio	10 gr
Acqua fino a	1000 ml

La sospensione batterica così ottenuta è stata centrifugata alla temperatura di 4°C per 30' a 8.000 x g. Il supernatante è stato filtrato su membrana Millipore da 0,45 μm, addizionato con antibiotico (Streptomycina) e liofilizzato, per essere successivamente sottoposto ai saggi di fitotossicità (paragrafo 3.6.1) e alla

precipitazione frazionata degli EPS (paragrafo 3.5.2). Le cellule precipitate, sono state raccolte ed utilizzate per l'estrazione degli LPS (paragrafo 3.5.3) ed i successivi saggi di attività (paragrafo 3.6.2).

### **3.5.2 Precipitazione frazionata con etanolo degli EPS di *Ralstonia solanacearum***

Gli EPS prodotti dal batterio durante la crescita, vengono purificati dal filtrato colturale mediante precipitazione frazionata a freddo con etanolo, come di seguito riportato:

1. liofilizzare un volume noto di filtrato colturale;
2. reidratare il liofilizzato con un volume di acqua bidistillata pari ad 1/10 di quello iniziale;
3. raffreddare il pallone contenente la miscela in ghiaccio fino a 10°C;
4. aggiungere 5 volumi di etanolo alla temperatura di -20°C;
5. lasciare il pallone con la miscela in ghiaccio per una notte, in modo da permettere la precipitazione degli EPS;
6. centrifugare la sospensione alla temperatura di 4°C per 45 minuti a 7.000 x g;
7. eliminare il surnatante e risospendere il precipitato in un volume di acqua bidistillata pari ad 1/10 di quello iniziale;
8. ripetere la precipitazione a 10°C in ghiaccio con l'aggiunta di 5 volumi di etanolo alla temperatura di -20°C;
9. centrifugare nuovamente alla temperatura di 4°C per 45 minuti a 7.000 x g;
10. eliminare il surnatante e risospendere il pellet in un volume di acqua bidistillata pari ad 1/10 di quello iniziale;
11. dializzare la soluzione ottenuta mediante tubi da 3500 Dalton, in acqua bidistillata per due giorni;
12. liofilizzare il contenuto dei tubi ottenuto contenente gli EPS precipitati e conservare il liofilizzato a -20°C.

### **3.5.3 Estrazione degli LPS di *Ralstonia solanacearum* con il metodo acqua-fenolo**

Le cellule batteriche (8 gr di peso umido) sono state trasferite in un pallone da 500 ml a cui sono stati aggiunti in successione 60 ml di acqua bidistillata riscaldata a 68°C e 60 ml di fenolo puro sciolto a 68°C. L'estrazione è avvenuta in un bagno termostato a 68°C posto in agitazione magnetica per 20 minuti.

Successivamente, il tutto è stato raffreddato fino a 10°C ed è stato centrifugato alla temperatura di 4°C per 45 minuti a 7.000 x g, in modo da ottenere la separazione delle due fasi.

La fase acquosa è stata raccolta in una beuta, mentre, la fase fenolica è stata addizionata di altri 60 ml di acqua bidistillata riscaldata a 68°C e sottoposta, quindi, ad una nuova estrazione secondo la procedura precedentemente descritta.

Al termine della seconda estrazione, le due aliquote di fase acquosa sono state unite insieme e sottoposte a dialisi, utilizzando tubi da 3500 Dalton, in acqua bidistillata per due giorni; il contenuto dei tubi è stato successivamente liofilizzato e conservato a -20°C.

La fase fenolica è stata diluita 10 volte con acqua bidistillata e centrifugata alla temperatura di 10°C per 45 minuti a 7.000 x g. Il supernatante è stato dializzato per sei giorni, mediante tubi da 3500 Dalton, in abbondanti volumi di acqua prima corrente, poi distillata e, infine, bidistillata; il contenuto dei tubi così ottenuto è stato liofilizzato e conservato a -20°C.

#### **3.5.4 Determinazione della struttura dell'*o-chain* e del Lipide A**

Tutte le procedure di determinazione della struttura chimica dell'*O-chain* e del Lipide A, sono stati condotti in collaborazione con la Division of Structural Biochemistry, Research Center Borstel, Leibniz center for Medicine e Bioscience, Borstel, Germany, diretta dal Professor Otto Holst.

### **3.6 SAGGI BIOLOGICI SU METABOLITI DI *RALSTONIA SOLANACEARUM***

Il materiale vegetale utilizzato per lo studio della risposta *in vivo* al trattamento con i metaboliti estratti dal batterio fitopatogeno *Ralstonia Solanacearum*, consistente nella specie coltivata di patata (*Solanum tuberosum* cv. Blondy) e di tabacco (*Nicotiana tabacum* cv. White Burley), è stato fornito dal Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, sezione di Genetica Vegetale.

Le piante di patata sono state ottenute da tuberi non frazionati, mentre quelle di tabacco da seme, la loro crescita, nonché i saggi, sono stati condotti in serre climatizzate.

#### **3.6.1 Saggi di fitotossicità**

Per i saggi di fitotossicità, sono stati utilizzati il filtrato colturale intero liofilizzato, ripreso in acqua distillata sterile con la stessa concentrazione iniziale e gli EPS ottenuti da 10 millilitri di filtrato, purificati mediante gel-filtrazione su Sephadex G-

50 colturale, ripresi in 50 µl di metanolo e successivamente diluiti, con acqua distillata sterile, fino al volume finale di 10 millilitri.

Le aliquote così ottenute sono state infiltrate nel mesofillo di foglie di tabacco della cv. White Burley e patata cv. Blondy, utilizzando una siringa ipodermica da un millilitro. Nelle successive 18/48 ore si è osservata l'eventuale presenza di clorosi o necrosi in corrispondenza dell'area infiltrata.

Per l'esperimento sono state utilizzate 3 piante, delle quali sono state infiltrate con la soluzione da testare tre diverse foglie. Il testimone è stato ottenuto con un eguale numero di piante e di foglie trattate solo con acqua sterile.

### **3.6.2 Saggi sull'attività *in vivo* degli LPS**

Per i saggi sull'attività *in vivo*, gli LPS liofilizzati di *Ralstonia solanacearum* sono stati ripresi in acqua distillata sterile fino alla concentrazione finale di 50 µg/ml (Newman et al., 1997).

Le aliquote così ottenute sono state infiltrate nel mesofillo di foglie di tabacco della cv. White Burley e patata cv. Blondy, utilizzando una siringa ipodermica da un millilitro. Per l'esperimento sono state utilizzate 3 piante, delle quali sono state infiltrate con la soluzione da saggiare tre diverse foglie. Il testimone è stato ottenuto con un eguale numero di piante e di foglie trattate solo con acqua sterile.

Nelle stesse aree dove precedentemente era stata iniettata la soluzione di LPS, a distanza di circa 20 ore dall'infiltrazione con LPS, è stata inoculata, sempre a mezzo di una siringa ipodermica da un millilitro, una sospensione del batterio fitopatogeno alla concentrazione di  $2,5 \times 10^7$  cfu.

Nelle successive 18/48 ore si è osservata l'eventuale presenza, in corrispondenza dell'area infiltrata, di necrosi dovuta a reazione di ipersensibilità (HR) in tabacco o sintomi di avvizzimento batterico in patata.

## **4 RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **4.1 INDIVIDUAZIONE DEI PUTATIVI GENI COINVOLTI NELLA RESISTENZA AL BATTERIO *RALSTONIA SOLANACEARUM* IN PATATA**

I batteri possono instaurare con le piante principalmente due tipi di rapporto: endofitia ed epifitia. L'endofitia è propria di tutti i batteri fitopatogeni allorché stabiliscono con l'ospite un rapporto di parassitismo e ne invadono i tessuti moltiplicandosi poi negli spazi intercellulari e/o nei vasi xilematici. Tuttavia, batteri, patogeni e non, possono trovarsi all'interno delle piante anche in assenza di malattia. La maggior parte di questi batteri endofiti sono saprofiti, dello stesso tipo di quelli reperibili nell'ambiente esterno, e, talvolta, svolgono funzioni utili per la pianta; alcuni altri, invece, sono patogeni e possono dar luogo a infezioni latenti, che solo più tardi si evolveranno in malattia, oppure possono rimanere in equilibrio con l'ospite per tutto il suo ciclo vegetativo. Batteri epifiti sono invece quelli capaci di vivere sulla superficie delle piante, e in particolare sulle foglie ma anche su fiori e frutti, sulle gemme o fra le perule e sulla corteccia di rami e tronchi. Questa caratteristica, propria di un numero relativamente limitato di batteri, costituisce spesso un'importante premessa allo sviluppo di una malattia. In effetti, per diverse combinazioni pianta-patogeno, è stato accertato che la gravità dell'attacco, e quindi della malattia, è in stretta relazione con il numero di batteri presenti sulla superficie degli organi attaccati (Matta, 1996).

L'infezione batterica delle piante si realizza attraverso diverse fasi fra loro correlate che iniziano con la presa di contatto con l'ospite, proseguono con la penetrazione e la colonizzazione, con la comparsa dei sintomi e terminano con l'evasione. I batteri, quando non sono già presenti su o nella pianta o sue parti (semi, bulbi, talee, ecc.), prendono contatto con l'ospite attraverso l'acqua di irrigazione, soprattutto sopra chioma, e quella piovana. Dopo essersi ancorati alle superfici vegetali ed essere aumentati di numero, i batteri si dirigono verso i siti di penetrazione, attratti da stimoli chimici (essudati fogliari e radicali), grazie alla possibilità di movimento in un velo di acqua. La penetrazione può avvenire solamente attraverso le ferite causate da animali, vento, grandine, freddo e pratiche colturali o le aperture naturali (stomi, lenticelle, idatodi e fiori). Avvenuta la penetrazione, i batteri si moltiplicano negli spazi intercellulari o, nel caso delle malattie vascolari, nei vasi xilematici, senza invadere le cellule vive. L'andamento della moltiplicazione batterica è diversa nelle combinazioni compatibili (interazione con pianta suscettibile) rispetto a quelle incompatibili (interazione con varietà resistente o con specie non ospite). Nelle prime i batteri si moltiplicano per un periodo di tempo

prolungato (circa 48/72 h) durante il quale il loro numero aumenta  $10^5$ - $10^6$  volte, rispetto all'iniziale; segue una fase stazionaria di 3-4 giorni e, quindi, la fase di declino. Nell'altra situazione, invece, il tempo di moltiplicazione è più breve (12-18 ore) e la popolazione aumenta solo  $10^1$ - $10^3$  volte. In tutti e due i casi i sintomi della malattia, nelle combinazioni compatibili, e la reazione di ipersensibilità, in quelle incompatibili, compaiono in coincidenza del raggiungimento del numero massimo di batteri negli spazi intercellulari. La moltiplicazione negli spazi intercellulari, normalmente poveri di sostanze nutritive, è resa possibile dalla produzione batterica di una sostanza proteica (arpina) la quale causa un'alterazione strutturale, non letale, della membrana citoplasmatica. Le cellule così alterate rilasciano ioni  $K^+$  e assumono dall'esterno ioni  $H^+$  determinando entro 2-3 ore dall'inoculazione un innalzamento del pH della soluzione presente negli spazi intercellulari da 5,5 a 7,0-7,5. Ciò determina la fuoriuscita dalle cellule di saccarosio, amminoacidi e ioni inorganici cosicché il fluido intercellulare, arricchito di sostanze nutritive, diviene in grado di sostenere la moltiplicazione batterica. A questo punto compaiono sintomi idropici aspecifici e, successivamente, sintomi tipici della malattia per la produzione negli spazi intercellulari di tossine, enzimi e fitormoni.

Iniziata la moltiplicazione i batteri cominciano a diffondersi nell'ospite secondo due possibili direttrici: intercellulare e intravascolare. I batteri con diffusione intercellulare (batteriosi parenchimatiche) invadono aree di ampiezza limitata attorno al sito di inoculazione causando necrosi isolate o, quando i siti di inoculazione sono molti e fra loro confluenti, estesi decadimenti del tessuto (ad es. marciumi molli da *Erwinia spp.*) o escrescenze iperplastiche (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae subsp. savastanoi*, *Erwinia herbicola pv. gypsophila*). I batteri vascolari si diffondono invece lungo i vasi xilematici, dando origine a infezioni diffuse la cui sintomatologia assume caratteristiche diverse a seconda del patogeno e dell'ospite. La comparsa dei sintomi, alla fine del periodo di incubazione, è associata, come nel caso dei funghi, alla produzione di fattori di virulenza identificabili, di volta in volta, con tossine, fitormoni ed enzimi pectolitici.

Il processo infettivo si conclude con la liberazione di nuovo inoculo batterico dai tessuti della pianta ospite. In alcuni casi (la maggior parte delle maculature fogliari e delle batteriosi vascolari) l'evasione non assume alcuna evidenza macroscopica; in altri essa è così appariscente che sui tessuti infetti compaiono piccole gocce costituite da ammassi di cellule batteriche immerse in un mezzo mucillaginoso. Tale essudato viene poi raccolto da vettori diversi (acqua, insetti, uccelli, ecc.) e trasferito su altre parti della stessa pianta o su piante diverse. Naturalmente con

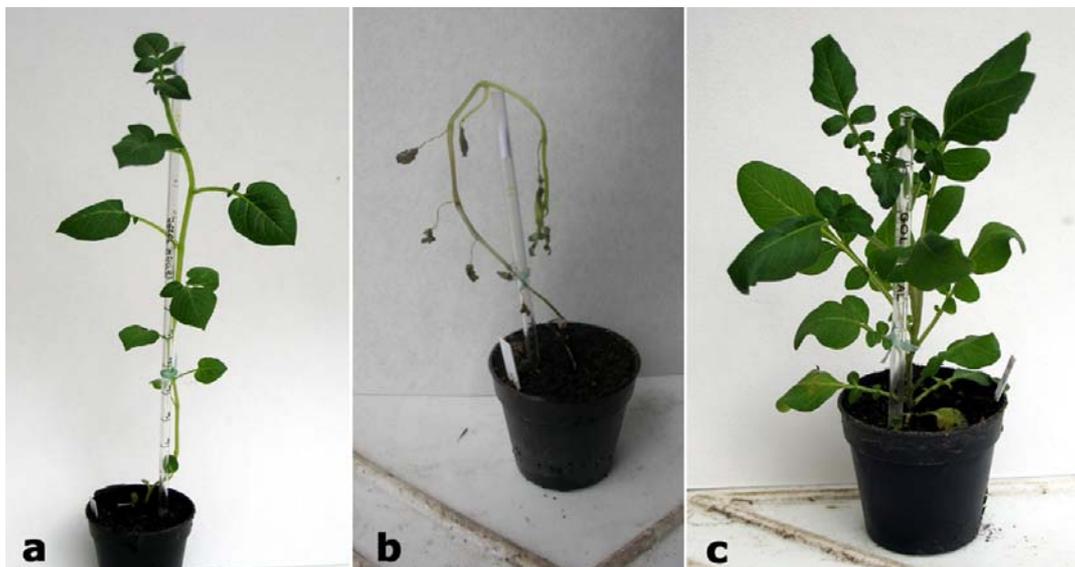
l'evasione il batterio non conclude la sua attività nell'ospite, dove può continuare a diffondersi estendendo i sintomi della malattia (Matta, 1996).

Al fine di poter individuare i geni che si attivano in patata in seguito all'infezione portata da *Ralstonia solanacearum*, è stato condotto un test di patogenicità inoculando sia la specie suscettibile, *Solanum tuberosum* cv Blondy, che quella resistente *Solanum commersonii*, secondo la procedura riportata al punto 3.2. Durante il test è stato campionato il materiale verde per le successive analisi molecolari dopo 12, 24, 48 e 72 ore dall'inoculo, quando i sintomi della malattia non erano ancora evidenti. Per verificare l'effettiva virulenza del patogeno, un'aliquota della sospensione batterica utilizzata per il test è stata inoculata, mediante una siringa ipodermica, direttamente nei fasci vascolari di due piante di *Solanum tuberosum*, ed entro le successive 24/48 ore si sono osservati i classici sintomi della malattia (Figura 4.1).



**Figura 4.1** Pianta di *Solanum tuberosum* cv Blondy con evidenti sintomi di avvizzimento batterico dovuto a *Ralstonia solanacearum*, 48 ore dopo l'inoculo di un'aliquota della sospensione batterica nei fasci vascolari, mediante una siringa ipodermica.

Per accertare che il patogeno abbia effettivamente infettato le piante da cui è stato prelevato il materiale verde per la analisi molecolari, almeno 10 piante di *Solanum tuberosum* cv Blondy, e di *Solanum commersonii*, sono state lasciate in cella climatizzata per i successivi 10 giorni dopo l'inoculo, monitorando, in riferimento a dei testimoni non inoculati, la comparsa dei sintomi della malattia. Dopo 10 giorni dall'inoculo tutte le piante di *Solanum tuberosum* cv Blondy, presentavano i sintomi della malattia od erano morte, mentre nessuna pianta di *Solanum commersonii* presentava detti sintomi (Figura 4.2). Tali risultati sono stati confermati da due successive repliche dell'esperimento.



**Figura 4.2** Piante di *Solanum tuberosum* cv Blondy e *Solanum commersonii* 10 giorni dopo l'inoculo con *Ralstonia solanacearum*: **a**: testimone di *Solanum tuberosum* cv Blondy non inoculato. **b**: pianta di *Solanum tuberosum* cv Blondy inoculata con la sospensione batterica che mostra evidenti sintomi di avvizzimento batterico da *Ralstonia solanacearum*. **c**: pianta di *Solanum commersonii* inoculata con la sospensione batterica che non presenta alcun sintomo di avvizzimento batterico.

Dal materiale vegetale così campionato è stato isolato l'mRNA da cui, successivamente, è stato ottenuto il corrispettivo cDNA per retrotrascrizione. Al fine di individuare i geni attivatisi in seguito all'infezione, e quindi i putativi geni di resistenza a *Ralstonia solanacearum*, il cDNA è stato investigato tramite la tecnica di *fingerprinting* cDNA-AFLP-TP.

Il *fingerprint* del DNA, termine che in italiano potrebbe essere assimilato all'impronta digitale genomica, è usato per evidenziare le differenze presenti nella sequenza di DNA tra due o più campioni a confronto, al fine di determinarne l'identità o accertarne le correlazioni esistenti. Il *fingerprint* è usato anche come fonte di marcatori genetici per costruire mappe di *linkage* o per identificare marcatori molecolari legati a caratteristiche fenotipiche e/o loci genetici. Negli ultimi anni sono state sviluppate molte tecniche di *fingerprint* del DNA, basate essenzialmente su due strategie:

1. ibridazione, che prevede il taglio del DNA genomico con endonucleasi di restrizione seguito dalla separazione elettroforetica dei frammenti di restrizione. Il polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione

(RFLPs) è messo in evidenza attraverso una ibridazione *SOUTHERN* con sonde specifiche per le regioni di DNA molto variabili.

2. amplificazione mediante PCR, che prevede l'amplificazione in vitro di particolari sequenze di DNA usando primer specifici od arbitrari. I prodotti di amplificazione sono poi separati tramite elettroforesi e rilevati attraverso la colorazione o l'uso di primer marcati. Le tecniche di questa categoria includono il DNA polimorfico amplificato a caso (RAPD), il DNA fingerprint amplificato (DAF) e la PCR a primer arbitrari (AP-PCR).

La metodica AFLP, acronimo di polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione amplificati, è un fingerprint del DNA che combina entrambe le strategie. Essa, infatti, è basata su un'amplificazione selettiva mediante PCR di un sottoinsieme dei frammenti di restrizione del DNA.

La parte di frammenti amplificati è poi analizzata attraverso un elettroforesi in gel ad alta risoluzione che permette la visualizzazione di una serie di segnali che nel complesso formano il *fingerprint* del DNA del campione, che, comparato a quello di un altro campione, consente di individuare le uguaglianze e le differenze.

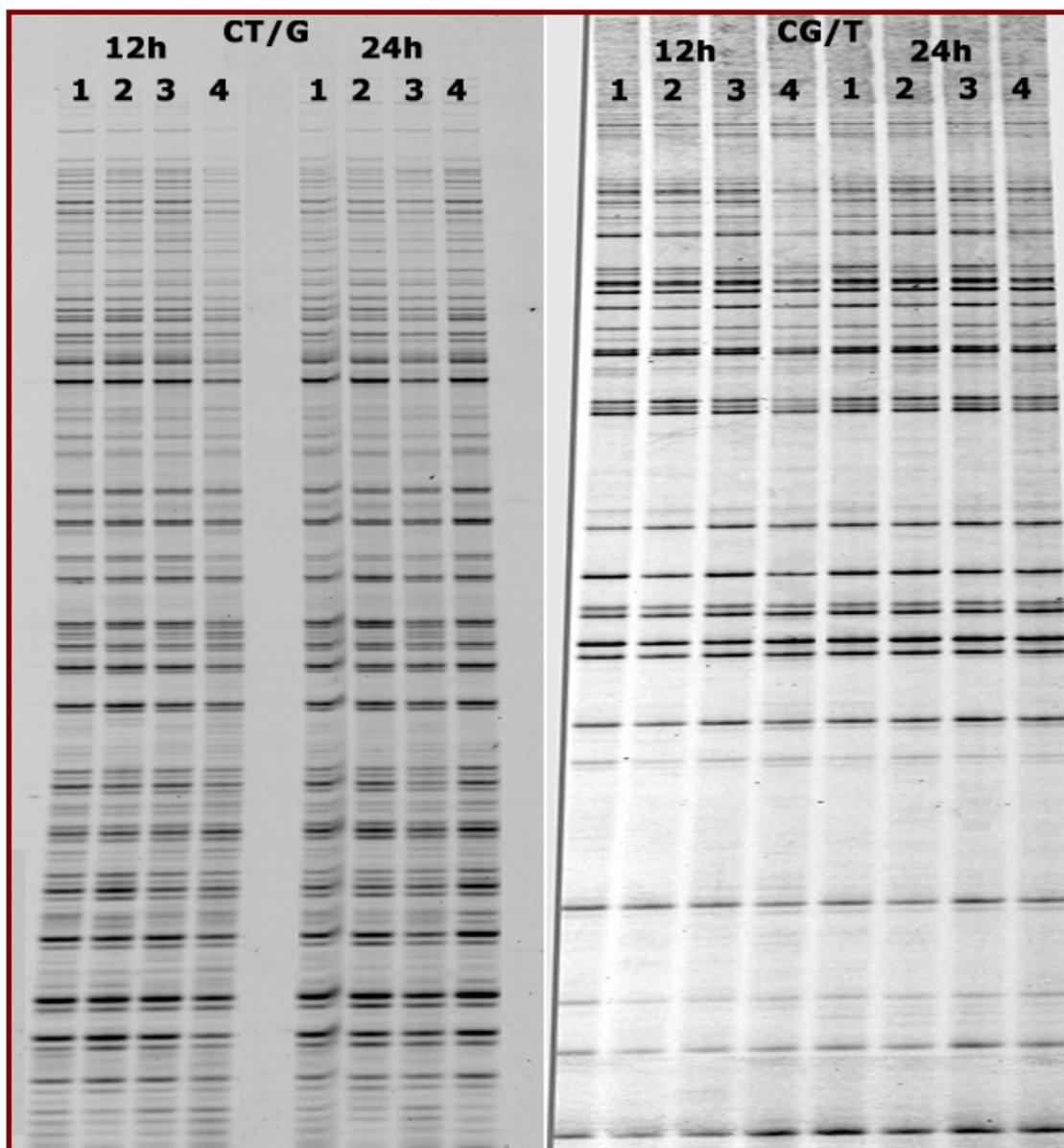
Questa tecnica è altamente ripetibile, le differenze rilevate, definite polimorfismi del DNA, saranno evidenziati allo stesso modo se si ripete la procedura con gli stessi campioni di DNA. I polimorfismi trovati nel *fingerprint* del DNA attraverso dei tagli delle endonucleasi possono essere il risultato di alterazioni della sequenza di DNA dovute a mutazioni che eliminano o creano un sito di restrizione, e inserzioni, delezioni o inversioni tra due siti di restrizione.

I polimorfismi di DNA identificati usando AFLP sono tipicamente ereditati secondo gli schemi mendeliani e possono quindi essere usati per la classificazione e l'identificazione di marcatori molecolari e per il mappaggio di loci genetici (Vos et al., 1995).

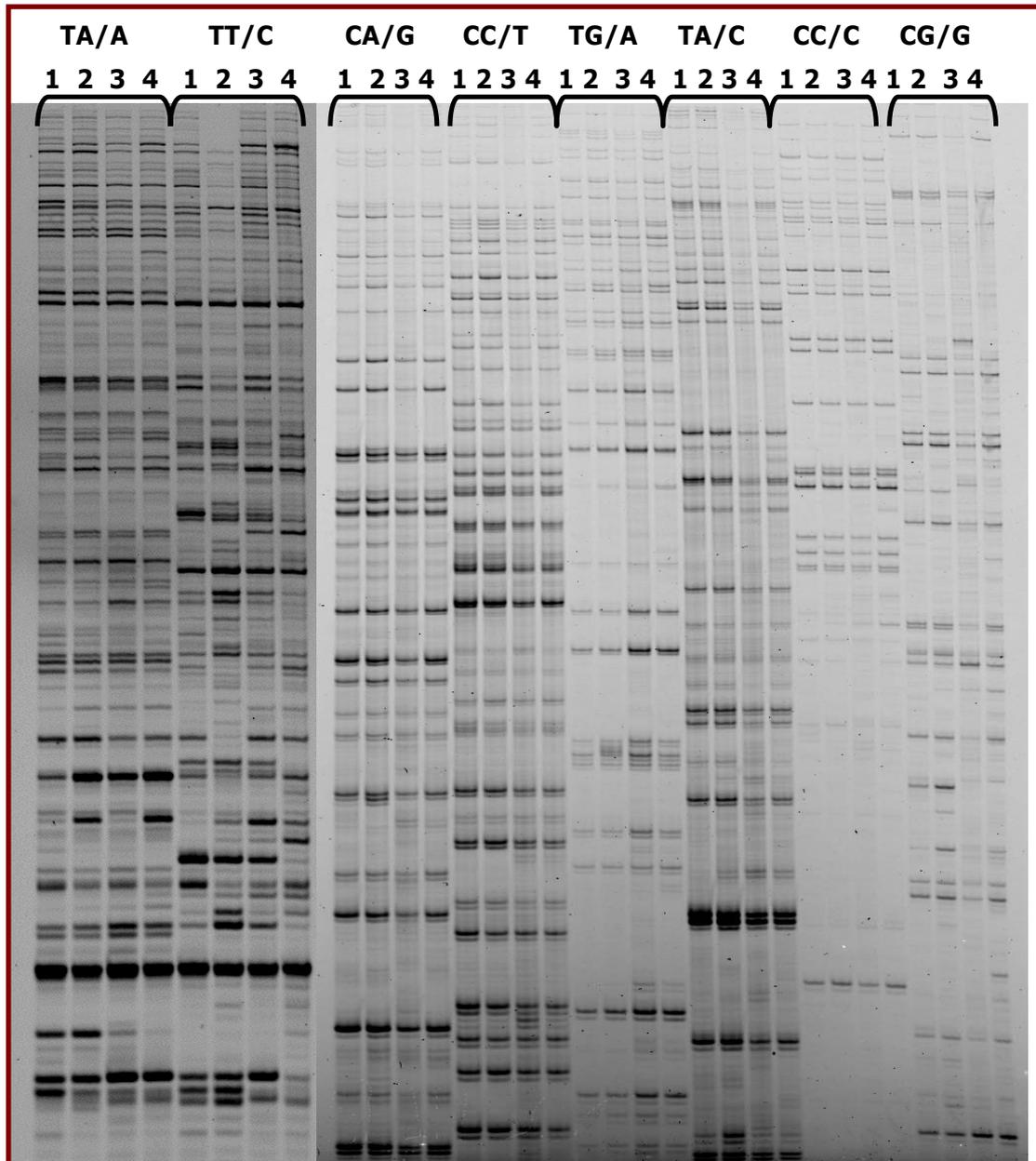
Particolare applicazione degli AFLP è quella che vede come materiale di partenza non il DNA genomico, bensì il cDNA o DNA complementare, ottenuto dalla trascrizione inversa del RNA messaggero in DNA. La tecnica cDNA-AFLP, consente una dettagliata caratterizzazione dell'espressione genetica di processi biologici, in quanto i polimorfismi possono generare proteine differenti con azione differente (Bachem et al., 1996).

La tecnica cDNA-AFLP-TP, messa a punto nel 2003 da Breyne et al., è un mezzo efficace e riproducibile per l'analisi quantitativa dell'espressione genica che consente di selezionare un solo frammento per ogni retrotrascritto e permette di analizzare l'insieme dei messaggeri con solo 32 diverse combinazioni di primer. Ognuna delle combinazioni di primer utilizzata nella presente tesi, infatti, ha

prodotto diversi frammenti corrispondenti ad altrettanti trascritti. Dall'analisi dei risultati si è rilevata una chiara uniformità (Figura 4.3) tra i campioni, a prescindere dal trattamento subito, nei primi due prelievi (12 e 24 ore dopo l'inoculo), mentre nei successivi tempi (48 e 72 ore dopo l'inoculo) sono stati evidenziati profili sensibilmente polimorfici (Figura 4.4).



**Figura 4.3** Scansione delle corse elettroforetiche relative agli AFLP-TP dei campioni prelevati dopo 12 e 24 ore dall'inoculo, ottenuti con le combinazioni di primer Bst-CT/Mse-G e Bst-CG/Mse-T. **1:** testimone di *Solanum tuberosum*; **2:** *Solanum tuberosum* inoculato; **3:** testimone *Solanum commersonii*; **4:** *Solanum commersonii* inoculato.



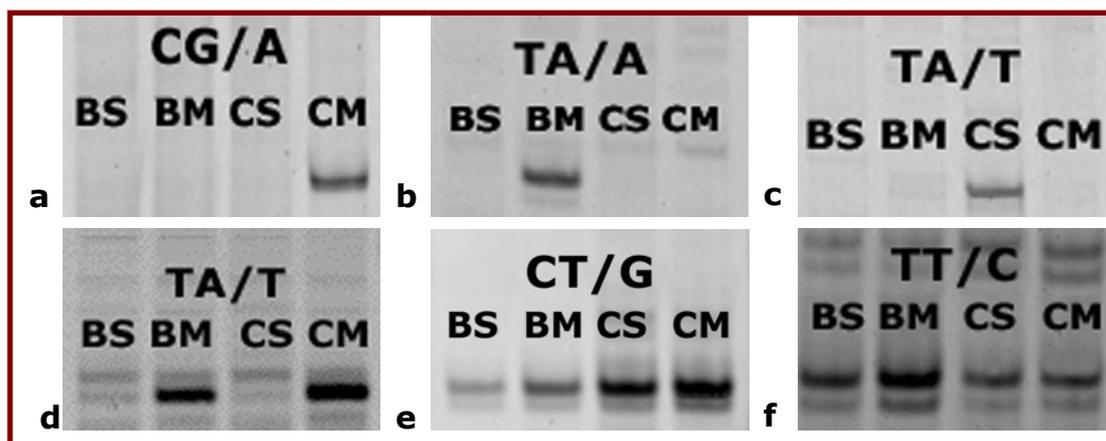
**Figura 4.4** Scansione delle corse elettroforetiche relative agli AFLP-TP dei campioni prelevati dopo 72 ore dall'inoculo, ottenuti con le combinazioni di primer Bst-TA/Mse-A, Bst-TT/Mse-C, Bst-CA/Mse-G, Bst-CC/Mse-T, Bst-TG/Mse-A, Bst-TA/Mse-C, Bst-CC/Mse-C e Bst-CG/Mse-G. **1:** testimone di *Solanum tuberosum*; **2:** *Solanum tuberosum* inoculato; **3:** testimone *Solanum commersonii*; **4:** *Solanum commersonii* inoculato.

Analizzando i gel ottenuti dall'analisi cDNA-AFLP-TP dei campioni prelevati dopo 72 ore dall'inoculo, è stato possibile individuare in media 80 frammenti per coppia di primer utilizzata, per un totale di 2558 diversi frammenti (Tabella 4.1). I frammenti

corrispondenti ai trascritti selettivamente espressi, sono stati selezionati in modo da determinare sei tipologie principali di trascritti (Figura 4.5).

**Tabella 4.1.** Sintesi del numero di frammenti individuati per combinazione di primer Bst/Mse utilizzata.

Bst Mse	CA	CC	CG	CT	TA	TC	TG	TT
A	65	83	89	91	66	77	87	87
C	73	88	82	89	86	57	87	76
G	80	84	75	62	88	94	74	68
T	83	87	85	88	65	73	83	86

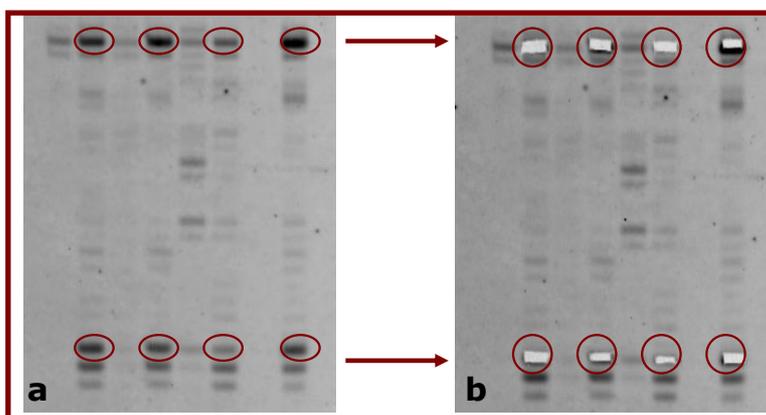


**Figura 4.5** Esempio di selezione dei frammenti differenzialmente espressi: **a**: trascritti presenti solo in *Solanum commersonii* inoculato con il patogeno; **b**: trascritti presenti solo in *Solanum tuberosum* inoculato con il patogeno; **c**: trascritti presenti solo in *Solanum commersonii* non inoculato con il patogeno; **d**: trascritti presenti solo nelle piante inoculate con il patogeno, indipendentemente dalla specie di partenza; **e**: trascritti presenti in tutti i campioni, e che mostrano un incremento quantitativo in *Solanum commersonii* inoculato con il patogeno; **f**: trascritti presenti in tutti i campioni, e che mostrano un incremento quantitativo in *Solanum tuberosum* inoculato con il patogeno.

La prima tipologia corrisponde a trascritti presenti solo in *Solanum commersonii* inoculato con il patogeno, che, essendo la specie resistente al batterio, possono essere il prodotto di geni coinvolti nella risposta di resistenza della pianta al patogeno (Figura 4.5 **a**). La seconda tipologia corrisponde a trascritti presenti solo in *Solanum tuberosum* inoculato con il patogeno, che possono essere il prodotto di geni coinvolti nella risposta della pianta ad un'infezione batterica (Figura 4.5 **b**). La terza tipologia corrisponde a trascritti presenti solo in *Solanum commersonii* non

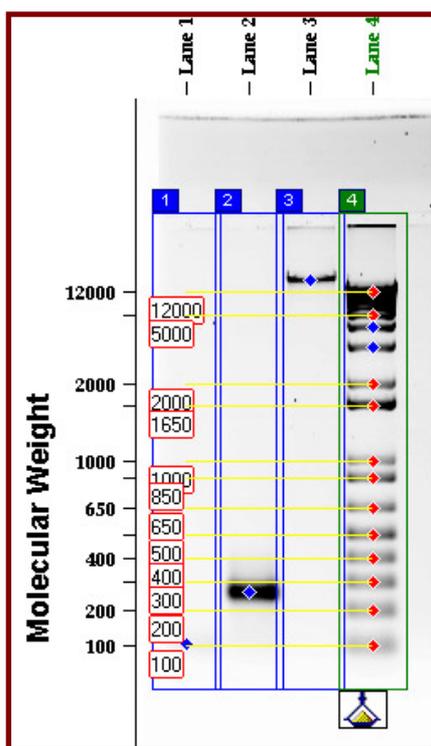
inoculato con il patogeno, che possono essere il prodotto di geni che vengono disattivati in seguito all'infezione (Figura 4.5 **c**). La quarta tipologia corrisponde a trascritti presenti solo nelle piante inoculate con il patogeno, indipendentemente dalla specie di partenza, che si presume possano essere geni coinvolti nella risposta delle piante alle ferite inferte sulle radici prima dell'inoculo o all'invasione del patogeno all'interno dell'ospite (Figura 4.5 **d**). La quinta corrisponde a trascritti presenti in tutti i campioni, e che mostrano un incremento quantitativo in *Solanum commersonii* inoculato con il patogeno, tali trascritti possono essere il prodotto di geni costituzionalmente espressi nelle due specie, ma che vengono prodotti in maggior misura dalla specie resistente in risposta all'infezione, e per questo probabilmente coinvolti nella risposta di resistenza (Figura 4.5 **e**). La sesta, infine, corrisponde a trascritti presenti in tutti i campioni, e che mostrano un incremento quantitativo in *Solanum tuberosum* inoculato con il patogeno; tali trascritti possono essere il prodotto di geni costituzionalmente espressi nelle due specie, ma che vengono prodotti in maggior misura dalla specie suscettibile in risposta all'infezione, e per questo probabilmente coinvolti nella risposta di resistenza (Figura 4.5 **f**).

I frammenti così individuati sono stati tagliati dal gel di acrilammide secondo la procedura riportata al punto 3.3.3 F. Successivamente, per verificare il corretto prelievo degli stessi, è stata eseguita una scansione del gel dopo il taglio, in modo da verificare l'assenza delle bande selezionate (Figura 4.6).



**Figura 4.6** Verifica del corretto taglio del gel dei frammenti individuati dall'analisi. **a**: scansione del gel prima del taglio, con particolare dei frammenti individuati da asportare. **b**: scansione del gel dopo il taglio, con particolare dei vuoti lasciati dall'asportazione del gel.

Per verificare ulteriormente il corretto taglio del frammento dal gel, è stata valutata la corrispondenza del peso molecolare del frammento tagliato, con quello del frammento da tagliare, individuato al momento dell'analisi sul gel di acrilammide. A tal fine il cDNA presente nel frammento di gel è stato eluito in 100 µl di acqua sterile ed un'aliquota di questa soluzione è stata riamplicata nelle stesse condizioni utilizzate per l'amplificazione selettiva degli AFLP. Il risultato di tale reazione è stato visualizzato su un gel di agarosio come descritto al punto 3.3.2 (Figura 4.7).



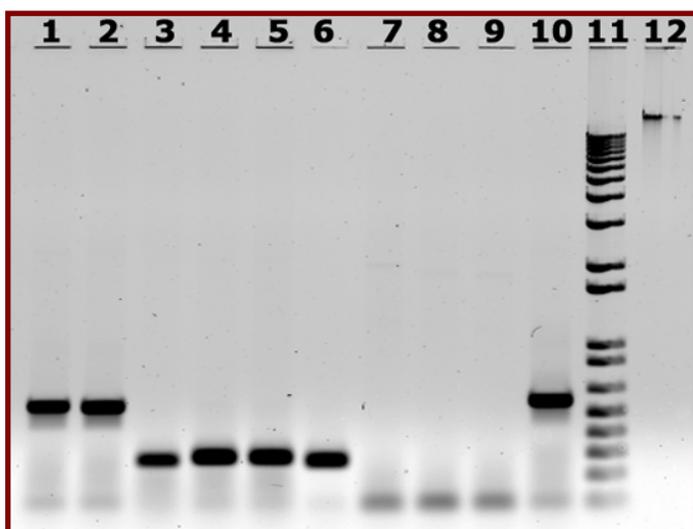
**Figura 4.7** Gel di agarosio per la verifica del peso molecolare di un frammento di cDNA tagliato dal gel di acrilammide e in seguito riamplicato. **Lane2**: banda riamplicata; **Lane3**: Standard di concentrazione DNA 50 ng/ $\mu$ l; **Lane4**: Standard di riferimento del peso molecolare *1Kb Plus* (Invitrogen).

Al fine di ottenere un ottimale sequenziamento dei frammenti estratti dal gel, è stato effettuato un clonaggio degli stessi secondo la procedura riportata al punto 3.3.4. le colonie positivamente trasformate (Figura 4.8).



**Figura 4.8** Piastra di clonaggio con colonie di *Escherichia coli*. Le colonie bianche, evidenziate con la freccia, si riferiscono a batteri che hanno integrato un plasmide ricombinante (colonie bianche), mentre quelle blu hanno integrato un plasmide non ricombinante.

Le colonie di colore bianco, che hanno integrato un plasmide ricombinante sono state prelevate dalla piastra e sottoposte ad un'amplificazione di controllo, secondo la procedura riportata al punto 3.3.4, in maniera tale da verificare se il plasmide è stato correttamente ricombinato con il frammento inserito (Figura 4.9).



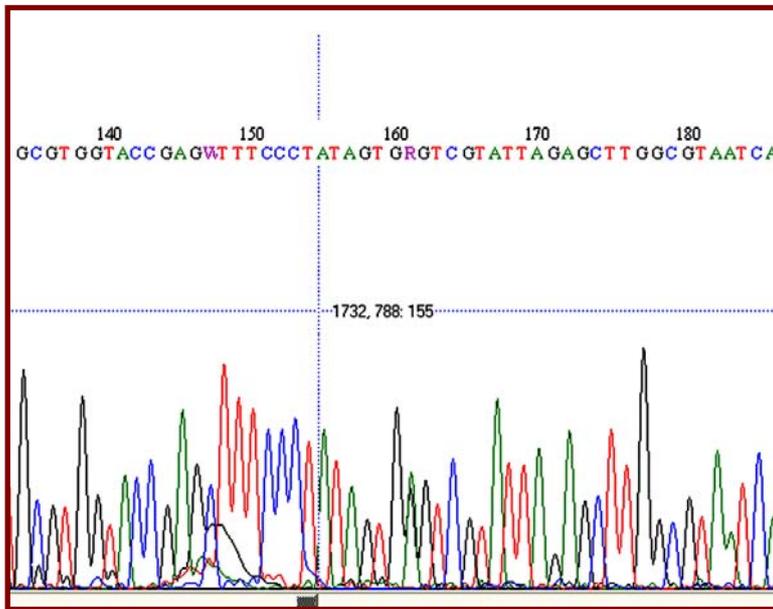
**Figura 4.9** Visualizzazione su gel di agarosio dei risultati dell'amplificazione di controllo eseguita sulle colonie che hanno integrato un plasmide ricombinante. **1 e 2:** plasmide che ha integrato il frammento n°22; **3, 4, 5 e 6:** plasmide che ha integrato il frammento n°31; **7, 8 e 9:** plasmide che non ha integrato il frammento n°38; **10:** plasmide che ha integrato il frammento n°38; **11:** Standard di riferimento di peso molecolare *1Kb Plus* (Invitrogen); **12:** Standard di concentrazione DNA 50 ng/ $\mu$ l.

L'analisi dei gel ottenuti dalle 32 combinazioni cDNA-AFLP-TP dei campioni prelevati 72 ore dopo l'inoculo, ha permesso di selezionare complessivamente 120 trascritti selettivamente espressi, pari a circa il 4,7% del totale dei frammenti individuati, raggruppati nelle sei categorie summenzionate (Tabella 4.2), di questi ne sono stati sequenziati 34, pari a circa il 28% dei frammenti differenzialmente espressi individuati.

**Tabella 4.2.** Frammenti selettivamente espressi individuati (*Cmm*: *Solanum commersonii*, *Tbr*: *Solanum tuberosum*).

	<i>Cmm</i> inoculato	<i>Cmm</i> testimone	<i>Tbr</i> inoculato	Piante inoculate	Modulate <i>Cmm</i>	Modulate <i>Tbr</i>	Totale
<b>N° Frammenti</b>	<b>55</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>32</b>	<b>12</b>	<b>120</b>
<b>Polimorfismo</b>	<b>2,15%</b>	<b>0,27%</b>	<b>0,35%</b>	<b>0,20%</b>	<b>1,25%</b>	<b>0,47%</b>	<b>4,69%</b>
<b>N° Sequenze</b>	<b>24</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>34</b>
<b>Sequenziamento</b>	<b>43,64%</b>	<b>14,29%</b>	<b>33,33%</b>	<b>40,00%</b>	<b>9,38%</b>	<b>8,33%</b>	<b>28,33%</b>

I frammenti clonati sono stati sottoposti a reazione di sequenziamento utilizzando il primer Bst; al fine di confermare i risultati ottenuti dal sequenziamento e per migliorare le informazioni sulla sequenza, la reazione è stata replicata almeno tre volte. Le sequenze grezze così ottenute (Figura 4.10), sono state processate mediante il software BioEdit al fine di minimizzare la presenza di basi dubbie, eliminare le eventuali parti di sequenza relative al vettore di clonaggio, che possono essere state accidentalmente sequenziate insieme al frammento di trascritto ed eliminare la parte di sequenza relativa ai primer utilizzati per l'AFLP-TP.



**Figura 4.10** Esempio di Elettroferogramma ottenuto dalla reazione di sequenziamento di uno dei frammenti clonati con successo.

Successivamente le sequenze così ripulite, sono state sottoposte ad analisi bioinformatica, al fine di determinarne l'annotazione funzionale, tramite il software KAAS del KEGG (Figura 4.11) e manuale tramite analisi BLAST nei database CAB UNINA (Figura 4.12), NCBI (Figura 4.13) e TIGR (Figura 4.14).

File Modifica Visualizza Preferiti Strumenti ?

Indietro Cerca Preferiti

Indirizzo <http://www.genome.jp/kegg/>

KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Search KEGG Search BRITE Get Entry

KEGG Home  
Introduction  
Overview  
Release notes

KEGG Databases  
Current statistics

KEGG Identifiers

KEGG Software

KGML

KEGG API

KEGG FTP

Feedback  
GenomeNet

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

A grand challenge in the post-genomic era is a complete computer representation of the cell, the organism, and the biosphere, which will enable computational prediction of higher-level complexity of cellular processes and organism behaviors from genomic and molecular information. Towards this end we have been developing a bioinformatics resource named KEGG as part of the research projects of the Kanehisa Laboratories in the Bioinformatics Center of Kyoto University and the Human Genome Center of the University of Tokyo.

Main entry points to the KEGG web service

KEGG2 KEGG Table of Contents Update notes

PATHWAY KEGG pathway maps for biological processes

BRITE Functional hierarchies of biological systems

GENES Gene catalogs and ortholog relations in complete genomes

LIGAND Chemical compounds, drugs, glycans, and reactions

Organism-specific entry points to the KEGG web service

KEGG Organisms Choose   Help

Subject-specific entry points to the KEGG web service

DRUG Drug structures, structure maps, and classification

GLYCAN Glycan structures, pathway maps, and analysis tools

REACTION Reactions and chemical structure transformation patterns

KAAS KEGG automatic annotation server

Copyright 1995-2007 Kanehisa Laboratories

**Figura 4.11** Sito del KEGG su cui è stata eseguita l'annotazione funzionale utilizzando il software KASS.

TomatEST db : Home Page - Microsoft Internet Explorer

File Modifica Visualizza Preferiti Strumenti ?

Indietro Cerca Preferiti

Indirizzo: <http://biosrv.cab.unina.it/tomatestdb/>



**TomatEST DB**

- Home Page
- Processing protocol
- References
- EST Browser
- Cluster Browser
- Transcript Browser
- Blast Search
- Go statistics

This database is a collection of tomato EST sequences downloaded from *dbEST*. We are committed to update our database at each 5000 increase of ESTs from tomato species at *dbEST* (Last release January 2007).

The table below shows the current status of the database:

Source	# ESTs	# non redundant ESTs	# Gene Indices	# Transcript Indices	# Contigs	# Singletons
<i>Solanum lycopersicum</i>	250332	190763	44759	45634	17629	28005
<i>Solanum pennellii</i>	8346	6888	3863	3870	730	3140
<i>Solanum habrochaites</i>	8000	7868	4101	4110	907	3203
<i>Solanum lycopersicum</i> X <i>Solanum pimpinellifolium</i>	1008	979	744	744	94	650
All	267906	206497	53467	54358	19360	34998



**PotatEST DB**

- Home Page
- Processing protocol
- References
- EST Browser
- Cluster Browser
- Transcript Browser
- Blast Search
- Go statistics

This database is a collection of potato EST sequences downloaded from *dbEST*. We are committed to update our database at each 5000 increase of ESTs from potato species at *dbEST* (Last release January 2007).

The table below shows the current status of the database:

Source	# ESTs	# non redundant ESTs	# Gene Indices	# Transcript Indices	# Contigs	# Singletons
<i>Solanum tuberosum</i>	226805	206696	62752	63870	19732	44138
<i>Solanum chacoense</i>	7752	7750	7192	7192	306	6886
All	234557	214446	69944	71062	20038	51024

**Figura 4.12** Sito CAB-UNINA con i database EST di patata e pomodoro per l'annotazione manuale tramite BLAST.

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST/blastn suite: BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [more...](#)

**Enter Query Sequence**

Enter accession number, gi, or FASTA sequence  Clear Query subrange

>45  
 CAGCGCCTGAAGGAGATTCTTACCAGCCCTGGCCTCGCACCTCACGGCTCATGTAATCGAAAATCAGC  
 GATGCCGTCATAGCACGGCGGATTGGGTAGTCACTAAGGCTCGCCATCCGATGACCTTATCGTCTATC  
 AAGCATCACCAAGCGGGTAACGATCATGAGCCTCAAGTCGCTTAGCATGTCATCAGGGTTACGGGAGT  
 GGTCTCGAACGTGGAACCTCGTTCGCAATCCCTTGGTTATAAATAGTGGCTATCGAGGTTGCATCAACTGG

From   
 To

Or, upload file

Job Title   
 Enter a descriptive title for your BLAST search

**Choose Search Set**

Database  Human genomic + transcript  Mouse genomic + transcript  Others (nr etc.):  
 Human genomic plus transcript (Human G+T)

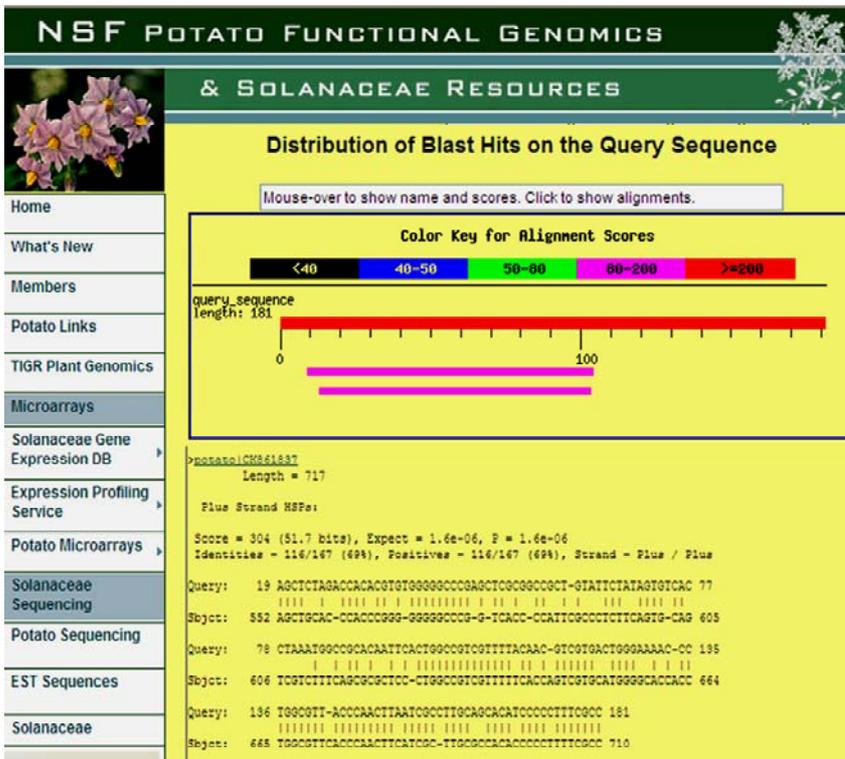
Entrez Query Optional   
 Enter an Entrez query to limit search

**Program Selection**

Optimize for  Highly similar sequences (megablast)  More dissimilar sequences (discontiguous megablast)  Somewhat similar sequences (blastn)  
 Choose a BLAST algorithm

Search database Human G+T using Megablast (Optimize for highly similar sequences)  
 Show results in a new window

**Figura 4.13** Sito dell'NCBI utilizzato per l'annotazione manuale tramite BLAST.



**Figura 4.14** Sito del TIGR utilizzato per l'annotazione manuale tramite BLAST.

L'incremento delle informazioni genomiche è la base per comprendere i principi che regolano i sistemi biologici complessi, come la cellula, l'organismo e la biosfera, e consentire la loro applicazione in campo medico ed industriale. Le attuali tecnologie informatiche non permettono di svelare i più elevati livelli di complessità di alcuni sistemi biologici, sebbene siano capaci di trovare le unità fondamentali costituenti i geni, le proteine e le sostanze chimiche. Dal 1995 Kanehisa et al., stanno sviluppando metodi basati sulle conoscenze disponibili in letteratura per determinare i complessi comportamenti sistemici della cellula e dell'organismo, partendo da informazioni genomiche. Le conoscenze disponibili sono raccolte nel KEGG, l'Enciclopedia dei Geni e dei Genomi di Kyoto, e le relative tecnologie bioinformatiche sono state sviluppate sia per la ricerca di base che per le applicazioni pratiche (Kanehisa et al., 2006).

L'analisi BLAST delle 34 sequenze studiate ha consentito di individuare diverse omologie nei vari database interrogati; sono state considerate utili per la discussione soltanto quelle che hanno prodotto un *e-value* dell'ordine di  $10^{-7}$  o inferiore (Tabella 4.3). Nel caso in cui una sequenza abbia riscontrato più di una omologia significativa, è stata selezionata per la successiva discussione, quella con *e-value* inferiore dando preferenza, data la natura dei nostri frammenti, a quelle descritte in patata, in altre specie vegetali ed a quelle ottenute da EST o librerie di cDNA.

Tabella 4.3. Risultati dell'annotazione manuale tramite BLAST nei database TIGR, UNINA ed NCBI.

Sequenza	DATABASE INTERROGATO PER L'ANALISI BLAST		Proteine NCBI
	EST TIGR	EST/NUCLEOTIDI NCBI	
<b>12</b>	<p>Pomodoro: <b>AW650353</b> putativo gene della proteina ribosomiale S7 (Score 385 e-value: <math>7,5 \cdot 10^{-13}</math>); Nicotiana benthamiana: <b>TC8100</b> putativo gene di una proteina a funzione ignota (Regolatore della retinitis pigmentosa GTPasi) (Score 275 e-value: <math>1,1 \cdot 10^{-7}</math>)</p> <p>Pomodoro: <b>AW650353</b> (Score 64 e-value: <math>2 \cdot 10^{-32}</math>)</p>	<p>Melo: <b>EB107597</b> (Score 189 e-value <math>3 \cdot 10^{-45}</math>); Lactoris fernandeziana: <b>AF123781</b> putativo gene della proteina ribosomiale S7 (Score 122 e-value: <math>3 \cdot 10^{-25}</math>)</p>	-
<b>13</b>			
<b>32</b>	<p>Patata: <b>TC118942</b> putativo gene dell'RNA ribosomiale (Score 382 e-value: <math>8,7 \cdot 10^{-12}</math>); Nicotiana benthamiana: <b>TC8301</b> putativo gene dell'RNA ribosomiale (Score 384 e-value: <math>8,2 \cdot 10^{-13}</math>)</p>	<p>Pomodoro: <b>AI776854</b> (Score 41 e-value: <math>6 \cdot 10^{-15}</math>) <b>AW033702</b> (Score 41 e-value: <math>6 \cdot 10^{-15}</math>) <b>AW738076</b> (Score 41 e-value <math>6 \cdot 10^{-15}</math>); <b>BI924824</b> (Score 41 e-value: <math>6 \cdot 10^{-15}</math>); <b>BI924984</b> (Score 41 e-value: <math>6 \cdot 10^{-15}</math>); Patata: <b>BG595403</b> (Score 41 e-value <math>6 \cdot 10^{-15}</math>); <b>BG597474</b> (Score 41 e-value: <math>6 \cdot 10^{-15}</math>); <b>BG598633</b> (Score 41 e-value: <math>6 \cdot 10^{-15}</math>); <b>CK271964</b> (Score 41 e-value: <math>6 \cdot 10^{-15}</math>) <b>CK272644</b> (Score 41 e-value <math>6 \cdot 10^{-15}</math>)</p>	<p><b>CF847579</b> libreria cdNA dell'interazione Phytophthora sojae - Soia (Score 324 e-value: <math>9 \cdot 10^{-86}</math>); Peronospora lamii: <b>AY273968</b> putativo gene dell'RNA ribosomiale (Score 425 e-value: <math>3 \cdot 10^{-116}</math>)</p>
<b>37</b>	<p>Patata: <b>TC118970</b> putativo gene dell'RNA ribosomiale (Score 194 e-value: <math>8,7 \cdot 10^{-10}</math>); Nicotiana benthamiana: <b>CK284032</b> putativo gene dell'RNA ribosomiale (Score 201 e-value: <math>3,7 \cdot 10^{-11}</math>)</p>		<p><b>CV937372</b> libreria cdNA dell'interazione Phytophthora infestans Patata (Score 326 e-value: <math>3 \cdot 10^{-86}</math>)</p>
<b>38</b>			
<b>39</b>			
<b>43</b>			
<b>44</b>			
<b>45</b>			<p>Alkaliphilus metalliredigens: <b>YP001319533</b> putativo gene della N-acetiltransferasi (Score 246 e-value <math>7 \cdot 10^{-20}</math>)</p>
<b>53</b>			

**Tabella 4.3.** Risultati dell'annotazione manuale tramite BLAST nei database TIGR, UNINA ed NCBI.

Sequenza	DATABASE INTERROGATO PER L'ANALISI BLAST			Proteine NCBI
	EST TIGR	EST UNINA	EST/ Nucleotidi NCBI	
<b>59</b>	-	-	-	-
<b>61</b>	-	-	-	-
<b>70</b>	-	-	-	Phytophthora infestans : <b>AAV92918</b> ipotetica poliproteina (Score 62.8 e-value : $7e^{-9}$ )
<b>81</b>	-	-	-	-
<b>96</b>	-	-	-	Pseudomonas fluorescens : <b>YP351134</b> ipotetica proteina (Score 259 e-value $2e^{-21}$ )
<b>98</b>	-	-	-	-
<b>111</b>	-	-	-	Panicum virgatum : <b>DN148885</b> libreria cDNA (Score 294 P: $7e^{-77}$ )
<b>113</b>	-	-	-	Pseudomonas putida : <b>AF126201</b> putativo gene della desulfurizzazione degli esteri di solfato (Score 176 e-value : $5e^{-34}$ )
<b>114</b>	-	-	-	-
<b>115</b>	-	-	-	-
<b>116</b>	-	-	-	Patata: <b>TC125490</b> putativo gene dell'apoproteina A1 della clorofilla A del fotosistema I P700 (Score 280 P: $2,3 * e^{-7}$ ) Pomodoro: <b>AW934517</b> (Score 49 e-value: $5 * e^{-20}$ ); Patata: <b>CK261456</b> (Score 49 e-value $5 * e^{-20}$ ) Patata: <b>CK261456</b> libreria cDNA in risposta a stress abiotici (Score 97 e-value : $1 * e^{-17}$ )
<b>118</b>	-	-	-	-
<b>119</b>	-	-	-	-
<b>120</b>	-	-	-	-
<b>7</b>	-	-	-	-
<b>112</b>	-	-	-	-
<b>117</b>	-	-	-	-
<b>9</b>	-	-	-	Uomo: <b>ZP01732662</b> ipotetica proteina (Score 140 e-value : $3 * e^{-32}$ )
<b>49</b>	-	-	-	-
<b>52</b>	-	-	-	-
<b>60</b>	-	-	-	-
<b>63</b>	-	-	-	-
<b>87</b>	-	-	-	-
<b>48</b>	-	-	-	-

L'analisi bioinformatica ha consentito di raggruppare le sequenze dei frammenti cDNA-AFLP-TP selettivamente espressi, in base all'omologia con putativi geni o peptidi presenti nelle banche dati mondiali consultate, in tre insiemi (Tabella 4.4). Il primo insieme raggruppa le sequenze, in totale 4 pari a circa il 12% di quelle sequenziate, che hanno trovato omologia con putativi geni o proteine a funzione nota. Il secondo insieme riguarda sequenze, in totale 5 pari a circa il 15% di quelle sequenziate, che hanno trovato omologia con librerie di cDNA od ipotetiche proteine descritte in banca dati, ma con funzione ignota. Il terzo ed ultimo insieme raggruppa invece tutte quelle sequenze per le quali non è stato possibile determinare un'omologia soddisfacente, ossia con un *e-value* inferiore a  $10^{-7}$ , con putativi geni o proteine presenti in banca dati.

**Tabella 4.4.** Annotazione delle sequenze ottenute dai frammenti selettivamente espressi nelle banche dati genomiche e proteiche (Tipologia 1: frammenti specifici di *Solanum commersonii* inoculato; Tipologia 3: frammenti specifici di *Solanum commersonii* controllo).

	<b>Annotazione funzionale</b>	<b>Omologia con funzione ignota</b>	<b>Nessuna omologia</b>
<b>N° Sequenze</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>25</b>
<b>Incidenza sul totale</b>	<b>11,76%</b>	<b>14,71%</b>	<b>73,53%</b>
<b>Selezione dei frammenti</b>	<b>Tipologia 1</b>	<b>4 tipologia 1 1 tipologia 3</b>	<b>Tutte le tipologie</b>

Le 4 sequenze che hanno trovato omologia soddisfacente con putativi geni presenti in banca dati sono classificati nella struttura Brite del KASS tra gli enzimi, le proteine della fotosintesi, i ribosomi ed i trasportatori:

#### A) Enzimi

- Transferasi
- Aciltransferasi
- Trasferimento di gruppi non amminici
  - Sequenza n°**45** omologa alla putativa sequenza della N-acetiltransferasi, codice di riferimento KEGG: *K03823*

#### B) Proteine della fotosintesi

- Fotosistema I (P700 clorofilla A)
  - Sequenza n°**116** omologa al putativo gene codificante per l'Apoproteina A1 (PSAA), codice di riferimento KEGG: *K02689*

### C) Ribosomi

- Sequenza n°**12** omologa al putativo gene codificante per la proteina ribosomiale S7, codice di riferimento KEGG: K02993

### D) Trasportatori

- Elaborazione di informazioni ambientali
- Trasportatori di membrane
- Sequenza n°**113** omologa al putativo gene codificante per il trasportatore di tipo ABC, codice di riferimento KEGG: K02010

La sequenza n° **45** è stata ottenuta da un frammento differenzialmente espresso nella specie resistente *Solanum commersonii* 72 ore dopo l'inoculo con il batterio fitopatogeno *Ralstonia solanacearum*, amplificato con la combinazione di primer Bst CA/Mse G:

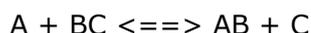
**Primer MSE 5'** GATGAGTCCTGAGTAAGCAGCGCCTGAAGGAGATTCTTACCCAGCCCC  
TGGCCTCGCACCTCACGGCTCATGTAAATCGAAAAGTCAGCGATGCCGTCATAGCACGCG  
CGATTGCGGTAGTCACTAAGGCTCGCCCATCCGATGACCTTATCGTGCTCATCAAGCATCA  
CCAGAACGGGGTAACGATCATGAGCCTCAAGTCGCTCTAGCATGTCATCAGGGTTACGCG  
GAGTGGTCTCGAACGTGGAACCTTCGTTCCGCAATCCCTTGGTTATAAATAGTGGCTATCGA  
GGTTGCATCAACTGGCTCAGCAGGACGGATACGCATGATCGGGTTCATTATGTTGGTAGT  
AACAAACATTTGAATCAAAAAATGGAGATTCAATAGGCTTGCCTTGATCACTACGCAGTC  
**3' Primer BST (complementare ed invertito)**

L'annotazione funzionale ha prodotto uno *score* di 280 ed un *e-value* di  $7 \cdot 10^{-20}$  con l'ipotetica struttura aminocidica dell'N-acetiltransferasi:

```
Query 309 MRIRPAEPVDATSIATIYNQGI AERSSTFETTPRNPDDMLERLEAHDY PVLVMLDEHDK 130
      +R R + P DA+ IA IYNQGI ERSSTFET PR+P+++ R +P++V+ +E +
Sbjct 14 VRARASTPKDASGIARIYNQGI EERSSTFET CPRSPEEV--RAWYDGAHP I VVV-EEGGE 70

Query 129 VIGWASLSDYRNRACYDGIADFSIYMSREVRGQGLGKNLLQAL 1
      +I +A+ +YR R CY G+A+FS+Y+ RE RG+G G+ ++AL
Sbjct 71 IIAFAATFEYRPRECYRGVAEFSVYVDREHRGRGAGRLAMEAL 113
```

Le transferasi sono enzimi che catalizzano reazioni di trasferimento di gruppi secondo lo schema generico:



Nel caso dell'N-acetiltransferasi, il gruppo trasferito è il l'acetile (CH<sub>3</sub>(C=O)-); l'acetiltransferasi o transacetilasi interviene in numerosi processi biochimici, tra cui la sintesi degli acidi grassi (Lehninger et al., 1994),

L'acetilazione è una reazione chimica in cui viene legato un gruppo acetile ad una molecola. Allfrey et al., nel 1964, hanno evidenziato come l'acetilazione della cromatina sia essenziale per indurre alti livelli di trascrizione genica e come esista

una correlazione positiva tra il livello di acetilazione degli istoni e l'espressione genica. In particolare l'aumento dell'attività dell'istone-acetiltransferasi viene considerato un evento da cui non si può prescindere affinché abbia luogo la trascrizione genica (Davie et al., 1999). L'acetilazione degli istoni avviene sui residui N-terminali delle classi H2B, H3 e H4 ed è regolata dall'equilibrio fra l'attività di due enzimi: l'istone acetiltransferasi (HATs), che trasferisce tramite l'acetilCoA un gruppo acetile alla lisina e l'istone deacetilasi (HDACs), entrambi reclutati localmente dalle proteine legate al DNA. L'effetto dell'acetilazione degli istoni è il rimodellamento della cromatina che passa da una struttura inaccessibile ad una più permissiva (Bailey et al., 1996; Meaney and Szyf, 2005).

Al contrario la deacetilazione degli istoni è il primo traguardo nel passaggio dallo stato permissivo allo stato non permissivo della cromatina, a cui seguono successivamente la metilazione degli istoni e la metilazione del DNA; la cromatina assume così una conformazione ultra-impacchettata che inibisce ogni possibile attività di trascrizione genica (Geiman et al., 2002).

La sequenza n° **116** è stata ottenuta da un frammento differenzialmente espresso nella specie resistente *Solanum commersonii* 72 ore dopo l'inoculo con il batterio fitopatogeno *Ralstonia solanacearum*, amplificato con la combinazione di primer Bst TC/Mse C:

**Primer MSE 5'** GATGAGTCCTGAGTAA**C**AATCGTACCCAGTTGGTCCTATAACATGTGACCCGCTATCTGGAAAAGAATTGCGATAGCTGAATGAAGTGGCTGAGTCGTGCAATTACATGAAAGTCTTTCACACTC**GA**GATCACTACGCAGTC **3' Primer BST (complementare ed invertito)**

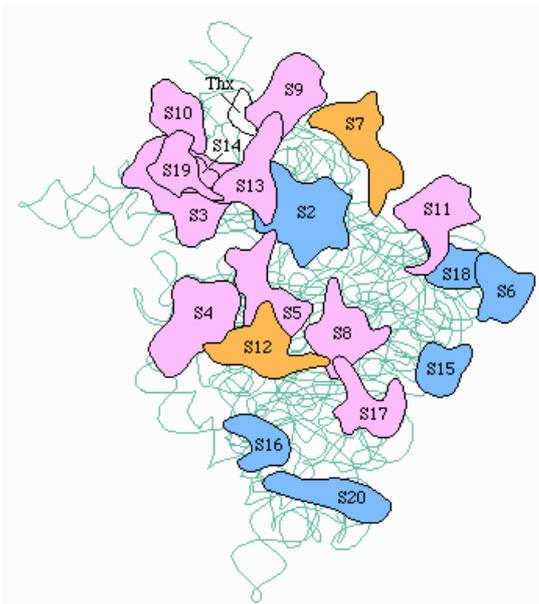
L'annotazione funzionale ha prodotto uno *score* di 246 ed un *e-value* di  $2,3 \cdot 10^{-7}$  con il putativo gene codificante per l'apoproteina A1 della clorofilla A del fotosistema I P700:

```
Query: 72 CCA-CTTCATTCAGCTATCGCAATTCTTTCCAGATAGCGGGTCACATGTATAGGACCAA 14
      ||| | ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 48 CCATCACCATTTAGCTATTGCAATTCTTTCTGATAGCGGGTCACATGTATAGGACCAA 107

Query: 13 CTGGGGTA 6
      |||||
Sbjct: 108 CTGGGGTA 115
```

Le apoproteine sono la parte proteica degli enzimi o dei gruppi funzionali proteici, nel particolare l'apoproteina A1 fa parte del gruppo proteica del fotosistema I P700. La sequenza n° **12** è stata ottenuta da un frammento differenzialmente espresso nella specie resistente *Solanum commersonii* 72 ore dopo l'inoculo con il batterio





**Figura 4.15** Rappresentazione grafica della subunità ribosomiale minore 30S con dettaglio delle proteine ribosomiali tra cui la S7.

La sequenza n° **113** è stata ottenuta da un frammento differenzialmente espresso nella specie resistente *Solanum commersonii* 72 ore dopo l'inoculo con il batterio fitopatogeno *Ralstonia solanacearum*, amplificato con la combinazione di primer Bst CA/Mse G:

**Primer MSE 5'** GATGAGTCCTGAGTAAAGGGTGGACCTGGCCTATCTAACCGACCTGGCAGAGAT  
 CATCGGCCGCTCCATGGCTGGACACGCGGCTGCTCAGCGCCTCTGCACGGGGAGTAAAACACTAC  
 CTCGGCGTGGTGCCGGGCTCCGGCATCAAGACCTTGAAGACCTCAAGGGCAAGCGCGTGGCGGTG  
 TTCCGAGGCACGGCCAGCCAGTTGTCGTTTCGACAGCGCATTGGCCAGCCAGGGCTTGAGCGAGAAT  
**GATCACTACGCAGTC 3' Primer BST (complementare ed invertito)**

L'annotazione ha prodotto uno *score* di 279 ed un *e-value* di  $7,0 \cdot 10^{-24}$  con il putativo gene codificante per il trasportatore periplasmatico di tipo ABC (*ATP Binding Cassette*):

```

Query  49  HGLDTRLLSASARGVKHYLGVPVPGSGIKTLQDLKGRVAVFRGTASQLSFDALASQGLS  228
      +GLDTRLLSASARGVKHYLGVPVPGSGIKTL+DLKGRVAVFRGTA+QLSFD+ALAS+GLS
Sbjct  112  NGLDTRLLSASARGVKHYLGVPVPGSGIKTLEDLKGKRVAVFRGTATQLSFDAAALASRGLS  171

Query  229  E  231
      E
Sbjct  172  E  172
  
```

I trasportatori ABC ("ATP-Binding-Cassette") sono permeasi di membrana ATP-dipendenti che mediano il trasporto di differenti substrati attraverso le membrane biologiche, contro un gradiente di concentrazione (Driessen, et al., 2000). Essi fanno parte di una delle più grandi ed antiche superfamiglie di proteine, presente in tutti gli organismi dai Procarioti all'uomo. Le proteine sono classificate come trasportatori ABC sulla base della loro sequenza e dell'organizzazione dei loro

domini di legame dell'ATP, conosciuti anche come siti di legame nucleotidico (NBFs).

I trasportatori ABC utilizzano l'energia prodotta dall'idrolisi per trasportare diverse sostanze attraverso la membrana cellulare. Queste proteine permettono il controllo della secrezione in entrata ed in uscita, di molecole piccole e grandi, al fine di creare o mantenere, all'interno del citoplasma e dei vari compartimenti cellulari, condizioni compatibili con lo svolgimento delle reazioni metaboliche.

Nei batteri essi trasportano sostanze essenziali quali zuccheri, vitamine e ioni metallici all'interno della cellula; negli Eucarioti, invece, trasportano maggiormente molecole all'esterno della membrana plasmatica o all'interno di organelli dotati di membrana, come il reticolo endoplasmatico ed i mitocondri.

La specificità dei trasportatori ABC per i substrati può variare in un range piuttosto ampio. Alcuni trasportatori sono in grado di veicolare, seppur con diversa efficienza, una serie di sostanze di origine esogena ed endogena tra cui piccole molecole organiche di sintesi, come ad esempio fungicidi, antibiotici steroidei e peptidi (Kolaczowski et al., 1996; Li et al., 1996), acidi organici, metalli pesanti, ormoni steroidei (Martinoia et al., 1993). In altri casi i trasportatori ABC hanno una specificità ristretta ad una o poche sostanze.

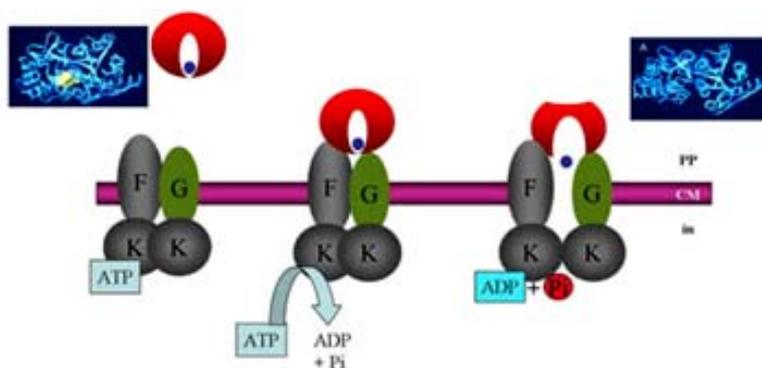
Molti trasportatori ABC possono essere classificati come mezzi trasportatori o trasportatori completi. Questi ultimi presentano entrambi i tipici motivi TMs e NBFs, mentre i primi presentano solamente uno dei due, hanno bisogno di combinarsi con un altro mezzo trasportatore complementare per essere funzionali (Higgins, 1992).

Una delle più importanti caratteristiche che contraddistingue queste molecole consiste nel fatto che esse possono riconoscere ed espellere una sostanza tossica non appena questa entra nel plasmalemma, impedendole di raggiungere concentrazioni intracitoplasmatiche dannose o mortali per la cellula. La capacità di trasportare sostanze chimicamente non correlate fra di loro, e generalmente tossiche per la cellula conferisce ai trasportatori ABC il ruolo di fattori di polichemioresistenza (MDR=MultiDrug Resistance).

Sia negli eucarioti che nei procarioti l'unità strutturale dei trasportatori ABC mostra una comune architettura costituita da due regioni, una prevalentemente idrofoba, con sei domini transmembrana generalmente indicati nel loro complesso con la sigla TMD (Trans-Membrane Domain), ed una marcatamente idrofila indicata come NBF (Nucleotide-Binding Fold) e contenente la cassetta che lega e idrolizza l'ATP (Figura 4.16). I domini transmembrana servono per l'ancoraggio del trasportatore alla membrana, determinano la specificità di substrato dei trasportatori ABC e costituiscono la via attraverso cui i substrati stessi attraversano la membrana.

Tipicamente, l'unità funzionale è costituita da due unità strutturali organizzate secondo il modulo (TM6-NBF) oppure (NBF-TM6).

Nell'NBF vi è una regione conservata di circa 200 amminoacidi contenente due motivi chiamati Walker A e Walker B, dal nome del ricercatore che li ha identificati, oltre ad una sequenza detta "ABC signature" (sequenza identificativa dei trasportatori ABC), caratteristica di questa famiglia di proteine. Si pensa che l'ABC signature sia coinvolta nella comunicazione fra differenti domini, specialmente per l'unione dell'attività di idrolisi dell'ATP e di trasporto (Hyde et al., 1990). Altri autori (Bourne et al., 1991; Carson et al., 1995) invece, ritengono che essa sia coinvolta direttamente nel legame e nell'idrolisi dell'ATP.



**Figura 4.16** Schematica rappresentazione del meccanismo di azione di un trasportatore ABC Eucariotico.

L'attività adenosintrifosfatase dei trasportatori ABC è stimolata dalla presenza del substrato del trasportatore stesso e può essere quasi totalmente bloccata modificando uno dei due NBF e lasciando intatto il resto della sequenza del trasportatore, il che indicherebbe che esiste una cooperatività fra le due regioni (Loo et al., 1995; Urbatsch et al., 1995); l'NBF residuo mantiene, comunque un'attività di idrolisi dell'ATP, seppur bassa (Ko et al., 1995; Baubichon-Cortay et al., 1994; Sharma et al., 1995).

Lo studio del meccanismo di funzionamento dei trasportatori ABC è, almeno in parte, ostacolato dalla mancanza di approfondite conoscenze della loro struttura. Sono stati realizzati diversi tentativi di cristallizzazione dei singoli domini. La difficoltà nell'ottenere cristalli deriva dal fatto che, quando i trasportatori vengono espressi come singole proteine o come proteine di fusione hanno la tendenza a formare grossi aggregati, compromettendo così le possibilità di cristallizzazione o il successo dello studio con tecniche come la risonanza nucleare (NMR).

Nei vegetali le funzioni dei trasportatori ABC sono ancora largamente inesplorate ma si è ipotizzato un loro coinvolgimento sia nella secrezione dei "fattori di difesa" (es. fitoncidi e fitoalessine) che nella protezione dai fattori di attacco dei patogeni.



La sequenza n° **38** è stata ottenuta da un frammento differenzialmente espresso nella specie resistente *Solanum commersonii* 72 ore dopo l'inoculo con il batterio fitopatogeno *Ralstonia solanacearum*, amplificato con la combinazione di primer Bst CG/Mse A:

**Primer MSE 5'** GATGAGTCCTGAGTAAACAGTCGGATTCCCCTTGTCCGCTCCAGTTCTGAGCC  
 GGTTGTTCAACGCACTAAGGAAACAGCAATTTGCTCGAAAGCCAATCGCCTTTCTTTCTGGCACAACA  
 AGAGTAGCCCGACCATTCGGCCGCATCCGATCCCCGAAAGGTCCAGACGCGAGCCAAATGTAGGCCG  
 CCACAAGCTCTCCAAAAGACCCCTAGGCCCAACCCTCAGAGCCAATCCTTTTCCCGAAGTTA **CGGAT**  
**CACTACGCAGTC 3' Primer BST (complementare ed invertito)**

L'annotazione ha prodotto uno *score* di 326 ed un *e-value* di  $3,0 \cdot 10^{-86}$  con una sequenza proveniente da una libreria di cDNA prodotto dall'interazione tra *Phytophthora infestans* e patata presente nel database NCBI:

```

Query 1 CAGTCGGATTCCCCTTGTCCGCTCCAGTTCTGAGCCGGTTGTTCAACGCACTAAGGAAAC 60
      |||
Sbjct 505 CAGTCGGATTCCCCTTGTCCGCTCCAGTTCTGAGCCGGTTGTTCAACGCACTAAGGAAAC 446

Query 61 AGCAATTTGCTCGAAAGCCAATC-GCCTTTCTTTCTGGCACAACAAGAGTAGCCCGACCA 119
      |||
Sbjct 445 AGCAGCCAGCCGAAAGCCAA-CTACCTTTCTCTCCGGCACAACAAGAGCAGCCCGACC- 388

Query 120 TTC-GGCCGCATCCGATCCCCGAAAGGTCCAGACGCGAGCCAAATGTAGGCCGCCACAAGC 178
      |
Sbjct 387 GCCAGGCCGCATCCGGTCCCCGAAAGGTCCAGACGCGAGCCCAACGTAGGCCGCCACAAGT 328

Query 179 TCTCCAAAAGACCCCTAGGCCCAACCCTCAGAGCCAATCCTTTTCCCGAAGTTA 233
      |||
Sbjct 327 TCTCCAAAAGACCCCTAGGCCCAACCCTCAGAGCCAATCCTTTTCCCGAAGTTA 273
  
```

La sequenza n° **70** è stata ottenuta da un frammento differenzialmente espresso nella specie resistente *Solanum commersonii* 72 ore dopo l'inoculo con il batterio fitopatogeno *Ralstonia solanacearum*, amplificato con la combinazione di primer Bst CT/Mse T:

**Primer BST 5'** GACTGCGTAGTGATCCCTCAGGATCGACGATCCACTGCGAGCACTGAG  
 TGCCGCCTTTGTGTCCTCAATGACAGCTTCATCTAGAAGCGAGGATGAGTTCAACTCAATA  
 GGTGGTCTAAGGACTACCATATCCGACAGATCACCGATCTTCAATGCTTGATGAACTCAT  
 CCACAGACATTTCTGCTAGCTCTAACAGAGCATGTAACGATGGAATAGCCTCAAGTCTGAC  
 ATTCCTTCAACGTTACCCCTCACACC **AGTTACTCAGGACTCATC 3' Primer MSE**  
**(complementare ed invertito)**

L'annotazione ha prodotto uno *score* di 62,8 ed un *e-value* di  $7,0 \cdot 10^{-9}$  con una putativa poliproteina di *Phytophthora infestans* presente nel database NCBI:

```

Query 214 VRLEAIPSLHALLELDEMSVDFHQALKIGDLSDMVLRPPI---ELNSSLLDEAVIED 44
      V LE +P + +L L+EM+ + F LK G+++MV+RP ELNSSS+LDE V+ED
Sbjct 255 VHLEQLPEVAEILNLEEMTAESFLANLKAGEIAEMVLIRPETTQEELNSSSVLDENVLED 314

Query 43 TKAALSARSGSSIL 2
      AR GS IL
Sbjct 315 MNKQRQARLGSEIL 328
  
```

La sequenza n° **96** è stata ottenuta da un frammento differenzialmente espresso nella specie resistente *Solanum commersonii* 72 ore dopo l'inoculo con il batterio fitopatogeno *Ralstonia solanacearum*, amplificato con la combinazione di primer Bst TT/Mse A:

**Primer BST 5'** GACTGCGTAGTGATC **TT** ATGGCGCGCCTTCACTGAAAAGTCTAGGAGA TTGGTATGTCCAGCAACAACCCGCAAACCCGTGAATGGCAAGCCTTGAGCAATGATCACCA CCTGGCGCCGTTCAAGCAATTGAAAGAGAAAGGCCCAAGGATCATCACCAA AGCCACGGTGTACCTGTGGGACAGCGAAGGCAACAA **GTTACTCAGGACTCATC 3'**  
**Primer MSE (complementare ed invertito)**

L'annotazione ha prodotto uno *score* di 294 ed un *e-value* di  $7,0 \cdot e^{-77}$  con una libreria EST di *Panicum virgatum* presente nel database NCBI:

```
Query 37 MSSNNPQTREWQALSNDHHLAPFSDFKQLKEKGPRIITKAHGVYLDWSEGN 189
M+SNNPQTREWQALS+DHHLAPFSDFKQLKEKGPRIIT A GVYLDWSEGN
Sbjct 1 MTSNNPQTREWQALSSDHHLAPFSDFKQLKEKGPRIITNAKGVYLDWSEGN 51
```

La sequenza n° **9** è stata ottenuta da un frammento differenzialmente espresso nella specie resistente *Solanum commersonii* non inoculato con il batterio fitopatogeno *Ralstonia solanacearum*, amplificato con la combinazione di primer Bst TA/Mse T:

**Primer BST 5'** GACTGCGTAGTGATC **TA** AARRCTTCKAGCSTGCAAGGAACTACCATCA GAGTGACAGGCAACCTACAGAATGGYGAGAAATTTTYGCACCTACTCATCTGACAAAGGGC TAATAYCCAGAATCTACAATGAACTCAAACAAATTTACAAGAAAAAACAACAACCCCATC AAAAAGTGGGCRAAGGAYATGAACARACACTTCTCAAAGAAGACWTTTATGCAGCCAAAA RACACATGAAAAAATGCYCAATCATCACKGGCCATCAGAGAAATGCAAATCAAAMCCACARK GAGATACWTTCTCACACCAGTTARAAGGCAATCWTTACYRCRCRCTCAYMCTCA **GTTAC TCAGGACTCATC 3'** **Primer MSE (complementare ed invertito)**

L'annotazione ha prodotto uno *score* di 352 ed un *e-value* di  $2,0 \cdot e^{-32}$  con una ipotetica proteina di uomo presente nel database NCBI:

```
Query 65 FXTYSSDKGLIXRIYNELKQIYKKKTNNPIKKWAKDMNXHFSKEDXYAAKXHMKKCXXSX 244
F TYSSDKGLI RIYNELKQIYKKKTNNPIKKWAKDMN HFSKED YAAK HMKKC S
Sbjct 142 FTTYSSDKGLISRIYNELKQIYKKKTNNPIKKWAKDMNRHFSKEDIYAAKXHMKKCSSSL 201

Query 245 AIREMQIKXTXRYXLTPVXXAI 310
AIREMQIK T RY LTPV AI
Sbjct 202 AIREMQIKTTMRYHLTPVRMAI 223
```

Le 25 sequenze che non hanno prodotto omologia significativa con nessuna sequenza precedentemente descritta in banca dati, sono state raccolte in una collezione di EST putativamente coinvolta nella risposta di resistenza a *Ralstonia solanacearum* e saranno oggetto di successivi studi molecolari al fine di ampliare la dimensione della sequenza e caratterizzare i geni che hanno prodotto tali trascritti.



## 4.2 SOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DEGLI LPS DI *RALSTONIA SOLANACEARUM*

I lipopolisaccaridi (LPS) sono molecole anfipatiche che formano lo strato più periferico della superficie cellulare dei batteri Gram-negativi. Essi sono essenziali per proteggere la cellula dalle condizioni ambientali ostili e, nel caso di organismi patogeni, sono coinvolti nell'interazione con le cellule ospiti eucariotiche.

Secondo Newman et al. (1995), gli LPS contribuiscono, in diversi modi, allo sviluppo ed alla sopravvivenza dei batteri all'interno delle piante ospiti:

- a. favoriscono la colonizzazione, generando un microambiente favorevole;
- b. agiscono da barriera nei confronti delle sostanze difensive della pianta;
- c. modulano le reazioni dell'ospite.

Gli LPS sono essenzialmente formati da tre domini (Figura 4.17):

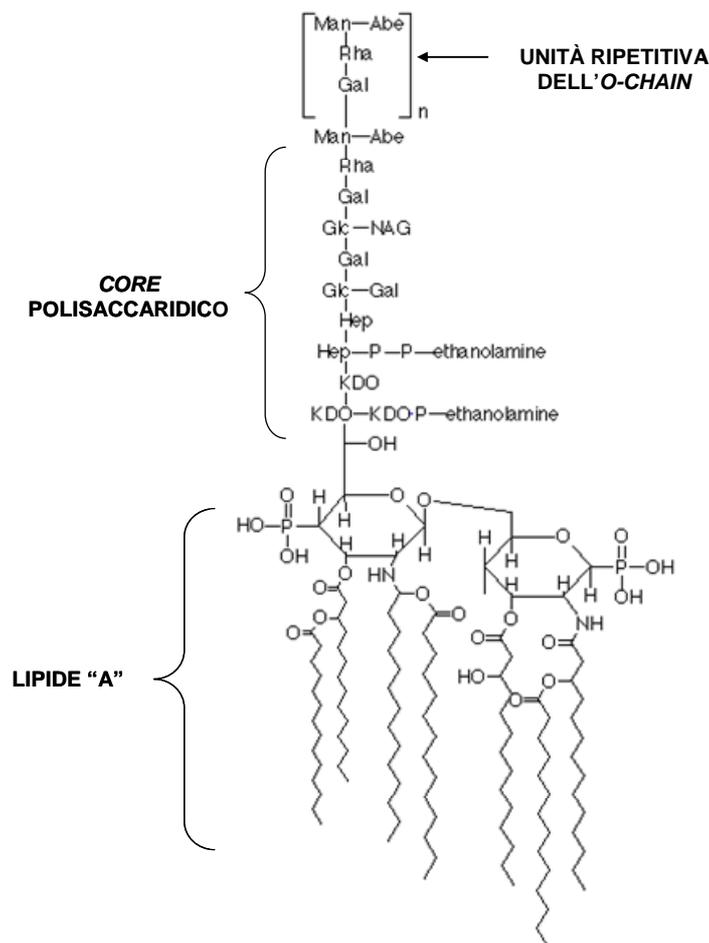
1. il primo più esterno ed esposto all'ambiente acquoso extracellulare, denominato "*O-chain*", è frequentemente costituito da una lunga catena polisaccaridica, formata da unità tetra- e pentasaccaridiche ripetute;
2. il secondo, denominato "*core*", è una complessa unità eterooligosaccaridica, talvolta fosforilata, caratterizzata dalla presenza dell'inusuale zucchero KDO (3-deossi-D-manno-2-ottulosano), risulta suddiviso in due zone distinte un *core* interno ed un *core* esterno;
3. il terzo, denominato "Lipide A", formato da acidi grassi a lunga catena legati, come esteri o ammidi, a un disaccaride costituito nei casi più semplici da glucosamina.

L'*O-chain* è una componente immunodominante della superficie cellulare e parecchie classificazioni serotipiche dei batteri riflettono la variazione nella struttura di questo antigene. Il fatto che possono essere isolati mutanti mancanti dell'*O-chain*, evidenzia che tale molecola non è essenziale per la vitalità dei batteri. Nel caso di patogeni vegetali, l'*O-chain* può non essere essenziale per la patogenicità, alcuni ceppi di *Xanthomonas campestris*, ad esempio, pur essendo stati isolati da infezioni naturali non presentano tale struttura. Diversamente, i mutanti mancanti della parte esterna del *core*, sono meno resistenti a stress fisici e chimici ed hanno perso patogenicità (Newman et al., 2001).

Sebbene siano stati condotti studi approfonditi sulla struttura degli LPS di batteri enterici quali *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* e pochi altri, la parziale caratterizzazione chimica degli LPS dei batteri fitopatogeni mostra aspetti generali simili con quelli enterici (Newman et al., 2001).

I lipopolisaccaridi giocano un ruolo importante per la virulenza dei batteri. I mutanti di ceppi batterici fitopatogeni che non riescono a sintetizzare gli LPS, di solito

producono sintomi meno evidenti e il numero di microrganismi riscontrabili all'interno delle piante ospiti decresce rapidamente. Tali mutanti, inoltre, risultano più sensibili in coltura ad alcuni antibiotici, ai detergenti ed ai peptidi antimicrobici; probabilmente la mancanza degli LPS non consente l'eliminazione di tali sostanze dalle cellule. Un meccanismo analogo spiegherebbe la morte di questi mutanti all'interno dei tessuti vegetali, per effetto di composti tossici prodotti dalle piante, come l'idrossicinnamolo coniugato a tirammine (Newman et al., 2001).



**Figura 4.17** Rappresentazione schematica della struttura dei lipopolissacaridi.

Oltre alla funzione protettiva per i batteri, gli LPS possono interagire direttamente con le piante ospiti o attraverso il contatto diretto del batterio con l'ospite o tramite il rilascio degli LPS da parte dei batteri; non è ancora stato chiarito se l'azione degli LPS si concretizzi in seguito al contatto diretto, ma è stato recentemente dimostrato che un'insieme di funzioni richieste per la virulenza di *Ralstonia solanacearum* è attivato dal contatto con la pianta ospite (Aldon et al., 2000).

Presumibilmente le interazioni che portano alla modulazione dell'espressione genetica della pianta, richiederebbero il riconoscimento degli LPS da parte dei componenti presenti nella o sulla membrana citoplasmatica della pianta. Probabilmente però, la parete cellulare previene il contatto diretto della membrana con gli LPS del batterio, inoltre l'estremità libera della molecola di LPS, l'*O-chain*, non è la parte che determina l'attivazione delle risposte della pianta, tale azione è svolta dal Lipide A, il quale si trova immerso nella membrana batterica esterna. Affinché la cellula vegetale possa riconoscere direttamente gli LPS è necessario il distacco degli stessi dalla membrana (Newman et al., 2001).

Una frazione considerevole di LPS può essere rilasciata dai batteri sotto forma di micelle o aggregati durante la crescita, che possono rappresentare la forma mediante la quale gli LPS interagiscono con le cellule eucariotiche. Questi aggregati possono anche sequestrare materiale periplasmatico e trasferirlo ad altre cellule tramite fusione con porzioni di membrana, tale meccanismo può rappresentare una via alternativa per la secrezione di proteine periplasmatiche (Beveridge et al., 1999).

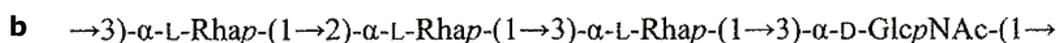
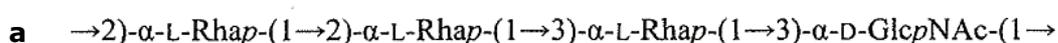
Sono stati preparati circa 6 litri di coltura batterica della razza 3 di *Ralstonia solanacearum*. La coltura batterica è stata centrifugata alla temperatura di 4°C per 30 minuti a 8.000 x g, dal precipitato contenete le cellule, circa 11,2 gr, sono stati ottenuti 250 mg di LPS grezzi. Successivamente si è proceduti alla purificazione e quindi alla caratterizzazione chimica degli LPS estratti condotta in collaborazione con il Professor Otto Holst del Division of Structural Biochemistry, Research Center Borstel, Leibniz center for Medicine e Bioscience, Borstel, Germany.

Gli LPS grezzi sono stati sottoposti ad una idrolisi acida blanda che, per scindere il legame tra il primo residuo di KDO del *core* oligosaccaridico e la glucosammina II del Lipide A, ha permesso di dividere la molecola in due parti: una formata dal Lipide A stesso e l'altra dal *core* e l'*O-chain*. Il Lipide A è stato poi raccolto per centrifugazione ed il precipitato è stato sottoposto a un'estrazione con cloroformio/metanolo/acqua. Il surnatante, contenete la frazione polisaccaridica, è stato frazionato mediante cromatografia a gel-filtrazione (GPC) su colonna Sephadex G-50. Le frazioni contenenti la *O-chain* sono state riunite e liofilizzate.

La determinazione della struttura della *O-chain* è stata effettuata utilizzando metodi chimici e spettroscopici (essenzialmente la spettroscopia NMR 1D e 2D dell'<sup>1</sup>H e del <sup>13</sup>C e la spettrometria di massa MALDI-TOF). L'analisi degli zuccheri, effettuata mediante cromatografia gas liquida (GLC) dei corrispondenti degli alditoli acetati, ha mostrato la presenza del 6-deossimannosio (ramnosio Rha) e dello xilosio in un rapporto molare di circa 1:0,1 e del 2-ammino-2-deossi-glucosio (GlcN). L'analisi

dei legami, effettuata mediante GLC-MS degli alditolo acetati parzialmente metilati, ottenuti dalla metilazione dell'*O-chain*, rileva la presenza un 6-deossiesoso terminale, di un 6-deossiesoso sostituito in posizione 2, di un 6-deossiesoso disostituito in posizione 3 ed un N-esoso sostituito in posizione 3.

Lo spettro  $^{13}\text{C}$  NMR dell'*O-chain* contiene due serie di segnali con un rapporto d'intensità pari a circa 3:1. La serie maggiore ha consentito di identificare il tetrasaccaride avente la struttura 1, mentre la minore ha permesso di identificare il tetrasaccaride avente la struttura 2 (Figura 4.18), la quale differisce dalla prima solamente per la sostituzione in posizione 3 anziché 2 di un residuo di ramnosio.



**Figura 4.18.** Struttura dell'unità ripetitiva lineare dell'*O-chain* di *Ralstonia solanaceae rum*. **a**: Struttura 1, con un residuo di  $\alpha\text{-L-Ramnopiranosio}$  sostituito in posizione 2. **b**: Struttura 2, con un residuo di  $\alpha\text{-L-Ramnopiranosio}$  sostituito in posizione 3.

Entrambe queste strutture concordano con quanto riportato in letteratura da precedenti studi sulla composizione chimica degli LPS presenti sulla membrana esterna dei batteri Gram-negativi (Akiyama et al., 1984 e 1985; Varbanets et al., 1990), che hanno descritto, per diversi ceppi di *Ralstonia solanacearum*, una comune struttura dell'*O-chain*, costituita da una catena di unità ripetitive tetrapolisaccaridiche lineari formate da tre residui di L-ramnopiranosio ed uno di 2-acetammido-2-deossi-D-glucopiranosio.

L'analisi NMR ha messo in luce anche la presenza di tracce di unità ripetitive ramificate, derivanti dalla xilosilazione non stechiometrica della struttura lineare.

Successivi studi condotti da Kocharova et al. (1993) su altri ceppi di *Ralstonia solanacearum*, hanno confermano questi risultati poiché hanno descritto, oltre allo scheletro precedentemente riportato da Akiyama e Varbanetes, anche ripetitive unità ramificate contenenti residui di L-xilosio. Tale zucchero, descritto per la prima volta da Neal et al. nel 1979 sul ceppo NCTC 10257 di *Pseudomonas maltophilia*, è un costituente che raramente si ritrova nei polisaccaridi batterici, per cui risulta un elemento tipico di *Ralstonia solanacearum*.

Gli studi di Kocharova et al. del 1993, confermano ulteriormente i dati ottenuti, in quanto ognuno dei ceppi di *Ralstonia solanacearum* studiati, era caratterizzato da un *O-chain* composta da più di una tipologia di unità ripetitive. Tre di queste unità

erano formate da un tetrasaccaride lineare contenete una molecola di D-GlcNAc e tre molecole di L-Rha, la cui struttura differiva per la configurazione ( $\alpha$  o  $\beta$ ) del legame glicosidico del residuo GlcNAc e per la posizione del legame (2 o 3) con il residuo di L-Rha. Altre tre unità ripetitive erano formate da pentasaccaridi ramificati che avevano come catena principale un tetrasaccaride di quelli descritti prima, a cui si aggiungeva una catena laterale formata da un monosaccaride, o L-Xyl, o L-Rha. Non è ancora chiaro, comunque, se le unità lineari e quelle ramificate sono parte dello stessa catena polisaccaridica o se ognuno di queste forma una catena polisaccaridica separata (Kocharova et al., 1993).

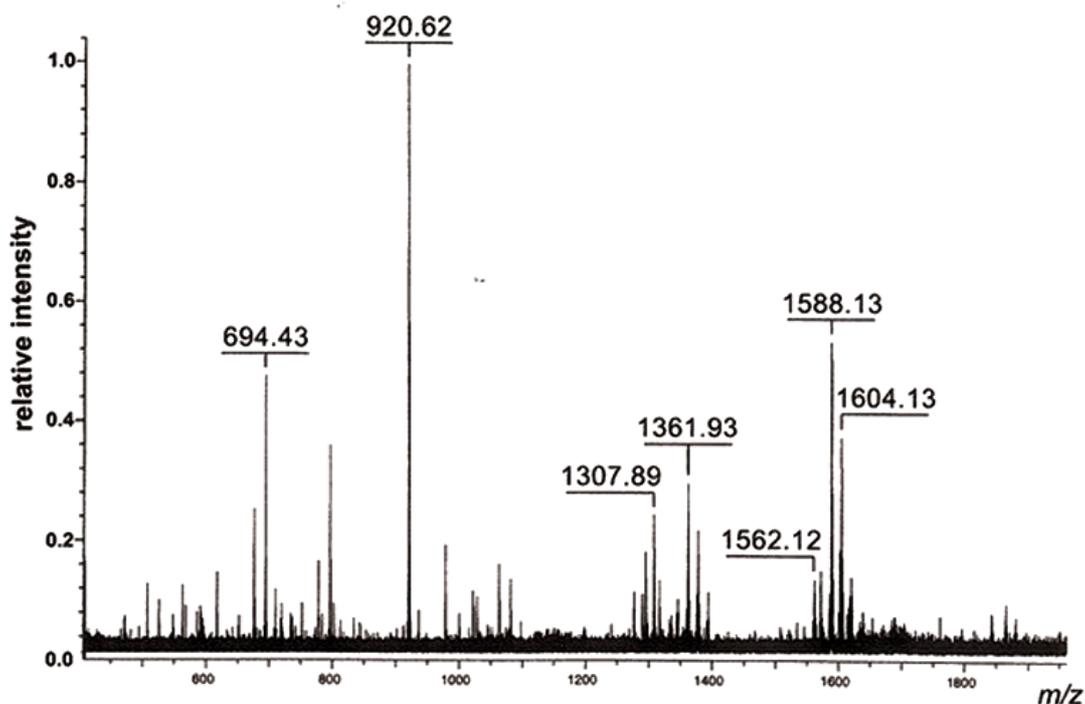
Le ricerche sugli acidi grassi costituenti gli LPS, hanno portato all'identificazione dell'acido tetradecanoico ( $C_{14:0}$  miristico), dell'acido 3-idrossitetradecanoico (3-OH- $C_{14:0}$ ) e dell'acido 2-idrossiottodecenoico (2-OH- $C_{18:1}$ ), oltre che di insignificanti quantità dell'acido 2-idrossiesadecanoico e dell'acido 2,X-diidrossiottodecenoico (X=10,11,12 o 13). È stato ritrovato anche l'acido  $\Delta^2$ -tetradecenoico il quale probabilmente si forma dall'acido 3-idrossitetradecanoico per  $\beta$ -eliminazione. La determinazione della configurazione assoluta, effettuata mediante GC dei derivati diastereomerici (S)- e (R)-feniletilammide degli acidi grassi metilati, ha mostrato che l'acido 3-idrossitetradecanoico presenta configurazione di tipo R, mentre quella dell'acido 2-idrossiottodecenoico era di tipo S.

Per la localizzazione del doppio legame dell'acido 2-idrossiottodecenoico, gli acidi grassi permetilati, sono stati ossidati con permanganato e in seguito analizzati, come metil-trimetilsilil (Me-TMS) derivati, mediante GC-MS. Il cromatogramma evidenzia la presenza degli acidi 2-OMe-11-cheto-12-OTMS-, 2-OMe-11-OTMS-12-cheto- e 2-OMe-11,12-di-OTMS-ottodecenoici, che derivano dall'acido 2-idrossi- $\Delta^{11}$ -ottodecenoico.

L'analisi quantitativa del Lipide A ha messo in luce la presenza di glucosammina e fosfato con un rapporto molare di circa 2,0:1,6. Questo rapporto molare può essere attribuito alla parziale idrolisi del legame glicosidico presente nel lipide A che produce sia molecole di lipide A mancante di una glucosammina, che quelle mancanti del rispettivo residuo di monoglucosammina monofosforilato.

Il pattern di distribuzione degli acidi grassi nella molecola di Lipide A è stato determinata tramite spettrometria di massa con ionizzazione elettrospray (ESI MS). Come evidenziato dallo spettro, registrato in modalità negativa (Figura 4.19), il Lipide A è formato da una miscela di almeno 3 molecole pentacicliche. La predominante, osservata a  $m/z$  1588,13  $[M-H]^-$ , corrisponde al disaccaride di GlcN monofosforilato, portante 3 molecole di 3-OH- $C_{14:0}$ , 1 molecola di  $C_{14:0}$  e 1 molecola di 2-OH- $C_{18:1}$ . Gli altri due ioni molecolari osservati a  $m/z$  1361,93 e 1307,89  $[M-$

H]<sup>-</sup>, corrispondono a strutture tetracicliche parziali, che si differenziano dalla struttura pentacilica principale del Lipide A, in quanto mancanti o del 3-OH-C<sub>14:0</sub> o del 2-OH-C<sub>18:1</sub>.

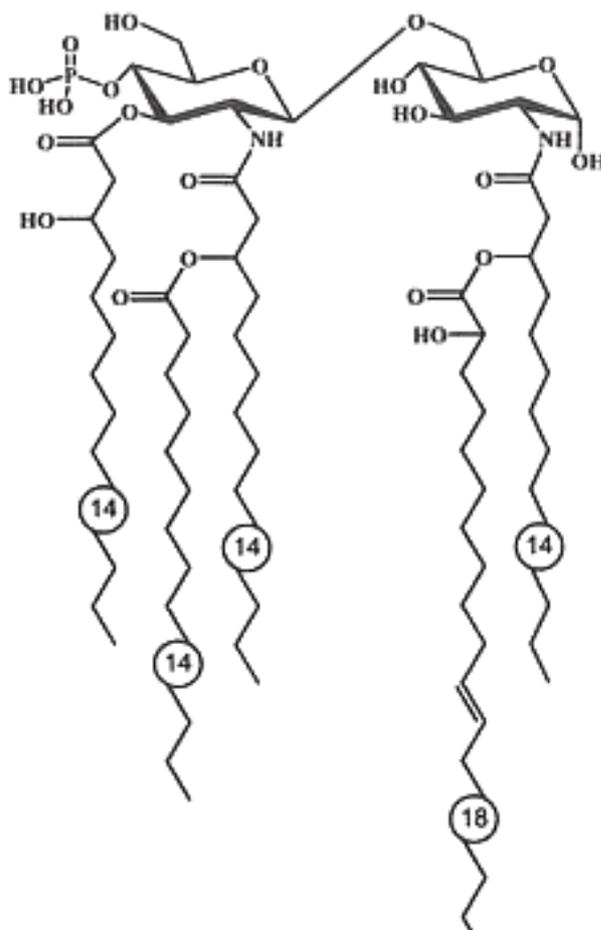


**Figura 4.19.** Spettro di massa ESI MS del Lipide A di *Ralstonia solanacearum*.

Lo spettro di massa mostra, inoltre, che durante la preparazione del Lipide A è avvenuta la scissione del legame  $\beta$ -(1'→6)-glicosidico. Questo evento è giustificato dalla presenza dello ione predominante a  $m/z$  920,62 [M-H]<sup>-</sup>, corrispondente al monosaccaride monofosforilato non riducibile GlcN portante 2 molecole di 3-OH-C<sub>14:0</sub> e 1 molecola di C<sub>14:0</sub>. Lo ione presente a  $m/z$  694,43 [M-H]<sup>-</sup>, si è formato a partire dallo ione molecolare a  $m/z$  920,62 [M-H]<sup>-</sup>, in seguito alla perdita di una molecola 3-OH-C<sub>14:0</sub>.

I dati mostrano che la struttura del Lipide A di *Ralstonia solanacearum* (Figura 4.20) è formata da un disaccaride di D-glucosammina unito con legame  $\beta$ -(1'→6) e fosforilato in 4'. Su tale scheletro disaccaridico sono legati tre residui di acido (R)-3-idrossitetradecanoico, un residuo di acido tetradecanoico ed un residuo di acido (S)-2-idrossiottadecenoico. Sul di D-glucosammina fosforilata sono legati due residui di acido (R)-3-idrossitetradecanoico ad uno dei quali è legato con legame estereo un residuo di acido tetradecanoico. Sull'altro residuo di D-glucosammina è legato un residuo di acido (R)-3-idrossitetradecanoico al quale è legato con legame estereo un residuo di acido (S)-2-idrossiottadecenoico.

Tale struttura del lipide A è stata ritrovata per la prima volta in *Ralstonia solanacearum*. Per la caratterizzazione completa dell'LPS di tale patogeno, rimane da determinare la struttura del *core*.



**Figura 4.20.** Struttura del Lipide A di *Ralstonia solanacearum*.

### 4.3 ATTIVITÀ *IN VIVO* DEGLI LPS

Diversi studi hanno evidenziato che l'inoculazione di piante di tabacco con cellule di *Ralstonia solanacearum* uccise con calore, influenza la risposta alla successiva inoculazione con batteri vitali, determinando l'inibizione della reazione di ipersensibilità (HR). Gli studi successivamente svolti hanno mostrato che tale azione era riconducibile agli LPS, i quali non vengono inattivati dal trattamento con il calore. Inoltre testando differenti batteri, patogeni e non, su differenti piante, anche se le Solanacee sono le più comunemente usate, si otteneva sempre la soppressione dell'HR nei confronti dei batteri non-patogeni e la riduzione dei sintomi nelle interazioni compatibili, evidenziando che la fonte batterica da cui

estrarre gli LPS non è determinante per il manifestarsi di tale fenomeno (Graham et al., 1977; Mazzucchi et al., 1976; Mazzucchi et al., 1979; Minardi, 1995).

La soppressione della reazione di ipersensibilità non dipende dalla luce ed è strettamente localizzata all'area della foglia nella quale è stata infiltrata la soluzione contenente LPS; le zone adiacenti si comportano normalmente se inoculate con batteri vitali. Il semplice trattamento con LPS non causa necrosi od altri sintomi visibili sulla pianta. L'inibizione dell'HR richiede diverse ore, generalmente da 10 a 30, per manifestarsi ed ha una durata temporanea. La concentrazione di LPS necessaria per il verificarsi del fenomeno è di circa 50 µg/ml, anche se è difficile interpretare l'incidenza di tale parametro dovuta allo stato fisico della preparazione di LPS. La forma predominante nella preparazione acquosa, infatti, è quella micellare, anche se non si può escludere la presenza di piccole quantità in forme più attive. Il fenomeno, date le proprietà sopra descritte, è stato citato come: Risposta Localizzata Indotta (LIR) (Newman et al., 2000).

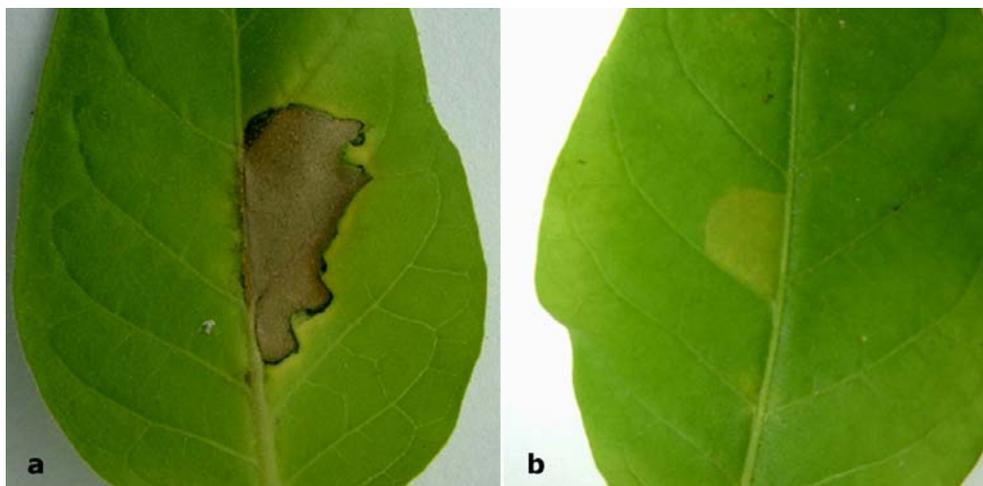
Si ritiene che la LIR sia dovuta alla creazione di un ambiente antimicrobico all'interno della pianta (Rathmell et al., 1975), sebbene sia stata suggerita anche la possibilità di un aumento della tolleranza del tessuto vegetale ai batteri (Mazzucchi et al., 1979).

Nelle interazioni incompatibili tra pianta e batteri, il manifestarsi dell'HR è associato ad un declino del numero di batteri riscontrabili nel tessuto vegetale, la cui grandezza e cinetica di evoluzione dipendono dalle condizioni sperimentali. In foglie pretrattate con LPS si nota un aumento della sopravvivenza dei batteri, sebbene non si registri un aumento del loro numero (Minardi, 1995; Newman et al., 2000; Sequeira et al., 1974).

Attraverso studi condotti su prodotti ottenuti mediante di degradazione chimica degli LPS e forme troncate degli stessi prodotte da batteri mutati, si è dimostrato che l'*O-chain* non è necessario per il manifestarsi della LIR, mentre il Lipide A ed il *core* riproducono l'attività degli LPS nativi. Questo viene spiegato con il fatto che il Lipide A ha bisogno, per essere attivo, del *core* che lo solubilizzi in ambiente acquoso. Infine, recenti studi condotti con il solo *core* di *Xanthomonas campestris*, hanno evidenziato che sebbene il Lipide A possiede attività, questa non è essenziale per la LIR (Graham et al., 1977; Newman et al., 1997).

L'azione degli LPS estratti dal filtrato colturale della razza 3 di *Ralstonia solanacearum* e successivamente purificati è stata valutata effettuando un test *in vivo* su piante non ospiti di tabacco, secondo le procedura riportata al punto 3.6.2. Analogamente a quanto riportato in letteratura, le piante di tabacco trattate con la soluzione contenete gli LPS di *Ralstonia solanacearum* e successivamente inoculate

con una sospensione del batterio vitale, non manifestano reazione di ipersensibilità (HR), come invece accade nei testimoni 24/48 ore dopo l'inoculo con la sospensione batterica (Figura 4.21)



**Figura 4.21.** Effetto LIR (Localized Induced Response) prodotto su tabacco (*Nicotiana tabacum*) dagli LPS di *Ralstonia solanacearum*. **a:** pianta testimone non pretrattata con gli LPS; **b:** pianta pretrattata con gli LPS.

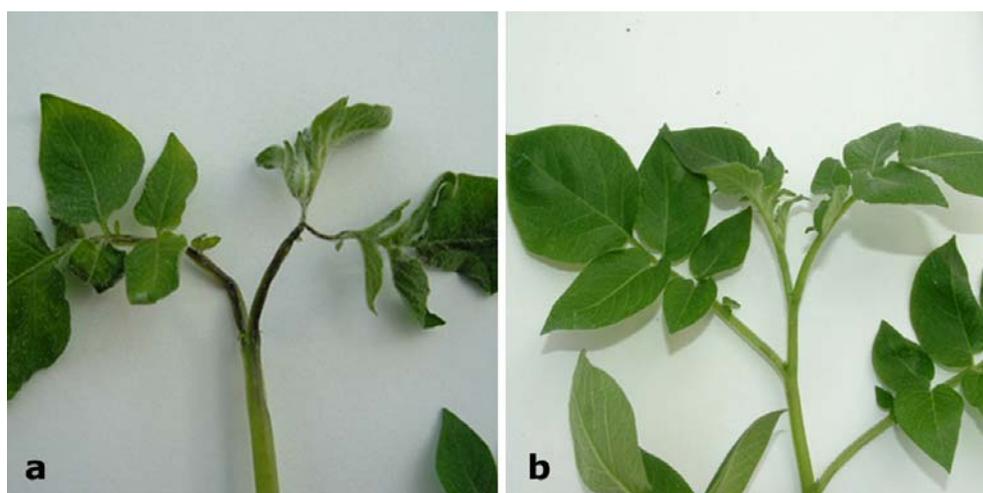
Van Peer et al., nel 1992, lavorando sulle interazioni compatibili, parlano di resistenza sistemica indotta nei confronti della fusariosi del garofano, in seguito al trattamento di piante di garofano con cellule di *Pseudomonas fluorescens* WCS417 uccise con calore o con i lipopolisaccaridi di membrana (LPS) da esse estratti, prima dell'inoculo con il patogeno. Tale azione è del tutto simile a quella indotta da pretrattamento con i batteri di *Pseudomonas fluorescens* WCS417 vitali.

Anche gli studi di Leeman et al. su ravanello (1995), mostrano come estratti della parete delle cellule di *Pseudomonas fluorescens* WCS374 o WCS417, o gli LPS da essi purificati, erano efficaci nell'indurre resistenza nei confronti della fusariosi, analogamente ai batteri vivi, una volta applicati alle radici del ravanello. Le forme mutanti di *Pseudomonas* che non erano in grado di produrre l'*O-chain*, inoltre, come pure il loro estratto di pareti cellulari, non erano in grado di determinare tale effetto. Questi risultati escludono che il metabolismo batterico possa produrre effetti protettivi e mostrano che l'*O-chain* degli LPS determina l'induzione della resistenza sistemica a questi rizobatteri.

Analogamente in pomodoro, il livello di resistenza indotto da WCS417 nei confronti della fusariosi da *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* appare collegato alla presenza dell'*O-chain* degli LPS (Duijff et al., 1996 e 1997).

Nonostante esista un'ampia letteratura riguardo l'azione esercitata dagli LPS di *Ralstonia solanacearum* e di altre specie batteriche nei confronti di numerose specie

vegetali, poco è riportato sull'azione degli LPS estratti da *Ralstonia solanacearum* su patata (*Solanum tuberosum*). Nel presente studio si è valutata l'azione del trattamento di piante di patata con gli LPS di *Ralstonia solanacearum*, nei confronti del successivo inoculo con il batterio vitale. Analizzando i risultati ottenuti (Figura 4.22), si nota che le piante di patata trattate con gli LPS non manifestano, nelle successive 24/48 ore dall'inoculo, i classici sintomi dell'avvizzimento batterico, che, invece, risultano evidenti nei testimoni non trattati.



**Figura 4.22.** Effetto del pre-trattamento su patata (*Solanum tuberosum*) con LPS estratti da *Ralstonia solanacearum* nei confronti del successivo inoculo con batteri vitali della razza 3 d *Ralstonia solanacearum*. **a:** pianta non pretrattate con gli LPS; **b:** pianta pretrattate con gli LPS.

Lo studio delle reazioni di difesa delle piante ai patogeni, in termini di espressione genica e sintesi di macromolecole quali le fitoalessine, ha portato all'identificate di numerose sostanze, che spesso non hanno una azione diretta, identificate con il termine generico di sostanze correlate alla difesa (Newman et al., 2001).

Diversi studi hanno cercato di giustificare l'effetto LIR, concludendo che il trattamento con LPS induce nelle piante la produzione di sostanze correlate alla difesa e modifiche strutturali quali:

- a. peptide di funzione sconosciuta ed attività perossidasi, indotto dagli LPS di *Ralstonia solanacearum* (Leach et al., 1983; Nadolny et al., 1980);
- b. b-1,3 glucanasi in *Brassica spp.*, indotta dagli LPS di *Xanthomonas campestris* (Newman et al., 1995);
- c. induzione di attività antimicrobica (Rathmell et al., 1975);
- d. induzione della sintesi di gliceollina (Barton-Wills et al., 1984);
- e. cambiamenti nell'ultrastruttura della parete cellulare (Graham et al., 1977).

Sebbene l'infiltrazione degli LPS nelle foglie non produce sintomi macroscopici, possono essere osservati, in aggiunta all'effetto diretto sull'espressione di singoli geni, cambiamenti di interi schemi di espressione genica indotti dalla successiva interazione con i batteri.

Le foglie trattate con LPS mostrano accumuli di sostanze fenoliche quali:

- a. acido salicilico, segnale molecolare per la produzione di risposte correlate alla difesa in pianta (Pieterse et al., 1996);
- b. idrossicinnamolo tirammine, insieme a flavonoidi non ben identificati, coinvolti nei meccanismi che inibiscono la crescita microbica (Newman et al., 2000).

#### **4.4 ATTIVITÀ *IN VIVO* DEL FILTRATO CULTURALE E DEGLI EPS**

Gli EPS prodotti dai batteri fitopatogeni rivestono importanti funzioni biologiche come la protezione dal disseccamento o dalle molecole tossiche, l'adesione a superfici biologiche e la facilitazione dell'azione infettiva e della colonizzazione dei tessuti dell'ospite. Nell'interazione pianta-patogeno, la virulenza è parzialmente basata sulla capacità del patogeno di prevenire il riconoscimento, da parte dei ricettori della pianta, dei ligandi presenti sulla superficie cellulare batterica o dei prodotti extracellulari. Gli EPS prodotti dai batteri patogeni possono essere coinvolti nella virulenza, in quanto aumentano la capacità microbica di colonizzare i tessuti dell'ospite, ritardando o impedendo l'attivazione dei processi difensivi della pianta (Jahr et al. 1999).

Gli EPS di *Erwinia amilovora* e *Erwinia stewartii*, contribuiscono al movimento sistemico all'interno dei tessuti vegetali, prevenendo l'immobilizzazione dei batteri da parte delle agglutinine della pianta (Leigh et al., 1992). Dall'altro lato Hartung et al. (1988), studiando l'espressione genica della depolimerasi fagica di polisaccaridi, in *Erwinia amilovora*, dimostrarono che lo sviluppo di necrosi sui frutti di pero è indipendente dalla produzione di EPS.

Gli EPS contribuiscono anche al mantenimento del grado ottimale di idratazione ambientale per la crescita batterica, grazie alla loro forte capacità di assorbire umidità dall'ambiente ed alla protezione dalle molecole citotossiche prodotte dalle cellule vegetali infette (Denny 1995). È stato anche riportato che i geni coinvolti nella biosintesi degli EPS del patogeno vegetale *Pseudomonas syringae* e del patogeno umano *Pseudomonas aeruginosa* sono attivati da condizioni ambientali stressanti e dalla presenza di specie di ossigeno reattive (ROS) (Keith et al., 1999). Il coinvolgimento degli EPS nella patogenicità e nella sopravvivenza epifitica di *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* è stato accertato da Yu et al. nel 1999.

L'utilizzo di mutanti fornisce poche informazioni sul ruolo degli EPS nella patogenicità, soprattutto perché molti mutanti EPS deficienti sono pleiotropici, e questo rende incerta la relazione tra riduzione della produzione di EPS e virulenza. In ogni modo il dibattito sul ruolo degli EPS è ancora aperto, il loro coinvolgimento nel garantire le opportune condizioni ambientali per la crescita batterica è considerata una proprietà comune degli EPS prodotti dai batteri fitopatogeni (Denny 1995).

Diversi studi hanno permesso di individuare la composizione chimica e la struttura degli EPS. Molte pseudomonadi legate alle piante producono alginato, un copolimero composto da acido D-mannuronico e L-guluronico, e levano, un polimero di fruttosio (Leigh et al., 1992). Nel 2001 Corsaro et al. hanno determinato la struttura degli EPS di *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei*. Il polisaccaride è formato da uno scheletro di unità di mannopiranosio unite da legame  $\alpha$ -(1→6), con l'80% di catene laterali sostituite al C-2 da mono-, di- e tri-saccaridi, nelle quali sono state trovate unità di glucosio terminali e i gruppi fosfato.

Alcuni EPS hanno una struttura molto complessa, essendo etero polimeri ramificati. Queste differenze nella composizione chimica e nella struttura degli EPS purificati di differenti patogeni vegetali suggerisce che queste molecole possono avere ruoli specifici e differenti nell'interazione pianta-patogeno. La complessità che caratterizza alcuni EPS può rappresentare una fonte di informazione per le cellule vegetali infette (Jahr et al. 1999, Corsaro et al. 2001b), come effettivamente accade per gli EPS prodotti da batteri simbiotici (Leigh et al. 1992).

Studi genetici e molecolari hanno evidenziato che *Ralstonia solanacearum* utilizza diversi fattori di virulenza, tra cui i polisaccaridi extracellulari EPS (Denny et al., 1991; Kao et al., 1992), ed enzimi degradativi della parete delle cellule delle piante, endoglucanasi (Roberts et al., 1988) e la poligalatturonasi (Allen et al., 1991; Schell et al., 1988) per parassitizzare l'ospite. La poligalatturonasi è un enzima che degrada i polimeri peptici che rappresentano i principali componenti della lamella mediana della parete cellulare primaria. Le poligalatturonasi si dividono in due tipologie, endo- ed eso-poligalatturonasi, entrambe idrolizzano i polimeri peptici, ma liberano differenti prodotti. Le endo-poligalatturonasi scindono il polimero peptico a caso, liberando frammenti di grossa dimensione e determinando un rapido calo della viscosità del substrato, mentre le eso-poligalatturonasi liberano sia monomeri di galatturonato (esopoligalatturonasi) che dimeri di galatturonato (eso-poli- $\alpha$ -D-galatturonosidasi) (Cooper, 1983).

Gli Esopolisaccaridi hanno un ruolo importante per la patogenicità di *Ralstonia solanacearum*. Il ceppo selvatico del patogeno, GMI1000, allevato in un substrato

ricco, produce tre tipologie di EPS (Orgambide et al., 1991; Trigalet-Demery et al., 1993): EPS1, un polimero acidico ad alto peso molecolare, che rappresenta il 90% del peso secco del totale degli EPS e due polimeri minori, EPS3 formato da una N-acetil-glucosamminoramnana ed il glucano EPS4. Orgambide et al. nel 1991, hanno descritto la struttura delle unità trisaccaridiche di base di EPS1, che risultano formate da N-acetil-galattosammina, acido N-acetil-galattosamminuronico e un derivato di bacillosammina in rapporto equimolare. Le stesse unità ripetute sono state ritrovate da Trigalet-Demery et al., nel 1993, nei polimeri di EPS1 prodotti da differenti ceppi patogeni di *Ralstonia solanacearum*. La produzione di EPS è controllata dai cluster di geni *eps* e *ops* (Denny et al., 1991; Cook et al., 1991; Kao et al., 1992).

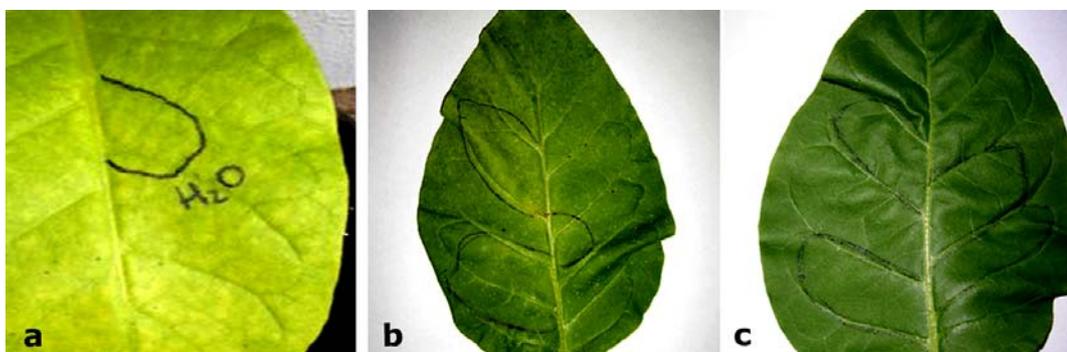
Attualmente si sa poco dell'azione in pianta degli EPS di *Ralstonia solanacearum*. Queste molecole aumentano la viscosità della linfa e possono così bloccare il flusso all'interno dei fasci xilematici (Husain et al., 1958). Studi microscopici confermano l'accumulo di grosse quantità di EPS batterici all'interno di fasci vascolari infetti (Wallis et al., 1978). Vasse et al., nel 1995, hanno dimostrato che mutanti di *Ralstonia solanacearum*, che non producono EPS, sono incapaci di invadere fasci xilematici, ed Araud-Razou et al., nel 1998, hanno dimostrato che EPS1 è coinvolto nella infezione delle radici e nella colonizzazione dei fasci vascolari di pomodoro, anche se non hanno precisato il meccanismo attraverso cui ciò avviene. Sequeira et al., nel 1977, affermarono che gli EPS possono saturare i siti di legame delle lectine presenti sulla parete cellulare evitando così l'immobilizzazione del batterio sulla parete cellulare del mesofillo di tabacco.

Al fine di caratterizzare chimicamente gli eventuali metaboliti fitotossici prodotti da una coltura *in vitro* di *Ralstonia solanacearum*, allevato secondo la procedura riportata al paragrafo 3.5.1, è stata valutata l'attività fitotossica del filtrato colturale, mediante saggio di fitotossicità condotto secondo la procedura descritta al punto 3.6.1. I saggi sono stati condotti valutando l'effetto, oltre che del filtrato colturale, anche degli EPS isolati da esso mediante la procedura descritta al punto 3.5.3, in modo da evidenziare l'effetto degli eventuali metaboliti fitotossici.

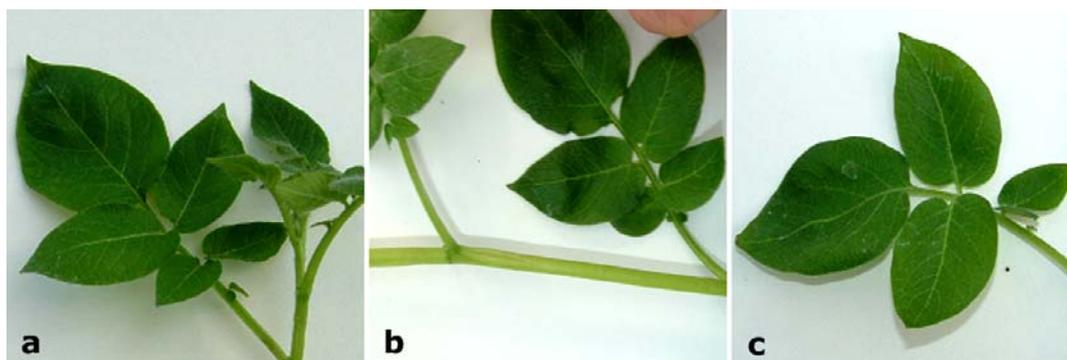
Sia il saggio condotto su tabacco (Figura 4.23), che quello condotto su patata (Figura 4.24), non hanno evidenziato alcun effetto fitotossico degli EPS e del filtrato colturale.

Il risultato dei saggi di fitotossicità erano preliminari alle successive fasi di caratterizzazione chimica dei metaboliti ad azione fitotossica. Ovviamente in mancanza di tale attività non è stato possibile proseguire nell'indagine. I risultati ottenuti non escludono, però, la possibilità che il batterio fitopatogeno produca

metaboliti fitotossici *in vivo*, durante l'interazione con l'ospite, o *in vitro*, in diverse condizioni di allevamento non prese in esame durante lo studio condotto con la presente tesi.



**Figura 4.23.** Saggio di fitotossicità su tabacco (*Nicotiana tabacum*) dei metaboliti prodotti *in vitro* da *Ralstonia solanacearum*. **a**: pianta trattata con acqua sterile; **b**: pianta trattata filtrato culturale; **c**: pianta trattata con una soluzione di EPS.



**Figura 4.24.** Saggio di fitotossicità su patata (*Solanum tuberosum*) dei metaboliti prodotti *in vitro* da *Ralstonia solanacearum*. **a**: pianta trattata con acqua sterile; **b**: pianta trattata filtrato culturale; **c**: pianta trattata con una soluzione di EPS.

## 5 CONCLUSIONI

La presente tesi di dottorato ha investigato l'interazione tra la specie coltivata di patata, *Solanum tuberosum* varietà "Blondy" e la specie selvatica di patata *Solanum commersonii* ed il batterio fitopatogeno *Ralstonia solanacearum*, al fine di comprendere le determinanti molecolari responsabili della resistenza a tale patogeno e di caratterizzare chimicamente le molecole attive prodotte dal batterio nell'interazione. Il lavoro si colloca nell'ambito di un più ampio programma di ricerca "AGRONANOTECH", che riguarda la genomica strutturale e funzionale in Solanaceae con sequenziamento di regioni genomiche e identificazione di geni coinvolti nella resistenza a stress biotici e nell'accumulo di sostanze di valore nutrizionale.

Lo studio molecolare per l'individuazione dei putativi geni coinvolti nella resistenza al batterio *Ralstonia solanacearum* in patata, ha fatto uso di moderne tecniche basate sul *fingerprint* del cDNA, per evidenziare le differenze presenti nei trascritti prodotti in risposta al patogeno dalle due specie. Il successivo sequenziamento e l'annotazione in banca dati delle sequenze ha consentito di caratterizzare funzionalmente 4 sequenze di trascritti differenzialmente espressi, omologhe a putativi geni a funzione nota, coinvolti nell'attivazione dei processi di trascrizione e nel trasporto attivo, che possono essere implicati nella risposta di resistenza di *Solanum commersonii*.

Altre 5 sequenze di trascritti differenzialmente espressi hanno prodotto omologia con EST ed ipotetiche proteine a funzione sconosciuta; tra queste, 2 sequenze risultate omologhe ad EST provenienti da librerie di cDNA di altre interazioni ospite-patogeno, potrebbero riferirsi a geni che si attivano in risposta all'infezione.

Altre sequenze non hanno prodotto alcuna omologia con quelle già descritte in banca dati, per cui è stata creata una collezione di EST putativamente coinvolti nella risposta a *Ralstonia solanacearum*.

Lo studio chimico ha riguardato i principali metaboliti prodotti dal batterio nell'interazione ospite-patogeno: i lipopolisaccaridi di membrana (LPS), gli esopolisaccaridi (EPS) ed i metabolici fitotossici. La ricerca ha interessato sia l'attività *in vivo* nelle interazioni compatibili ed in quelle incompatibili di tali sostanze, che la caratterizzazione chimica di quelle attive.

La caratterizzazione della struttura chimica ha interessato essenzialmente gli LPS, di cui è stata descritta gran parte della molecola, ossia la frazione "O-chain" ed il "lipide A".

I saggi *in vivo* condotti su tabacco (*Nicotiana tabacum*) con il filtrato colturale di *Ralstonia solanacearum* e gli EPS da esso isolati, non hanno consentito di individuare molecole con attività fitotossica, tuttavia questo non esclude la possibilità che tali composti possano essere prodotti durante l'interazione *in vivo* del patogeno con l'ospite o, *in vitro*, con diverse condizioni di allevamento.

Gli studi sull'attività *in vivo* degli LPS, hanno messo in luce il ruolo chiave che questi metaboliti ricoprono sia nell'interazione compatibile con patata (*Solanum tuberosum*), il cui pretrattamento con gli LPS evita il manifestarsi dei sintomi dell'avvizzimento batterico in risposta al successivo inoculo con *Ralstonia solanacearum*, che nell'interazione incompatibile con tabacco (*Nicotiana tabacum*), in cui il pretrattamento con gli LPS determina una risposta localizzata indotta (LIR) che evita il manifestarsi della reazione di ipersensibilità (HR) in risposta al successivo inoculo con *Ralstonia solanacearum*.

## 6 BIBLIOGRAFIA

Abdurashidova G.G., Tsvetkova E.A., Budowsky E.I. (1989) Nucleotide residues of tRNA, directly interacting with proteins within the complex of the 30 S subunit of *E. coli* ribosome with poly(U) and NAcPhe-tRNAPhe. Federation of European Biochemical Societies letters **243**: 299–302.

Abdurashidova G.G., Tsvetkova E.A., Budowsky E.I. (1990) Determination of tRNA nucleotide residues directly interacting with proteins in the post- and pretranslocated ribosomal complexes. Federation of European Biochemical Societies letters **269**: 398–401.

Akiyama Y., Eda S., Kato K., Tanaka H. (1984) Structural studies of O-antigen of the lipopolysaccharide from an avirulent strain (M4S) of *Pseudomonas solanacearum*. Carbohydrate Research **133**: 289–296.

Akiyama Y., Nishikawaji S., Eda S., Tanaka H., Ohnishi A., Kato K. (1985) Lipopolysaccharide of *Pseudomonas solanacearum*. Agricultural and Biological Chemistry **49**: 1193–1194.

Aldon D., Brito B., Boucher C. and Genin S. (2000) A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. The European Molecular Biology Organization Journal **19**: 2304–2314.

Allen C., Huang Y., Sequeira L. 1991 Cloning of genes affecting polygalacturonase production in *Pseudomonas solanacearum*. Molecular Plant-Microbe Interactions **4**:147–154.

Allfrey V.G., Faulkner R, Mirsky A.E. (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA **51**: 786–794.

Alvarez M.E., Pennell R.I., Meijer 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.

Ambrosino P., Ruocco M., Bosco A., Scala F., Del Sorbo G. (2002) Cloning of plant genes encoding ABC transporters and their expression in response to biotic and abiotic stresses. Journal of Plant Pathology **84**: 171–200.

Araud-Razou I., Vasse J., Montrozier H., Etchebar C., Trigalet A. (1998) Detection and visualization of the major acidic exopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* and its role in tomato root infection and vascular colonization. European Journal of Plant Pathology **104**: 795–809.

Aspiras R.B., Cruz A.R. (1985) Potential biological control of bacteria wilt in tomato and potato with *Bacillus polymyxa* FU6 and *Pseudomonas fluorescens*. In: *Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceeding of an International Workshop held at Philippine Council for Agriculture, Forestry and Natural Resources Research and Development, Los Baños, Laguna, Philippines 8-10 October 1985* (redatto da Persley G.J.). Australian Centre of International Agricultural Research proceeding **13**: 89–92.

- Autrique A., Potts M.J. (1987) The influence of mixed cropping on the control of bacterial blight wilt (*Pseudomonas solanacearum*). *Annals of Applied Biology* **111**: 125-133.
- Bachem C.W.B., van der Hoeven R.S., de Bruijn S.M., Vreugdenhil D., Zabeau M., Visser R.G.F. (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal* **9**:745-753.
- Bailey P., Downes M., Lau P., Harris J., Chen S.L., Hamamori Y., Sartorelli V., Muscat G.E. (1999) The nuclear receptor corepressor N-CoR regulates differentiation: N-CoR directly interacts with MyoD. *Molecular Endocrinology* **13**: 1155-1168.
- Barton-Wills P.A., Wang M.C., Holliday M.R., Long M.R. and Keen N.T. (1984) Purification and composition of lipopolysaccharides from *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae*. *Physiological Plant Pathology* **25**: 387-398.
- Baubichon-Cortay H., Baggetto L.G., Dayan G., Di Pietro A. (1994) Overexpression and purification of the carboxylterminal nucleotide-binding domain from mouse P-glycoprotein. Strategic location of a tryptophan residue. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 22983-22989.
- Beveridge T.J. (1999) Structures of Gram-Negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology* **181**: 4725-4733.
- Boucher C.A., Martinel A., Barberis P., Alloing G., Zischek C. (1986) Virulence genes are carried by a magaplasmid of the plant pathogen *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Genetics and Genomics* **205**: 270-275.
- Boucher C.A., Van Gijsegem F., Barberis P.A., Arlat M., Zischek C. (1987) *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. *Journal of Bacteriology* **169**: 5626-5632.
- Bourne H.R., Sanders D.A., McCormick F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**: 117-127.
- Bradbury J.F. (1986) Guide to plant pathogenic bacteria. Commonwealth Agricultural Bureaux International Mycological Institute.
- Breyne P., Zabeau M. (2001) Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 136-142.
- Breyne P., Dreesen R., Cannoot B., Rombaut D., Vandepoele K., Rombauts S., Vanderhaeghen R., Inzè D., Zabeau M. (2003) Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Molecular Genetics and Genomics* **269**: 173-179.
- Brimacombe R., Atmadja J., Stiege W., Schüler D. (1988) A detailed model of the three-dimensional structure of *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA in situ in the 30 S subunit. *Journal of Mol. Biol* **199**: 115-136.
- Brito B., Marena M., Barberis P., Boucher C., Genin S. (1999) *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology* **31**: 237-251.

Brito B., Aldon D., Barberis P., Boucher C., Genin S. (2002) A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 109–119.

Brown C.R., Mojtahedi H., Santo G.S. (1999) Genetic analysis of resistance to *Meloidogyne chitwoodi* introgressed from *Solanum hougasii* in cultivated potato. *Journal of Nematology* **31**: 264-271.

Buddenhagen I.W., Sequeira L., Kelman A. (1962) Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **52**: 726.

Buddenhagen I.W. (1986) Bacterial wilt revisited. In: *Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceeding of an International Workshop held at Philippine Council for Agriculture, Forestry and Natural Resources Research and Development, Los Baños, Laguna, Philippines 8-10 October 1985* (redatto da Persley G.J.). Australian Centre of International Agricultural Research proceeding **13**: 126-143.

Capel M.S., Sillers I.Y. (1987) A complete mapping of the proteins in the small ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *Science* **238**: 1403–1406.

Carputo D., Barone A., Cardi T., Sebastiano A., Frusciante L., Peloquin S.J. (1997) Endosperm balance number manipulation for direct in vivo germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **94**: 12013-12017.

Carson M.R., Welsh M.J. (1995) Structural and functional similarities between the nucleotide-binding domains of CFTR and GTP-binding proteins. *Biophysical Journal* **69**: 2443-2448.

Ciampi-Panno L., Fernandez C., Bustamante P., Andrade N., Ojeda S., Contreras A. (1989) Biological control of bacterial wilt of potatoes caused by *Pseudomonas solanacearum*. *American Potato Journal* **66**: 315-332.

Cook D.R., Sequeira L. (1988) The use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in taxonomy and diagnosis. *Australian Centre of International Agricultural Research Bacterial Wilt Newsletter* N° **4**: 4.

Cook D.R., Sequeira L. (1991) Genetic and biochemical characterization of *Pseudomonas solanacearum* gene cluster required for extracellular polysaccharide production and for virulence. *Journal of Bacteriology* **173**: 16547-1662.

Cook D.R., Sequeira L. (1994) Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (redatto da Hayward A.C.; Hartman G.L.). Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK: 7-93.

Cooper R. M. 1983 The mechanisms and significance of enzymatic degradation of host cell walls by parasites. John Wiley and Sons, New York, N.Y.

Cornelis G.R., Van Gijsegem F. (2000) Assembly and function of type III secretory system. *Annual Review of Microbiology* **54**: 735-7742.

- Corsaro M.M., Evidente A., Lanzetta R., Lavermicocca P., Molinaro A. (2001a) Structural determination of the phytotoxic mannan exopolysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei*. *Carbohydrate Research* **330**: 271-277.
- Corsaro M.M., Evidente A., Parrilli M., Surico G., De Gara L., da Pinto M.C. (2001b) The structure of the exopolysaccharide fraction from *Pseudomonas savastanoi* strain ITM 519 and the defence response it induce in non-host plants. *Phytopathologia Mediterranea*. **40**: 276-283.
- Dangl J.L., Jones D. G. (2001) Plant pathogens and integrated defence response to infection. *Nature* **411**: 826-833.
- Davie J.R., Spencer V.A. (1999) Control of histone modifications. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* **32-33**:141-148.
- Dean D., Yates J.L., Nomura M. (1981) Identification of ribosomal protein S7 as a repressor of translation within the *str* operon of *E. coli*. *Cell* **24**: 413-419.
- Denny T.P., Baek S.R., (1991) Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**: 198-206.
- Denny T.P. (1995) Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* **33**: 173-197.
- Denny T.P. (2000) *Ralstonia solanacearum*-a plant pathogen in touch with its host. *Trends in Microbiology* **8**:486-489.
- Deslandes L., Olivier J., Theulières F., Hirsch J., Feng D.X., Bittner-Eddy P., Beynon J., Marco Y. (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of novel family of resistance genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **99**: 2404-2409.
- Döring T., Mitchell P., Osswald M., Bochkariov D., Brimacombe R. (1994) The decoding region of 16S RNA; a cross-linking study of the ribosomal A,P and E sites using tRNA derivatized at position 32 in the anticodon loop. *The European Molecular Biology Organization Journal* **13**: 2677-2685.
- Driessen A.J.M., Rosen B.P., Konings W.N. (2000) Diversity of transport mechanisms: common structural principles. *Trends in Biochemical Sciences* **25**: 397-401.
- Duijff B.J., Alabouvette C., Lemanceau P (1996) Involvement of induced systemic resistance in the control of fusarium wilt of tomato by *Fusarium oxysporum* strain FO47 and *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *IOBC WRPS Bulletin* **19**:120-24.
- Duijff B.J., Gianinazzi-Pearson V., Lemanceau P. (1997) Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytologist* **135**:325-334.
- Durrant W.E., Rowland O., Piedras P., Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G. (2000) cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* **12**: 963-977.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (OEPP/EPPO) and Commonwealth Agricultural Bureaux International (CABI) (1996) *Ralstonia solanacearum*. In: *Quarantine Pests for Europe (2nd Edition)* (redatto da Smith I.M., McNamara D.G., Scott P.R., Holderness M.). Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (OEPP/EPPO) and Commonwealth Agricultural Bureaux International (CABI) (1996) *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*. In: *Quarantine Pests for Europe (2nd Edition)* (redatto da Smith I.M., McNamara D.G., Scott P.R., Holderness M.). Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (OEPP/EPPO) (2004). Bulletin **34**: 173-178.

Farag N.S., Lashin S.M., All-Abdel R.S., Shatta H.M., Seif-Elyazal A.M. (1982) Antibiotics and control of potato black leg and brown rot disease. *Agricultural Research Review* **60**: 149-166.

Farag N.S., Fawzi F.G., El-Said S.I.A., Mikhail M.S. (1986) Streptomycin in relation to potato brown rot control. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **21**: 115-122.

Fluhr R., (2001) Sentinels of disease. Plant resistance genes. *Plant Physiology* **127**: 1367-1374.

French E.R., Sequeira L. (1968) Bacterial wilt or moko of plantain in Peru. *Fitopatologia* **3**: 27-38.

French E.R. (1985) Multiple disease resistance in potato cultivars with *Solanum phureja* and *Solanum demissum* background. *Phytopathology* **75**: 1288.

Gallardo P.B., Panno L.C. (1989) Biological control of bacterial wilt of potato induced by *Pseudomonas solanacearum*. *Revista de Microbiologia* **20**: 18-26.

Geiman T. M., Robertson K. D. (2002) Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation - how does it all fit together?. *Journal of Cellular Biochemistry* **87**: 117-125.

Genin S., Boucher C. (2002) *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Molecular Plant Pathology* **3**: 111-118.

Gillings M.R., Fahy P. (1994) Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (redatto da Hayward A.C.; Hartman G.L.). Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK: 95-112.

Gornicki P., Nurse K., Hellmann W., Boublik M., Ofengand J. (1984) High resolution localization of the tRNA anticodon interaction site on the *Escherichia coli* 30 S ribosomal subunit. *Journal of Biological Chemistry* **259**: 10493-10498.

Graham T.L., Sequeira L. and Huang T.S. (1977) Bacterial lipopolysaccharides as inducers of disease resistance in tobacco. *Applied and Environmental Microbiology* **34**: 424-432.

- Graham J., Lloyd A.B. (1979a) Survival of the potato strain (race 3) of *Pseudomonas solanacearum* in the deeper soil layers. *Australian Journal of Agricultural Research* **30**: 489-496.
- Graham J., Jones D.A., Lloyd A.B. (1979b) Survival of *Pseudomonas solanacearum* in plant debris and in latency infected potato tubers. *Phytopathology* **69**: 1100-1103.
- Granada G.A., Sequeira L. (1983) Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and plant roots. *Canadian Journal of Microbiology* **29**: 433-440.
- Hammond-Kosack K. E., Parker J. E. (2003) Deciphering plant pathogen communication: fresh perspective for molecular resistance breeding. *Current Opinion Biotechnology* **14**: 177-193.
- Hanneman Jr. R.E. (1989) The potato germplasm resource. *American Potato Journal* **66**: 655-667.
- Hartman G.L., Elphinstone J.G. (1994) Advances in the control of *Pseudomonas solanacearum* race 1 in major food crops. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (redatto da Hayward A.C.; Hartman G.L.). Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK: 157-177.
- Hartung J.S., Fulbright D.W., Klos E.J. (1988) Cloning of a bacteriophage polysaccharide depolymerase gene and its expression in *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **1**: 87-93.
- Hawkes J.G. (1990) The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven Press, London.
- Hawkes J.G. (1992) Biosystems of the potato. In: *The potato crop 2<sup>nd</sup> edition* (redatto da Harris P.). Chapman Hall, London, UK: 13-64
- Hawkes J.G., Francisco-Ortega J. (1993) The early history of the potato in Europe. *Euphytica* **70**: 1-7.
- Hayward A.C. (1964) Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* **27**: 265-277.
- Hayward A.C. (1983) *Pseudomonas solanacearum*: bacterial wilt and moko disease. In: *Plant bacterial disease* (redatto da Fahy P.C.; Persley G.J.). Academy Press, Sydney, Australia: 129-135.
- Hayward A.C. (1994a) The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (redatto da Hayward A.C.; Hartman G.L.). Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK: 9-24.
- Hayward A.C. (1994b) Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (redatto da Hayward A.C.; Hartman G.L.). Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK: 123-125.

- Hayward A.C. (2000) *Ralstonia solanacearum*. Encyclopedia of Microbiology, Academy Press, London (UK) Vol **4**: 32-42.
- Heuck C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**: 379-433.
- Higgins C.F. (1992). ABC transporter: from microorganisms to man. Annual Review of Cell and Developmental Biology **8**: 67-113.
- Huang Q., Allen C. (1997) An exo-poly-alpha-D-galacturonosidase, PehB, is required for wild-type virulence of *Ralstonia solanacearum*. Journal of Bacteriology **179**: 7369-7378.
- Husain A., Kelman A. (1958) relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology **48**: 155-165.
- Hyde S.C., Emsley P., Hartshorn M.J., Mimmack M.M., Gileadi U., Pearce S.R., Gallagher M.P., Gill D.R., Hubbard R.F., Higgins C.F. (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. Nature **346**: 362-366.
- Jahr H.R., Bahro R., Eichenlaub R. (1999) Exopolysaccharides from phytopathogenic bacteria. In: *Progress in Botany* (redatto da Esser K.). Springer-Verlag, Berlin vol.**60**: 119-138.
- Janse J.D. (1991) Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains, using whole cell fatty acid analysis. Systematic and Applied Microbiology **14**: 335-345
- Janse J.D., van den Beld H.E., Ephinstone J., Simpkins S., Tjou-Tam Sin N.N.A. and van Vaerenbergh J. (2004) Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. Journal of Plant Pathology **87**: 147-155.
- John M., Rohrig H., Schmidt J., Walden R., Schell J. (1997) Cell signalling by oligosaccharides. Trends in Plant Science **2**: 111-115.
- Johnston S.A., den Nfe T.P.M., Peloquin S.J., Hanneman Jr. R.E.(1980) The significance of genetic balance to endosperm development in interspecific crosses. Theoretical and Applied Genetics **57**:5-9.
- Johnston S.A., Hanneman Jr. R.E. (1982) Manipulations of Endosperm Balance Number overcome crossing barriers between diploid *Solanum* species. Science **217**:446-448.
- Kanehisa M., Goto S., Hattori M., Aoki-Kinoshita K.F., Itoh M., Kawashima S., Katayama T., Araki M., Hirakawa M. (2006) From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. Nucleic Acids Research **34**: D354-357.
- Kao C.C., Barlow E., Sequeira L. (1992) Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Bacteriology **173**: 1068-1071.
- Keith L.M.W., Bender C.L. (1999) AlgT ( $\sigma_{22}$ ) controls alginate production and tolerance to environmental stress in *Pseudomonas syringae*. Journal of Bacteriology **181**: 7176-7184.

Kelman A. (1953) The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. A literature review and bibliography. Technical Bulletin of North Carolina Agricultural Experiment Station N° **99**: 194.

Kelman A., Hartman G.L., Hayward A.C. (1994) Introduction. : *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (redatto da by Hayward A.C.; Hartman G.L.). Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK: 1-7.

Ko Y.H., Pedersen P.L. (1995) The First Nucleotide Binding Fold of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Can Function as an Active ATPase. Journal of Biological Chemistry **270**: 22093-22096.

Kocharova N.A., Knirel Y.A., Shashkov A.S., Nifant'ev N.E., Kochetkov N.K., Varbanets L.D., Moskalenko N.V., Brovanskaya O.S., Muras V.A., Young J.M. (1993) Studies of O-specific polysaccharide chains of *Pseudomonas solanacearum* lipopolysaccharides consisting of structurally different repeating units. Carbohydrate Research **250**: 275-287.

Kolaczowski M., Van der Rest M., Cybularz-Kolaczowska A., Soumillion J. P., Konings W. N. e Goffeau A. (1996) Drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter pdr5p. Journal of Biological Chemistry **271**: 31543-31548.

Kornmann B., Preitner N., Rifat D., Fleury-Olela F., Schibler U. (2001) Analysis of circadian liver gene expression by ADDER, a highly sensitive method for the display of differentially expressed mRNAs. Nucleic Acids Research **29**: 11 e51.

Kuang H., kuang H., Wei F., Marano M.R., Wirtz U., Wang X., Liu J., Shum W.P., Zaborcky J., Tallon L.J., Rensink W., Lobst S., Zhang P., Tornqvist C.E., Tek A., Bamberg J., Helgeson J., Fry W., You F., Luo M.C., Jiang J., Robin Buell C., Baker B. (2005) The R1 resistance gene cluster contains three groups of independently evolving, type I R1 homologues and shows substantial structural variation among haplotypes of *Solanum demissum*. Plant Journal **44**: 37-51.

La Ferriere L.T., Helgeson J.P., Allen C. (1999) Fertile *Solanum tuberosum* x *Solanum commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. Theoretical and Applied Genetics **98**: 1272-1278.

Leach J.E., Sherwood J., Fulton R.W., Sequeira L. (1983) Comparison of soluble proteins associated with disease resistance induced by bacterial lipopolysaccharide and by viral necrosis. Physiological Plant Pathology **23**: 377-385.

Leach J.E., White F.F. (1996) Bacterial avirulence genes. Annual Review of Phytopathology **34**: 153-179.

Leeman M., Van Pelt J.A., Den Ouden F.M., Heinsbroek M., Bakker P.A.H.M. (1995) Induction of systemic resistance against fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology **85**:1021-27.

Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. (1994) Principi di biochimica - seconda edizione. Zanichelli S.p.A. editore Bologna.

Leigh J.A., Coplin D.J. (1992) Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual Review of Microbiology* **46**: 307-346.

Lelliott R.A., Stead D.E., (1987) Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Methods in Plant Pathology*, Blackwell Scientific Press, London (UK) Vol **2**: 216.

Li Z.S., Szczyпка M., Lu Y.P., Thiele D.J., Rea P.A. (1996) The Yeast Cadmium Factor Protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 6509-6517.

Lindgrin P.B. (1997) The role of *hrp* genes during plant-bacterial interaction. *Annual Review of Phytopathology* **35**: 129-152.

Loo T.W., Clarke D.M. (1995) Covalent modification of human P-glycoprotein mutants containing a single cysteine in either nucleotide binding fold abolishes drug-stimulated ATP-ase activity. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 22957-22961.

Louwes K.M., Hoekstra R., Matthew W.M. (1992) Interspecific hybridization between the cultivated potato *Solanum tuberosum* subspecies *tuberosum* L. and the wild species *Solanum Circaeifolium* subsp. *circaeifolium* Bitter exhibiting resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and *Globodera pallida* (Stone) Behrens. 2. Sexual hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* **84**:363-370.

Maleck K., Levine A., Eulgem T., Morgan A., Schmid R., Lawton K.A., Dangl J.L., Dietrich R.A. (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics* **26**: 403-410.

Mandiyan V., Tumminia S., Wall J.S., Hainfeld J.F., Boublik M. (1989) Protein-induced conformational changes in 16 S ribosomal RNA during the initial assembly steps of the *Escherichia coli* 30 S ribosomal subunit. *Journal of Molecular Biology* **210**: 323-336.

Marenda M., Brito B., Callard D., Genin S., Barberis P., Boucher C., Arlat M. (1998) PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum hrp* genes in the presence of plant cells. *Molecular Microbiology* **27**: 437-453.

Martin G.B., Brommonschenkel S.H., Chunwongse J., Frary A., Ganai M.W. (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* **262**: 1432-1436.

Martin G.B., Bogdanove A.J., Sessa G. (2003) Understanding the function of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 23-61.

Martinoia E., Grill E., Tommasini R., Kreuz K., Amrhein N. (1993) An ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* **364**: 247-249.

Matta A. (1996) *Fondamenti di Patologia Vegetale*. Patron Editore: 230-252.

Matthysse A.G., Yarnall H., Boles S.B., McMahan S. (2000) A region of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome containing genes required for virulence and attachment to host cells. *Biochimica et Biophysica ACTA* **1490**: 208-212.

Mazzucchi U. and Pupillo P. (1976) Prevention of confluent hypersensitive necrosis in tobacco leaves by a protein–lipopolysaccharide complex. *Physiological Plant Pathology* **9**: 101-112.

Mazzucchi U., Bazzi C., and Pupillo P. (1979) The inhibition of susceptible and hypersensitive reactions by protein-lipopolysaccharide complexes from phytopathogenic pseudomonads: relationship to polysaccharide antigenic determinants. *Physiological Plant Pathology* **14**: 19-30.

McHale L., Tan X., Koehl P., Michelmore R.W. (2006) Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology* **7**: 212.

Meaney M.J., Szyf M. (2005) Maternal care as a model for experience-dependent chromatin plasticity?. *Trends in Neurosciences* **28**: 456-463.

Meyers B.C., Dickerman A.W., Michelmore R.W., Sivaramakrishnan S., Sobral B.W., Young N.D. (1999) Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant Journal* **20**: 317-332.

Minardi P. (1995) Altered expression of *Erwinia amylovora hrp* genes in tobacco leaves pretreated with bacterial protein-lipopolysaccharides complex. *Journal of Phytopathology* **143**: 199-205.

Murakoshi S., Takahashi M. (1984) Trials of some control of tomato wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Bulletin of the Kanagawa Horticultural Experiment Station* **31**: 50-56.

Nadolny L. and Sequeira L. (1980) Increases in peroxidase activities are not directly involved in induced resistance in tobacco. *Physiological Plant Pathology* **16**: 1-8.

Nesmith W.C., Jenkins S.F. (1985) Influence of antagonists and controlled matrix potential on the survival of *Pseudomonas solanacearum* in four North Carolina soils. *Journal of Phytopathology* **75**: 1182-1187.

Newman M.-A., Daniels M.J. and Dow J.M. (1995) Lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* induces defence-related gene expression in *Brassica campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 778-780.

Newman M.-A., Daniels M.J. and Dow J.M. (1997) The activity of Lipid A and Core Components of bacterial lipopolysaccharides in the prevention of the Hypersensitive Response in pepper. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**: 926-928.

Newman M.-A., von Roepenack E., Daniels M.J. and Dow J.M. (2000) Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology* **1**: 25-31.

Newman M.-A., Dow J.M. and Daniels M.J. (2001) Bacterial lipopolysaccharides and plant-pathogen interactions. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 95-102.

Nowotny V., Nierhaus K.H. (1988) Assembly of the 30S subunit from *Escherichia coli* ribosomes occurs via two assembly domains which are initiated by S4 and S7. *Biochemistry* **27**: 7051-7055.

Nyangeri J.B., Gathuru E.M., Mukunya D.M. (1984) Effect of latent infection on the spread of bacterial wilt of potatoes in Kenya. *Tropical Pest Management* **30**: 163-165.

Olsson K. (1976) Overwintering of *Pseudomonas solanacearum* in Sweden. In: *International Planning Conference and Workshop on the ecology and control of bacterial wilt caused by Pseudomonas solanacearum* (redatto da Sequeira L., Kelman A). North Carolina State University, Raleigh, USA: 105-109.

Ono K., Hara H., Akazawa J. (1984) Ecological studies on the bacterial wilt, caused by *Pseudomonas solanacearum*. The movement of the pathogen in tobacco plants. *Bulletin of the Okayama Tobacco Experimental Station* N° **43**: 41-46.

Orgambide G., Montrozier H., Servin P., Roussel J., Trigalet-Demery D., Trigalet A. (1991) High heterogeneity of the exopolysaccharide of *Pseudomonas solanacearum* strain GMI1000 and the complete structure of the major polysaccharide. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 8312-8321.

Ortiz R., Franco J., Iwanaga M. (1997) Transfer of resistance to potato cyst nematode (*Globodera pallida*) into cultivated potato *Solanum tuberosum* through first division restitution 2n pollen. *Euphytica* **96**:339-344.

Pavek J.J., Corsini D.L. (2001) Utilization of potato genetic resources in variety development. *American Journal of Potato Research* **78**: 433-441.

Persley G.J. (1986a) Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceeding of an International Workshop held at Philippine Council for Agriculture, Forestry and Natural Resources Research and Development, Los Baños, Laguna, Philippines 8-10 October 1985. *Australian Centre of International Agricultural Research proceeding* **13**: 145.

Persley G.J. (1986b) Ecology of *Pseudomonas solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt. In: *Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceeding of an International Workshop held at Philippine Council for Agriculture, Forestry and Natural Resources Research and Development, Los Baños, Laguna, Philippines 8-10 October 1985* (redatto da Persley G.J.). Australian Centre of International Agricultural Research proceeding **13**.

Petrolini B., Quaroni S., Saracchi M. (1986) Scanning electron microscopy investigations on the relationships between bacteria and plant tissues. Investigations on the initial process of *Pseudomonas solanacearum* pathogenesis. *Rivista di Patologia Vegetale* **22**: 100-115.

Pettersson J., Nordfelth R., Dubinina E., Bergman T., Gustafsson M., Magnusson K. E., Wolf-Watz H. (1996) Modulation of Virulence Factor Expression by Pathogen Target Cell Contact. *Science* **273**: 1231-1233.

Pianzola M.J., Zarantonelli L., González G., Franco Fraguas L., Vazquez A. (2005) Genetic, phytochemical and biochemical analyses as tools for biodiversity evaluation of wild *Solanum commersonii* accessions. *Biochemical Systematics and Ecology* **33**: 67-78.

Pieterse C.M.J., van Wees S.C.M., Hoffland E., van Pelt J.A. and van Loon L.C (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is

independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression .The Plant Cell **8**: 1225-1237.

Plaisted R.L., Hoopes R.W. (1989) The past record and future-prospects for the use of exotic potato germplasm. American Potato Journal **66**(10): 603-627.

Pondkowsinski J., Gornicki P. (1989) Ribosomal proteins S7 and L1 are located close to the decoding site of *E. coli* ribosome–affinity labeling studies with modified tRNAs carrying photoreactive probes attached adjacent to the 3'-end of the anticodon. Nucleic Acids Research **17**: 8767–8782.

Pradhanang P.M., Elphinstone J.G. and Fox R.T.V. (2000) Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. Plant Pathology **49**: 403-413.

Qui L., Overmars H., Helder J., Popeijus H., Rouppe van der Voort J., Groenink W., van Koert P., Schots A., Bakker J., Smant G. (2000) An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Molecular Plant-Microbe Interactions **13**: 830-836.

Rathmell W.G. and Sequeria L. (1975) Induced resistance in tobacco leaves: the role of inhibitors of bacterial growth in the intercellular fluid. Physiological Plant Pathology **5**: 65-73.

Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U. and Schmidt G. et al. (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology **8**: 217-225.

Roberts D.P., Denny T.P., Schell M.A. (1988) Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. Journal of Bacteriology **170**: 1445–1451.

Rodrigues-Neto J., Malavolta V.A., Hamahiga I., (1984) Atypical symptoms in potato tubers infected with *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith. Biologico **50**: 93-95.

Rosenberg C., Casse-Delbart F., Dusha I., David M., Boucher C. (1982) Megaplasmids in the plant associated bacteria *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Bacteriology **150**: 402-406.

Ryals J.L., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.Y., Hunt M.D. (1996) Systemic Acquired Resistance . Plant Cell **8**: 1809-1819.

Saile E., McGarvey J.A., Schell M.A., Denny T.P. (1997) Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology **87**: 1264–1271.

Salanoubat M., Genin S., Artiguenave F., Gouzy J., Mangenot S., Arlat M., Billaut A., Brottier P., Camus J.C., Cattolico L., Chandler M., Choisne N., Claudel-Renard C., Cunnac S., Demange N., Gaspin C., Lavie M., Moisan A., Robert C., Saurin W., Schiex T., Siguier P., Thèbault P., Whalen M., Wincker P., Levy M., Weissenbach J., Boucher C.A. (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. Nature **45**: 497-502.

Saddler G.S. (1994) *Burkholderia solanacearum*. IMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria N° 1220, Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK.

Salas A., Simon R., Juarez H., Vargas M., Ames M., Fajardo D., Centeno R., Vivanco K., Peralta I., Roca W., Spooner D. (2006) An illustrated color book of wild potatoes *Solanum* sect. *Petota*.

Sambrook J., Russel D.W. (2001) Molecular Cloning a laboratory manual, III edition Vol. **3**: A8.19-A8.24

Schell M.A., Roberts D.P., Denny T.P. (1988) Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by *pglA* and its involvement in phytopathogenicity. *Journal of Bacteriology* **70**: 4501-4508.

Schell M.A. (2000) Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annual Review of Phytopathology* **38**: 263-292.

Schüler D., Brimacombe R. (1988) The *Escherichia coli* 30S ribosomal subunit; an optimized three-dimensional fit between the ribosomal proteins and the 16S RNA. *EMBO J* **7**: 1509-1513.

Seal S.E., Jackson L.A., Young J.P.W., Daniels M.J. (1993) Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing; construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology* **139**: 1578-1594.

Seal S.E., Elphinstone J.G., (1994) Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (redatto da by Hayward A.C.; Hartman G.L.). Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK: 35-57.

Sequeria L. and Rowe P.R. (1969) Selection and utilization of *Solanum phureja* clones with high resistance to different strains of *Pseudomonas solanacearum*. *American Potato Journal* **46**: 451-462.

Sequeria L. and Hill L.M. (1974) Induced resistance in tobacco leaves: the growth of *Pseudomonas solanacearum* in protected tissues. *Physiological Plant Pathology* **4**: 447-455.

Sequeria L., Graham T.L. (1977). Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* by potato lectin. *Physiological Plant Pathology* **11**: 43-54.

Sharma S., Rose D.R. (1995) Cloning, overexpression, purification, and characterization of the carboxyl-terminal nucleotide binding domain of P-glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 14085-14093.

Singh R. (1995) Seed transmission studies with *Pseudomonas solanacearum* in tomato and eggplant. *Australian Centre of International Agricultural Research Bacterial Wilt Newsletter* N° **11**: 12-13.

Siri M.I., Villanueva P., Pianzola M.J., Fraguas L.F., Galvan G., Acosta M., Ferreira F. (2004) In vitro antimicrobial activity of different accessions of *Solanum commersonii* Dun. from Uruguay. *Potato research* **47**: 127-138.

Sitaramaiah K., Sinha S.K. (1984) Interaction between *Meloidogyne javanica* and *Pseudomonas solanacearum* on brinjal. *Indian Journal of Nematology* **14**: 1-5.

Stade K., Rinke-Appel J., Brimacombe R. (1989) Site-directed cross-linking of mRNA analogues to the *Escherichia coli* ribosome; identification of 30S ribosomal components that can be cross-linked to the mRNA at various points 5' with respect to the decoding site. *Nucleic Acids Research* **17**: 9889-9908.

Staskawicz B.J., Mudgett M.B., Dangl J.L., Galan J.E. (2001) Common and contrasting themes of plant and animal disease. *Science* **292**: 2285-2289.

Strider D.L., Jones R.K. and Haygood R.A. (1981) Southern bacterial wilt of geranium caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Disease* **65**: 52-53.

Sutcliffe J.G., Foye P.E., Erlander M.G., Hillbush B.S., Bodzin L.J., Durham J.T., Hasel K.W. (2000) TOGA: an automated parsing technology for analyzing expression of nearly all genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **97**: 1976-1981.

Swanepol A.E. (1990) The effect of temperature on the development of wilting and on progeny tuber infection of potatoes inoculated with South African strains of biovar 2 and 3 of *Pseudomonas solanacearum*. *Potato Research* **33**: 287-290.

Sylvers L.A., Kopylov A.M., Wower J., Hixson S.S., Zimmermann R.A. (1992) Photochemical cross-linking of the anticodon loop of yeast tRNA<sup>Phe</sup> to 30S-subunit protein S7 at the ribosomal A and P sites. *Biochimie* **74**: 381-389.

Tans-Kersten J., Guan Y., Allen C. (1998) *Ralstonia solanacearum* pectin methylesterase is required for growth on methylated pectin but not for bacterial wilt virulence. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 4918-4923.

Tingey W.M., Mackenzie J.D., Gregory P. (1978) Total foliar glycoalkaloids and resistance of wild potato species to *Empoasca fabae*. *American Potato Journal* **55**: 57-585.

Tingey W.M. (1984) Glycoalkaloids as pest resistance factors. *American Potato Journal* **67**: 461-466.

Trigalet-Demery D., Montrozier H., Orgambide G., Patry V., Adam O., Navarro L., Cotellet V., Trigalet A. (1993) Exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum*: relation to virulence. In: *Bacterial wilt. ACIAR proceeding n° 45, proceeding of an International Symposium held in Kaohsiung, Taiwan* (redatto da Hartman G.L. and Hayward A.C.). Watson Ferguson and company, Brisbane Australia: 312-315.

Urban M., Bhargava T., Hamer J.E. (1999) An Atpdriver efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *The European Molecular Biology Organization Journal* **18**: 512-521.

Van Der Biezenner E.A., Juwana H., Parker J.E., Jones J.D.G. (2000) cDNA-AFLP display for the isolation of *Peronospora parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 895-898.

- Van Gijsegem F., Gough C., Zischek C., Niqueux E., Arlat M., Genin S., Barberis P., German S., Castello P., Boucher C. (1995) The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum* which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Molecular Microbiology* **15**: 1095-1114.
- Van Peer R., Schippers B. (1992) Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to fusarium wilt. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **98**:129-39.
- Varbanets L.D., Kocharova N.A., Knirel Y.A., Muras V.A., Moskalenko N.V., Brovorskaya O.S. (1990) The lipopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* and *Pseudomonas cichorii*. *Mikrobiologicheskii zhurnal* **52**: 27-33.
- Vasse J., Frey P., Trigalet A. (1995) Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 241-251.
- Vazquez A., Gonzalez G., Ferreira F., Moyna P., Kenne L. (1997) Glycoalkaloids of *Solanum commersonii* Dun ex Poim. *Euphytica* **95**: 195-201.
- Vijayakumar S., Thyagaraj N.E., Vishwanathappa K.R., Devaiah C:P. (1985) Effect of type of planting material on yield and wilt incidence in potato. *Bacterial Wilt Newsletter* **3**: 13-14.
- Volcani Z., Palti J. (1960) *Pseudomonas solanacearum* in Israel. *Plant Disease Reporter* **44**: 448-449.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407-4414.
- Vos P. et al. (1998) The tomato Mi-1 gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Natural Biotechnology* **16**: 1365-1369.
- Wall D., Kaiser D. (1999) Type IV pili and cell motility. *Molecular Microbiology* **32**: 1-10.
- Wallis F., Truter S.J. (1978) Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum* with emphasis on ultrastructure. *Physiological Plant Pathology* **13**: 307-317.
- Watanabe K., El-Nashaar H.M., Iwanaga M. (1992). Transmission of bacterial wilt resistance by First Division Restitution (FDR) 2n pollen via 4x X 2x crosses in potatoes. *Euphytica* **60**:21-26.
- Wenneker M., Verdel M.S.W., Van Beuningen A.R., Derk J.H.J. and Janse J.D. (1999) *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: first report on stinging nettle (*Urtica dioica*). *European Journal of Plant Pathology* **105**: 307-315.
- Xiao L.Z., Zhu Z.D., He K.L., Zhou M.N., Lin G.F. (1983) Observation of the infected portion of mulberry bacterial wilt by scanning electron microscopy. *Science of Sericulture* **9**: 58-59.

Yang P., Wang Z., Fan B., Chen C., Chen Z. (1999) A pathogen and salicylic acid induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant Journal* **18**: 141-149.

Yu J.A., Penaloza-Vazquez A., Chakrabarty A.M., Bender C.L. (1999) Involvement of the exopolysaccharides alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. *Molecular Microbiology* **33**: 712-720.

Yu D., Chen C., Chen Z. (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell* **13**: 1527-1540.

Zachos D.G. (1957) The brown rot of potatoes in Greece. *Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki, New Series* **1**: 115-117.

Zehr E.I. (1969) Studies of the distribution and economic importance of *Pseudomonas solanacearum* in certain crops in the Philippines. *Philippine Agriculturist* **53**:218-223.

Siti internet:

Statistiche di FAOSTAT: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>