

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**  
**“FEDERICO II”**

***DOTTORATO DI RICERCA***  
***IN AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA***

**Indirizzo: PATOLOGIA VEGETALE**

**XX CICLO**

---

***GENOMICA FUNZIONALE E POTENZIALI APPLICAZIONI***  
***BIOTECNOLOGICHE DELL'INTERAZIONE MOLECOLARE TRA***  
***PIANTA, FUNGHI PATOGENI E MICRORGANISMI BENEFICI***

---

**Tutor:**

**Prof. MATTEO LORITO**

**Dottorando:**

**Dott.ssa ROBERTA MARRA**

**Coordinatore:**

**Prof. ANTONIO VIOLANTE**







---

# *INDICE*

---

	<i>Pag.</i>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	1
<b>1.1. Interazione pianta-microrganismi</b>	1
1.1.1. <i>Interazione pianta-patogeno</i>	2
1.1.2. <i>Interazione pianta-microrganismi benefici</i>	6
1.1.3. <i>Interazione tra microrganismi antagonisti e patogeni:         il caso Trichoderma</i>	14
<b>1.2. Biotecnologie applicate allo studio delle interazioni         pianta-microrganismi</b>	24
<b>1.3. Tecniche utilizzate per lo studio delle interazioni         pianta-microrganismi</b>	31
1.3.1. <i>Analisi proteomica delle interazioni pianta-microrganismi</i>	34
<b>1.4. Scopo della tesi</b>	35
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	37
<b>2.1. Ceppi fungini e piante utilizzate</b>	37
<b>2.2. Crescita di <i>Trichoderma</i> in condizioni di non interazione</b>	37
<b>2.3. Preparazione di biomassa, pareti cellulari e filtrati         colturali dei patogeni</b>	38
<b>2.4. Crescita di <i>Trichoderma</i> in condizioni di interazione         con agenti fitopatogeni</b>	39
<b>2.5. Allestimento del saggio di interazione su substrato agarizzato         tra <i>Trichoderma</i>, piante di pomodoro e agenti fitopatogeni</b>	39
<b>2.6. Allestimento del saggio di interazione su substrato agarizzato         tra <i>Trichoderma</i>, foglie di fagiolo ed un patogeno fogliare</b>	40
<b>2.7. Allestimento del saggio di interazione su substrato agarizzato         tra <i>Trichoderma</i>, radici di fagiolo ed un patogeno terricolo</b>	41
<b>2.8. Estrazione delle proteine intracellulari</b>	42

	<i>Pag.</i>
<b>2.9. Estrazione delle proteine esocellulari di <i>Trichoderma</i></b>	43
<b>2.10. Elettroforesi bidimensionale (2-DE)</b>	43
<b>2.11. Analisi delle immagini</b>	44
<b>2.12. Digestione degli spot su gel, spettrometria di massa ed analisi <i>in silico</i></b>	45
<b>2.13. Determinazione della sequenza mediante degradazione Edman</b>	46
<b>2.14. Ricerca di geni codificanti ciclofilline in librerie EST di <i>Trichoderma</i> spp.</b>	47
<b>2.15. Amplificazione tramite PCR di frammenti codificanti per ciclofilline in <i>T. atroviride</i> e <i>T. harzianum</i></b>	47
<b>2.16. Clonaggio e sequenziamento di frammenti genici codificanti per ciclofilline in <i>T. atroviride</i> e <i>T. harzianum</i></b>	49
2.16.1. <i>Ligazione in vettore plasmidico</i>	49
2.16.2. <i>Trasformazione delle cellule competenti</i>	50
2.16.3. <i>Analisi dei trasformanti</i>	50
2.16.4. <i>Estrazione del DNA plasmidico</i>	51
2.16.5. <i>Digestione enzimatica e sequenziamento dei cloni</i>	51
<b>2.17. Analisi Southern</b>	51
<b>2.18. Studio di espressione di ciclofilline in <i>T. atroviride</i> ceppo P1</b>	52
2.18.1. <i>Condizioni di crescita</i>	52
2.18.2. <i>Estrazione dell'RNA</i>	53
2.18.3. <i>Analisi northern</i>	54
<b>2.19. Separazione delle frazioni proteiche da filtrati colturali di <i>Trichoderma</i> spp. mediante SDS-PAGE e sequenziamento di proteine</b>	54
<b>2.20. Clonaggio del gene <i>hytra1</i></b>	55
2.20.1. <i>Purificazione dell'RNA messaggero (mRNA)</i>	55
2.20.2. <i>PCR-RACE 3'</i>	56
<b>2.21. Caratterizzazione fisiologica dell'idrofobina HYTRA1</b>	57
2.21.1. <i>Purificazione di HYTRA1 da filtrato colturale</i>	57
2.21.2. <i>Saggi di attività di HYTRA1 su funghi patogeni</i>	57
2.21.3. <i>Saggi di interazione di HYTRA1 con la pianta</i>	58
<b>3. RISULTATI</b>	59

	Pag.
<b>3.1. Interazioni multi-componente e separazione dei proteomi</b>	59
<b>3.2. Analisi delle proteine intracellulari di <i>Trichoderma</i> in condizioni di non interazione</b>	60
<b>3.3. Analisi delle proteine intracellulari di <i>Trichoderma</i> in condizioni di interazione con agenti fitopatogeni</b>	62
<b>3.4. Saggio di interazione su substrato agarizzato tra <i>Trichoderma</i>, piante di pomodoro e agenti fitopatogeni</b>	65
<b>3.5. Saggio di interazione su substrato agarizzato tra <i>Trichoderma</i>, foglie di fagiolo ed un patogeno fogliare</b>	69
<b>3.6. Saggio di interazione su substrato agarizzato tra <i>Trichoderma</i>, radici di fagiolo ed un patogeno terricolo</b>	77
<b>3.7. Analisi delle proteine esocellulari secrete da <i>T. harzianum</i> ceppo T22 allevato in condizioni che stimolano le capacità antagonistiche</b>	85
<b>3.8. Studio funzionale di espressione e parziale caratterizzazione di alcune proteine differenziali prodotte dal fungo antagonista <i>Trichoderma</i> nelle interazioni tri-componente esaminate</b>	88
<b>3.8.1. Le ciclofilline</b>	88
3.8.1.1. <i>Analisi di librerie EST di Trichoderma spp.</i>	88
3.8.1.2. <i>Analisi PCR, clonaggio e sequenziamento di frammenti genici codificanti ciclofilline in T. atroviride e T. harzianum</i>	90
3.8.1.3. <i>Analisi Southern</i>	92
3.8.1.4. <i>Analisi northern</i>	93
<b>3.8.2. Le idrofobine</b>	93
3.8.2.1. <i>Isolamento di una idrofobina di Trichoderma e clonaggio del relativo gene</i>	94
3.8.2.2. <i>Saggi di attività di HYTR1 su funghi patogeni</i>	96
3.8.2.3. <i>Interazione HYTR1 – pianta</i>	99
<b>4. DISCUSSIONE</b>	102
<b>5. CONCLUSIONI</b>	112
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	114



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. Interazione pianta-microrganismi

Le piante vivono abitualmente in intima associazione con i microrganismi, con i quali possono instaurare interazioni benefiche (simbiotiche e non) o nocive (patogeniche).

Le condizioni ambientali in cui hanno luogo tali interazioni sono tuttavia notevolmente differenti se si considera l'ampia variabilità esistente sulla superficie aerea delle piante (la fillosfera) e la maggiore stabilità della zona circostante le radici (la rizosfera). La prima è esposta a rapidi e frequenti cambiamenti di temperatura, umidità, intensità luminosa, ecc., con conseguenti modifiche della concentrazione dei nutrienti disponibili e dell'osmolarità (Andrews e Harris, 2000; Lindow e Brandl, 2003). Sebbene questo microambiente possa apparire ostile allo sviluppo dei microrganismi, la popolazione microbica della fillosfera include diversi generi di batteri, funghi filamentosi, lieviti, alghe e, meno frequentemente, protozoi e nematodi (Andrews e Harris, 2000).

La rizosfera fornisce invece maggior protezione della fillosfera dalla disidratazione, dagli sbalzi di temperatura e di intensità luminosa, nonché maggiore abbondanza di fonti nutritive (Bolton *et al.*, 1992; Curl e Truelove 1986; Walker *et al.*, 2003). Per questo motivo numerose specie di batteri, funghi, protozoi e nematodi colonizzano la rizosfera, rimanendo liberi o adesi alla superficie delle radici (Bolton *et al.*, 1992; Bowen e Rovira, 1999).

Le ricerche condotte negli ultimi anni hanno fornito un quadro interpretativo nuovo del modo in cui le piante interagiscono con la comunità microbica e con l'ambiente che le circonda. L'analisi delle interazioni pianta-microrganismi ha consentito l'identificazione e la caratterizzazione di numerosi geni, proteine e molecole coinvolti nella risposta della pianta, così come nel metabolismo della componente microbica (Hammond-Kosack e Parker, 2003). La comprensione dei meccanismi attraverso i quali i microrganismi rispondono ai segnali prodotti dalla pianta in termini di crescita ed espressione genica, e del ruolo che hanno le molecole segnale prodotte dalla pianta stessa nel determinare la specificità e la selettività dell'interazione instaurata, rappresenta un elemento fondamentale per decifrare la chiave di lettura delle interazioni pianta-microrganismi.

### ***1.1.1. Interazione pianta-patogeno***

Le piante, al pari dell'uomo e di altri animali, si ammalano, ma lo sviluppo della malattia richiede la contemporanea presenza di un ospite suscettibile, di un patogeno virulento e di condizioni ambientali favorevoli. Inoltre, nell'ambito del rispettivo ciclo vitale, lo stadio di sviluppo della pianta da un lato e del patogeno dall'altro possono ulteriormente influenzare il verificarsi o meno dell'evento patologico (Montesinos *et al.*, 2002).

La maggior parte delle piante è in grado di resistere all'attacco dei patogeni poiché ha sviluppato un sofisticato sistema di difesa basato sulla combinazione di risposte costitutive ed inducibili che possono agire in maniera localizzata o sistemica, diffondendosi in tutti i tessuti ed organi della pianta (Dangl e Jones, 2001). Una delle più potenti risposte delle piante all'attacco di patogeni è la risposta ipersensibile (HR) caratterizzata dalla morte rapida e localizzata delle cellule adiacenti il sito di infezione per evitare l'accesso ai nutrienti e limitare la proliferazione del patogeno. Evidenze sperimentali hanno dimostrato l'intervento di molecole segnale prodotte dalle cellule morte nell'induzione di geni correlati alla difesa (Hammond-Kosack e Jones, 1996; Danyl *et al.*, 1996).

L'interazione pianta-patogeno, come postulato da Flor nella teoria gene-per-gene, può coinvolgere un gene di resistenza (*R*) della pianta, e un corrispondente gene di avirulenza (*Avr*) del patogeno (Flor, 1971). Nelle interazioni regolate da questo sistema, quando i geni *R* e *Avr* sono assenti o inattivi, rispettivamente nella pianta o nel patogeno, si può avere lo sviluppo della malattia. L'interazione pianta-patogeno non sintomatica richiede il riconoscimento tra il prodotto del gene *R* e quello del gene *Avr* e i successivi eventi di trasduzione del segnale porteranno all'attivazione dei meccanismi di difesa e all'arresto della crescita del patogeno (Hammond-Kosack e Parker, 2003).

Molti geni di resistenza *R* e geni di avirulenza *Avr* sono stati clonati, ma una diretta interazione fisica tra i prodotti dei geni *R* ed *Avr* è stata dimostrata solo in pochi casi. Tra questi vi è l'interazione tra il prodotto del gene di resistenza *Pto* di pomodoro ed il corrispondente gene di avirulenza *AvrPto* di *Pseudomonas syringae* (Tang *et al.*, 1996) e quella tra il prodotto del gene *Pi-ta* di riso e il prodotto del gene di avirulenza *AVR-Pita* di *Magnaporthe grisea* (Jia *et al.*, 2000). Recentemente è stata dimostrata anche la diretta interazione tra la proteina RRS1-R di *Arabidopsis* e il corrispondente fattore di virulenza Pop2 di *Ralstonia solanacearum* (Deslandes *et al.*, 2003).

Più spesso, invece, questa interazione è mediata da altri componenti il cui ruolo sembra essere importante nello specifico riconoscimento del prodotto del gene di avirulenza (Luderer e Joosten, 2001).

I geni *Avr* sono importanti determinanti molecolari nell'interazione tra il patogeno e l'ospite e per alcuni di essi è stata ipotizzata una specifica funzione nella biologia del patogeno. Infatti, pur essendo determinanti molecolari di avirulenza, si ritiene che la loro funzione per il patogeno sia associata alla virulenza (Abramovitch e Martin, 2004); inoltre, appaiono spesso ben conservati nell'evoluzione del patogeno, evidentemente perché sono stati in grado di fornire ad esso un vantaggio selettivo.

I geni di resistenza (*R*) clonati conferiscono resistenza ad un vasto numero di patogeni, tra cui virus, batteri, funghi, nematodi ed insetti (Takken e Joosten, 2000). La maggior parte delle proteine *R* hanno localizzazione citoplasmatica e possiedono delle omologie strutturali, quali:

- ripetizioni di sequenze ricche di leucine (LRR), probabilmente coinvolte nell'interazione con le proteine AVR;
- siti di legame con nucleotidi (NBS), quali ATP e GTP, essenziali per il funzionamento di queste proteine;
- omologie con il dominio conservato Toll di *Drosophila* ed i recettori interleuchina-I dei mammiferi (TIR)
- cerniere di leucina (LZ), ovvero sequenze di 8 amminoacidi che facilitano l'interazione tra proteine contribuendo alla loro dimerizzazione;
- domini putativi di ancoraggio alla membrana (Dangl e Jones, 2001).

I meccanismi che permettono ai geni *R* di rendere la pianta resistente ad uno specifico patogeno non sono ancora del tutto chiari. Durante le fasi successive al riconoscimento, le ipotesi più accreditate prevedono varie reazioni di fosforilazione ed una serie di reazioni enzimatiche a cascata che portano ad una reazione localizzata (HR) ed in alcuni casi anche ad una sistemica (SAR) (Hammond-Kosack e Jones, 1996).

I meccanismi di resistenza che la pianta mette in atto per contrastare l'azione dei patogeni includono anche difese pre- e post-infezionali, suddivise a loro volta in meccaniche e chimiche.

Ad ogni modo, la resistenza a molti altri potenziali invasori, sufficientemente aggressivi ed attratti dalla pianta, dipende dalla capacità di erigere delle difese attive post-infezionali. In una pianta si possono verificare modificazioni morfologiche e strutturali indotte successivamente all'infezione che impediscono o rallentano la penetrazione del

patogeno, quali produzione di ormoni da ferita e di suberina, formazione di tulle o di gomme contenenti tannini, ispessimenti delle pareti direttamente sollecitate dal patogeno.

Le difese biochimiche post-infezionali sono legate invece alla secrezione di sostanze che non erano presenti prima dell'infezione oppure erano presenti in quantità ridotte, come ad esempio i fenoli (attivi nella forma ossidata dalle fenolasi, fenolossidasi, perossidasi e polifenolossidasi), le fitoalessine, i sesquiterpeni, i ROS (reactive oxygen species), le PR (Pathogenesis Related) proteins, ecc... I ROS che si accumulano durante le reazioni incompatibili possono distruggere le membrane cellulari producendo perossidi lipidici e, nello stesso tempo, favorire reazioni che rafforzano le pareti cellulari. Hanno un ruolo diretto come molecole antimicrobiche e come molecole segnale per attivare la reazione di ipersensibilità e la ISR (induced systemic resistance). La reazione di ipersensibilità (HR) è spesso associata alla resistenza indotta localizzata (LAR) o sistemica (SAR), che possono verificarsi non solo quando la pianta è soggetta a infezioni ma anche in seguito a lesioni, trattamenti con agenti chimici quali acido salicilico, ossalato, acidi grassi insaturi o spermidina (Harms, 1992). La resistenza sistemica acquisita può convertire l'interazione pianta-patogeno da compatibile ad incompatibile (Ryals *et al.*, 1996) e può essere efficace contro diversi tipi di patogeni (batteri, funghi e virus).

Le PR proteins sono proteine vegetali indotte in situazioni patologiche: esse si accumulano sia a livello intracellulare che negli spazi intercellulari in risposta ad un patogeno o a stress abiotici, e sono coinvolte nella ISR; esse comprendono enzimi (glucanasi, proteasi, perossidasi) o inibitori di proteasi, proteine ricche in glicina o cisteina, osmotine e taumatine. Molte di esse hanno spiccata attività antimicrobica ad azione sinergica. L'espressione transgenica costitutiva di una o più PR proteins comporta difatti un aumento della resistenza in pianta (Broglie *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 1994; Guido *et al.*, 1995). In genere, la loro espressione è indotta da elicitori quali acido salicilico, etilene, acido jasmonico ed è associata all'espressione di geni di resistenza. Nell'ambito di questa famiglia di proteine risultano essere particolarmente interessanti le chitinasi e le glucanasi, enzimi che catalizzano rispettivamente l'idrolisi della chitina e dei  $\beta$ -glucani, che sono i principali costituenti della parete della maggior parte dei funghi fitopatogeni. Si ritiene che questi enzimi siano responsabili della lisi dell'apice ifale, con conseguente inibizione della crescita fungina, e del rilascio di sostanze che stimolano le risposte di difesa della pianta (Sahai e Manocha, 1993).

Lo sviluppo della malattia nelle piante è comunque un evento limitato, sia per la poca frequenza delle condizioni favorevoli allo sviluppo dell'infezione nei tessuti dell'ospite, sia perché la maggior parte delle interazioni pianta-patogeno sono altamente specifiche e le piante sono in grado di difendersi dall'attacco microbico (Montesinos *et al.*, 2002). E' stato a lungo ipotizzato che la capacità di provocare una malattia da parte di un patogeno dipenda, almeno in parte, dalla sua capacità di eludere o inibire le difese della pianta (Heath, 1981). Il verificarsi dell'evento patologico, quindi, è legato anche all'intervento di fattori di patogenicità che inducono la suscettibilità in una pianta ospite altrimenti resistente o tollerante. Diversi fattori di patogenicità sono stati identificati, tra cui effettori proteici veicolati dai sistemi di secrezione tipo III ed alcune tossine nei batteri fitopatogeni, tossine ospite-selettive (HSTs) e piccole molecole ad azione inibitoria nei funghi, inibitori del silenziamento genico post-transcrizionale nei virus (Abramovitch e Martin, 2004). E' stato dimostrato che batteri fitopatogeni come *Pseudomonas syringae* possono modulare la loro capacità di indurre in una determinata pianta la morte programmata delle cellule (PCD) agendo sulla capacità dell'ospite di riconoscere come virulenti o avirulenti determinati fattori. Ad esempio, l'effettore proteico AvrPtoB di *P. syringae* pv. *tomato* ceppo DC3000 è normalmente riconosciuto dal corrispondente prodotto del gene R (Pto) di pomodoro, determinando una PCD basata sulla HR quando entrambe le proteine sono espresse nelle foglie di pomodoro (Kim *et al.*, 2002). In tabacco, al contrario, AvrPtoB ha funzionato come un "soppressore della morte cellulare" (CDS), dal momento che ha inibito la morte cellulare indotta dalla proteina R Pto (Abramovitch *et al.*, 2003). Sono stati scoperti molti altri effettori di tipo III in grado di inibire la morte cellulare nell'ospite ed indurre quindi la suscettibilità in pianta (Jamir *et al.*, 2004). E' stato anche proposto di distinguere tali fattori di patogenicità in qualitativi (come AvrPtoB) e quantitativi, nel caso in cui l'inibizione della morte delle cellule dell'ospite si verifichi al raggiungimento di un'opportuna soglia limite di fattori segnale (Shirasu e Schulze-Lefert, 2000; Tao *et al.*, 2003). L'attività di un fattore di virulenza può, in definitiva, risultare dominante rispetto al riconoscimento R-Avr su cui si basano tradizionalmente le interazioni gene-per-gene e mascherare un fenotipo resistente. L'identificazione di fattori di resistenza nascosti dall'azione di tali effettori CDS farebbe aumentare il repertorio dei geni R funzionali e nel contempo consentire di sviluppare piante dotate di una resistenza più duratura (Abramovitch *et al.*, 2004).

### 1.1.2. Interazione pianta-microrganismi benefici

Sono stati individuati molti microrganismi, sia funghi che batteri, capaci di interagire con la pianta esercitando su di essa un'azione benefica diretta e/o indiretta. I meccanismi attuati dai microrganismi per promuovere in modo diretto la crescita delle piante comprendono la fissazione dell'azoto e la sua trasmissione alla pianta, l'aumento della disponibilità di ferro e fosforo o la loro cattura dal suolo e la consegna di questi minerali alla pianta in forma da essa utilizzabile, nonché la sintesi di fitormoni che stimolano la proliferazione delle cellule vegetali. I microrganismi con azione benefica indiretta, invece, sono quelli che inibiscono la crescita dei patogeni che interferiscono con i normali processi di sviluppo della pianta.

Tra i più importanti gruppi di microrganismi benefici troviamo i funghi antagonisti e quelli micorrizici, i batteri che promuovono la crescita (PGPR) e quelli agenti di biocontrollo.

I funghi antagonisti esercitano un'azione benefica nei confronti della pianta controllando agenti patogeni attraverso molteplici meccanismi, quali la produzione di antibiotici, enzimi litici, sostanze antimicrobiche, ecc., ovvero mediante una competizione per i nutrienti o una diretta parassitizzazione (Tab. 1).

**Tabella 1.** Esempi di funghi antagonisti.

Fungo antagonista	Meccanismo	Patogeno controllato
<i>Trichoderma</i> spp.	Micoparassitismo, antibiosi, competizione	<i>Fusarium</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Sclerotinia</i>
<i>Verticillium biguttatum</i>	Micoparassitismo	<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Chaetomium</i> spp.	Micoparassitismo e antibiosi	<i>Alternaria</i> , <i>Pythium</i>
<i>Sporidesmium sclerotivorum</i>	Micoparassitismo	<i>Sclerotium</i>
<i>Laetisaria arvalis</i>	Micoparassitismo	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i>
<i>Gliocladium virens</i>	Micoparassitismo e antibiosi	<i>Sclerotinia</i> spp.
<i>Coniothyrium minitans</i>	Micoparassitismo	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
<i>Talaromyces flavus</i>	Micoparassitismo	<i>Verticillium</i>
<i>Pythium nunn</i>	Micoparassitismo	<i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i>

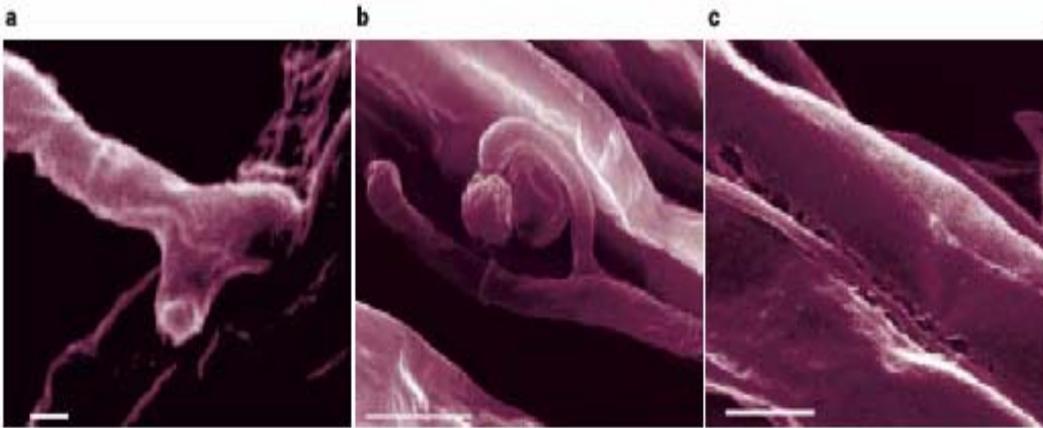
Oltre all'interazione con i patogeni, alcuni microrganismi antagonisti possono interagire con la pianta attraverso processi di colonizzazione, aumento della biodisponibilità di

nutrienti, produzione di sostanze utili al metabolismo della pianta, induzione dei meccanismi di resistenza (ISR) e attivazione della risposta ipersensibile (HR).

Uno dei microrganismi antagonisti maggiormente studiato è *Trichoderma*, un fungo filamentoso micoparassita che, oltre ad attaccare o inibire direttamente i funghi fitopatogeni, è in grado di interagire con le piante promuovendone lo sviluppo, colonizzandone le radici e inducendo resistenza locale e sistemica nei confronti di diversi patogeni.

I ceppi più utili mostrano una proprietà caratteristica nota come “competenza per la rizosfera”, ovvero la capacità di colonizzare e di crescere in associazione con le radici delle piante (Harman, 2000). Talvolta *Trichoderma* colonizza la superficie radicale con caratteristiche morfologiche che ricordano quelle del micoparassitismo; si instaura una zona di interazione in cui ceppi di *Trichoderma* rilasciano molecole bioattive tra cui elicitori di resistenza, omologhi di proteine di avirulenza (Avr), proteine enzimatiche o con altre funzioni (Fig. 1).

L’ottenimento di mutanti di *Trichoderma* ha permesso l’isolamento e la caratterizzazione delle molecole bioattive rilasciate dall’attività dei CWDEs (enzimi che degradano le pareti cellulari fungine), secreti da *Trichoderma* per attaccare sia le pareti cellulari dei funghi patogeni che delle piante. Tali molecole, che sono risultate essere dei piccoli oligosaccaridi costituiti da due monomeri con o senza un residuo aminoacidico, funzionano da induttori dei geni associati al biocontrollo, e in alcuni casi funzionano anche da elicitori dei meccanismi di difesa della pianta (Harman *et al.*, 2004a; Woo *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Interazioni di *Trichoderma asperellum* T-203 con radici di cetriolo in sistema idroponico (Yedidia e Chet, 1999). Le ife di *Trichoderma* si avvolgono attorno ai peli radicali e formano strutture di adesione simili ad appressori (**a** e **b**); successivamente (**c**), *Trichoderma* penetra le ife nell'epidermide della radice attraverso la secrezione di enzimi litici, rimanendo tuttavia confinato negli strati radicali esterni (Yedidia *et al.*, 2000).

Diversi studi hanno dimostrato che i cambiamenti metabolici che si verificano durante la colonizzazione delle radici operata da *Trichoderma* spp. inducono in pianta un aumento della resistenza nei confronti di diversi microrganismi patogeni (Tab. 2). Il fenomeno di induzione della resistenza in pianta favorisce il controllo di varie classi di patogeni (principalmente funghi e batteri) spazialmente e temporalmente distanti dal punto di applicazione di *Trichoderma*, e si verifica in molte specie di piante appartenenti sia alle dicotiledoni (pomodoro, peperone, tabacco, cotone, fagiolo, cetriolo), che alle monocotiledoni (mais e riso). Ad esempio il ceppo T-39 di *T. harzianum*, principio attivo del prodotto commerciale Tricodex<sup>TM</sup>, induce resistenza nei confronti di *Botrytis cinerea* in piante di pomodoro, tabacco, lattuga, peperone e fagiolo, con una riduzione dei sintomi dal 25 al 100% (De Meyer *et al.*, 1998).

*Trichoderma* provoca inoltre un incremento nella produzione di enzimi vegetali correlati alla difesa tra cui varie perossidasi, chitinasi,  $\beta$ -1,3-glucanasi, nonché l'attivazione del pathway delle lipossigenasi e delle liasi idroperosside (Harman *et al.*, 2004a; Howel *et al.*, 2000; Yedidia e Chet, 1999). In tal modo *Trichoderma* è in grado non solo di produrre composti tossici ad azione diretta nei confronti dei patogeni, ma è anche in grado di stimolare fortemente le piante a produrre i propri metaboliti di difesa.

**Tabella 2.** Resistenza indotta in pianta da *Trichoderma* spp. (Harman *et al.*, 2004a).

Specie e ceppo	Pianta	Patogeni	Evidenze o effetti	Efficacia
<i>T. virens</i> G-6, G-6-5 e G-11	Cotone	<i>Rhizoctonia solani</i>	Protezione delle piante; induzione di fitoalessine terpenoidi fungitossiche	78% riduzione della malattia; induzione di fitoalessine richieste per la massima attività di biocontrollo
<i>T. harzianum</i> T-39	Fagiolo	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Protezione delle foglie quando T-39 è presente sulle radici	42% riduzione dell'area delle lesioni; numero ridotto di lesioni diffuse
<i>T. harzianum</i> T-39	Fagiolo, Tabacco, Lattuga, Pomodoro, Peperone	<i>B. cinerea</i>	Protezione delle foglie quando T-39 è presente sulle radici	25-100% riduzione dei sintomi
<i>T. asperellum</i> T-203	Cetriolo	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Protezione delle foglie quando T-203 è presente sulle radici; produzione di composti antifungini sulle foglie	Fino all'80% di riduzione della malattia sulle foglie; riduzione (100 volte) del livello di cellule batteriche del patogeno nelle foglie
<i>T. harzianum</i> T-22	Pomodoro	<i>Alternaria solani</i>	Protezione delle foglie quando T-22 è presente sulle radici	Fino all'80% di riduzione dei sintomi delle infezioni in campo
<i>T. harzianum</i> T-22	Mais	<i>Colletotrichum graminicola</i>	Protezione delle foglie quando T-22 è presente sulle radici	44% di riduzione delle lesioni sulle foglie ferite; nessun segno della malattia sulle foglie non trattate
<i>Trichoderma</i> GT3-2	Cetriolo	<i>Colletotrichum orbiculare</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Protezione delle foglie quando <i>Trichoderma</i> è presente sulle radici; induzione della lignificazione e generazione di superossidi	59% e 52% protezione della malattia causata da <i>C. orbiculare</i> e <i>P. syringae</i> , rispettivamente
<i>T. harzianum</i>	Peperone	<i>Phytophthora capsici</i>	Protezione dei fusti quando <i>Trichoderma</i> è presente sulle radici; aumento della produzione della fitoalessina capsidiolo	40% di riduzione della dimensione delle lesioni

Forse una delle caratteristiche più interessanti è che *Trichoderma* è in grado di colonizzare la pianta, ma non risulta patogeno dal momento che limita la colonizzazione alle cellule superficiali delle radici impedendo la crescita o la penetrazione di altri patogeni (Elad *et al.*, 1999; Elad e Kapat, 1999; Yedidia *et al.*, 1999). Perciò, nonostante *Trichoderma* abbia una capacità intrinseca di attaccare le piante, è solitamente avirulento, avendo sviluppato una relazione con le piante di tipo simbiotico più che parassitico (Harman *et al.*, 2004a).

Simili interazioni benefiche possono essere osservate anche nel caso di altri microrganismi, tra cui alcuni ceppi avirulenti di patogeni come *Fusarium*, *Pythium* e *Rhizoctonia* (Harman *et al.*, 2004a).

Gli apparati radicali della maggior parte delle piante sono infettati da funghi capaci di interagire beneficamente con la pianta ospite e con i quali formano associazioni benefiche definite micorrize (Pozo e Azcón-Aguilar, 2007). Una micorriza è un'associazione simbiotica (intima) e mutualistica (reciprocamente benefica) tra un fungo non patogeno o debolmente patogeno e le cellule vive della radice di una pianta, principalmente le cellule corticali ed epidermiche (Agrios, 1998). I funghi ricevono dalla pianta nutrienti organici, mentre migliorano la capacità della radice di assorbire minerali e acqua.

I maggiori effetti benefici per la pianta ospite sono:

- la promozione della crescita vegetale ed una migliore tolleranza agli stress idrici;
- la maggiore mobilizzazione ed assorbimento di nutrienti, specialmente il fosforo;
- la disponibilità di minerali normalmente insolubili;
- la modifica dell'interazione pianta-patogeno, dal momento che viene influenzata negativamente la colonizzazione della radice da parte di patogeni terricoli come nematodi, funghi e batteri fitopatogeni. Questo benefico effetto di protezione dai patogeni terricoli può essere conseguenza dell'alterazione degli essudati radicali, o di un mascheramento dovuto alla crescita del micelio che crea una barriera fisica attorno alla radice (Linderman, 1988).

Essendo dei biotrofi obbligati, i funghi micorrizici hanno molte similarità con i patogeni biotrofici (Guimil *et al.*, 2005; Paszkowski, 2006); in particolare entrambi possiedono nella parete cellulare molecole, come chitina e glucani, i cui oligomeri fungono da elicitatori delle risposte di difesa della pianta (Harrison, 2005). Numerosi studi hanno dimostrato che nei primi stadi della formazione della simbiosi si ha un'induzione delle risposte di difesa dell'ospite (ad es. un accumulo di fitoalessine e un aumento dell'espressione di geni coinvolti nella difesa); successivamente l'espressione di tali geni ritorna costitutiva probabilmente a causa di un meccanismo di soppressione che sostiene la formazione delle micorrize (García-Garrido e Ocampo, 2002).

E' plausibile che la modulazione delle difese della pianta sia necessaria per lo sviluppo della micorriza e che il fungo reprima le risposte di difesa mediate dall'acido salicilico nell'ospite per rendere compatibili tali interazioni (Pozo e Azcón-Aguilar, 2007). Molte delle cosiddette proteine di virulenza prodotte dai patogeni reprimono le risposte di difesa della pianta (Abramovitch e Martin, 2004), ed è possibile che anche i funghi micorrizici secernano proteine con una funzione simile.

È stato dimostrato, inoltre, che la formazione delle micorrize induce nella pianta una resistenza di tipo sistemico (ISR), probabilmente attraverso un condizionamento anticipato dell'ospite, definito "priming", che attiva i tessuti rendendoli più pronti a rispondere all'attacco di un patogeno (Pozo e Azcón-Aguilar, 2007). Difatti, la colonizzazione delle radici da parte dei funghi micorrizici è in grado di proteggere le piante di pomodoro dall'infezione di *Phytophthora parasitica* (Pozo *et al.*, 2002) e di favorire l'accumulo delle fitoalessine riscitina e solavetivone in piantine di patata infette da *Rhizoctonia* (Yao *et al.*, 2003).

I numerosi effetti benefici che le micorrize hanno sulle piante coltivate hanno reso questi funghi importanti anche dal punto di vista agronomico e commerciale. Il contributo alla formazione e stabilità della struttura del suolo da parte della componente microbica della rizosfera (in particolare batteri e funghi saprofiti/micorrizici) è stato frequentemente dimostrato (Miller e Jastrow, 2000). Le particelle del suolo sono tenute insieme in aggregati formando macropori. Le ife di alcuni funghi terricoli possono penetrare nel suolo molto più intensamente che non le radici delle piante, dato che il loro diametro è inferiore a quello dei peli radicali. I funghi, quindi, accedono ad un volume maggiore di spazi interstiziali, conferendo una maggiore stabilità agli aggregati del suolo e aumentando fino a cinquanta volte la superficie di assorbimento della radice (Miller and Jastrow, 1990). A tale proposito, è stato più volte proposto l'utilizzo della microflora residente nella rizosfera (principalmente funghi micorrizici e rizobatteri) per contrastare i fenomeni di erosione e di smottamento superficiale, provocati tra l'altro dall'aumento dei processi di desertificazione e degradazione dei suoli, ed aumentare la stabilità del suolo rispettando l'ambiente (Requena *et al.*, 2001). Svolgendo la doppia funzione di strutturazione del suolo e di ausilio per l'alimentazione delle piante, i funghi micorrizici esercitano un'influenza diretta sullo sviluppo e la stabilità delle associazioni vegetali e degli ecosistemi, garantendo così una protezione duratura della vegetazione (van der Heijden *et al.* 1998).

Nell'ambito dei microrganismi che instaurano un'interazione benefica con la pianta troviamo i PGPR (Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria), ovvero batteri benefici, non simbiotici, che popolano la rizosfera; con questo termine vengono comunemente indicati batteri appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Serratia*, *Azospirillum* e *Bacillus*. I PGPR sono stati classificati, a seconda dell'effetto benefico che determinano nella pianta, in due gruppi: quelli coinvolti nel metabolismo dei nutrienti (biofertilizzanti e fitostimolanti) e gli agenti di biocontrollo dei patogeni vegetali (Bashan e Holguin,

1998). I PGPR ad azione biofertilizzante sono in grado di fissare l'azoto rendendolo utilizzabile dalla pianta e determinando così un aumento della crescita anche quando i quantitativi di azoto nel suolo sono scarsi. Sono anche responsabili dell'aumento della disponibilità di nutrienti nel terreno (in particolare il fosfato); molti rizobatteri e rizofunghi, infatti, solubilizzano i fosfati poco solubili mediante il rilascio di acidi organici chelanti (Vessey, 2003). I rizobatteri fitostimolanti, rappresentati principalmente dai membri dei generi *Azotobacter* e *Azospirillum*, promuovono direttamente la crescita della pianta attraverso la produzione di fitormoni (auxine, citochinine, giberelline) piuttosto che mediante l'attività di azoto-fissazione (Dobbelaere *et al.*, 1999). L'attività di biocontrollo mostrata da alcuni PGPR nei confronti dei patogeni terricoli è dovuta a meccanismi di antagonismo microbico, che comporta una riduzione della crescita saprofitica dei patogeni e quindi della frequenza dell'infezione, di competizione per i nutrienti, colonizzazione degli spazi vitali, stimolazione della resistenza sistemica (ISR) nella pianta ospite e/o produzione di metaboliti antifungini. I rizobatteri agenti di biocontrollo meglio caratterizzati appartengono al genere *Pseudomonas*, la maggior parte dei quali produce metaboliti tossici, tra cui fenazine, pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinolo (DAPG), pioluteorina e lipopeptidi ciclici (Haas e Keel, 2003). Il sinergismo tra l'azione dei lipodepsipetidi di *P. syringae* pv. *syringae* e gli enzimi litici (CWDEs) del fungo antagonista *Trichoderma atroviride* ceppo P1 può giocare un ruolo chiave nel meccanismo di antagonismo del rizobatterio, supportando l'ipotesi che un controllo più efficace delle malattie si ottiene dalla combinazione di più agenti di biocontrollo (Fogliano *et al.*, 2002; Woo *et al.*, 2002).

L'interazione simbiotica che si instaura tra le radici delle leguminose e alcuni rizobatteri e che porta alla formazione di noduli radicali all'interno dei quali avviene la fissazione dell'azoto atmosferico in ammonio è un ulteriore esempio di interazione benefica tra pianta e microrganismi (Postgate, 1998; Leigh, 2002). I batteri responsabili di questo processo appartengono ai generi *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, e *Azorhizobium*, ma vengono comunemente chiamati Rizobi. Le specie di Rizobi infettano e formano noduli solo su ospiti specifici. Questo complicato processo sembra coinvolgere alcune molecole di riconoscimento prodotte dalla pianta ospite, chiamate lectine, e la connessione del batterio con i siti specifici dei peli radicali. Una volta completato il processo di formazione del nodulo, vengono prodotte delle proteine specifiche dell'ospite, come la leghemoglobina e la nodulina (Lee *et al.*, 1995;

Oldroyd e Long, 2003). Dal momento che condividono lo stesso microhabitat all'interfaccia tra suolo e radice, è naturale che Rizobi e PGPR interagiscano durante i loro processi di colonizzazione delle radici. Numerosi studi, difatti, hanno confermato l'effetto positivo della cooperazione tra i due gruppi microbici, dimostrando che alcuni PGPR possono facilitare il processo di nodulazione e migliorare l'azoto-fissazione nelle radici delle leguminose (Lucas-Garcia *et al.*, 2004; Polonenko *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1996).

Nell'ambito dei batteri impiegati quali agenti di biocontrollo, ha trovato larga applicazione un ceppo modificato di *Agrobacterium radiobacter* K84 non patogeno, come strumento di controllo del tumore del colletto provocato da *Agrobacterium tumefaciens*. Il ceppo K84 non patogeno produce un antibiotico altamente specifico, l'agrocina 84, tossico per *A. tumefaciens*. Dal momento però che i geni per la sintesi dell'antibiotico hanno localizzazione plasmidica ed esiste il rischio di un trasferimento accidentale del plasmide da *A. radiobacter* al corrispettivo agente patogeno con conseguente sviluppo di ceppi patogeni resistenti all'agrocina 84, è stato prodotto il mutante delecto K1026 (Jones *et al.*, 1998). La delezione consente ad *A. radiobacter* di mantenere l'attività di biocontrollo sia sui ceppi suscettibili all'agrocina 84 che a quelli resistenti; ciò indica che la produzione dell'agrocina 84 non è l'unico meccanismo di biocontrollo utilizzato. Altri fattori possono giocare un ruolo importante nel processo di biocontrollo mediato dall'*Agrobacterium*, come la produzione di altri antibiotici (agrocina 434 o ALS 84) e l'abilità a sopravvivere e persistere sulle radici (McClure *et al.*, 1998; Peñalver *et al.*, 1994), anche se più che uccidere direttamente il patogeno, sembra che il batterio prevenga lo sviluppo della malattia (Peñalver e Lopez, 1999).

Tra i microrganismi che popolano la rizosfera ricoprono un ruolo importante anche i decompositori, principalmente funghi o batteri in grado di metabolizzare e degradare residui vegetali contribuendo pertanto al riciclo dei nutrienti. Alcuni funghi decompositori sono in grado di metabolizzare anche composti vegetali molto resistenti, come le emicellulose e la cellulosa (Alexander, 1971). Nutrendosi di sostanza organica morta o in decomposizione (sono perciò anche detti saprofiti), i microrganismi decompositori sono fondamentali nelle catene alimentari degli ecosistemi in quanto contribuiscono a decomporre le sostanze organiche in elementi inorganici o comunque meno complessi (acqua, sali minerali, anidride carbonica) partecipando alla formazione dell'humus.

### **1.1.3. Interazione tra microrganismi antagonisti e patogeni: il caso**

#### ***Trichoderma***

L'interesse nell'utilizzo di microrganismi antagonisti per il controllo di patogeni vegetali (controllo biologico o biocontrollo) è aumentato negli ultimi anni in seguito al crescente allarme dei consumatori per la presenza di residui chimici nei cibi, ad un maggior interesse per le problematiche di salvaguardia ambientale e allo sviluppo nelle popolazioni dei patogeni della resistenza ai pesticidi impiegati nell'agricoltura convenzionale. Tuttavia per realizzare un efficace biocontrollo è necessario conoscere e comprendere i meccanismi alla base delle interazioni che avvengono nel suolo ed in particolare nella rizosfera.

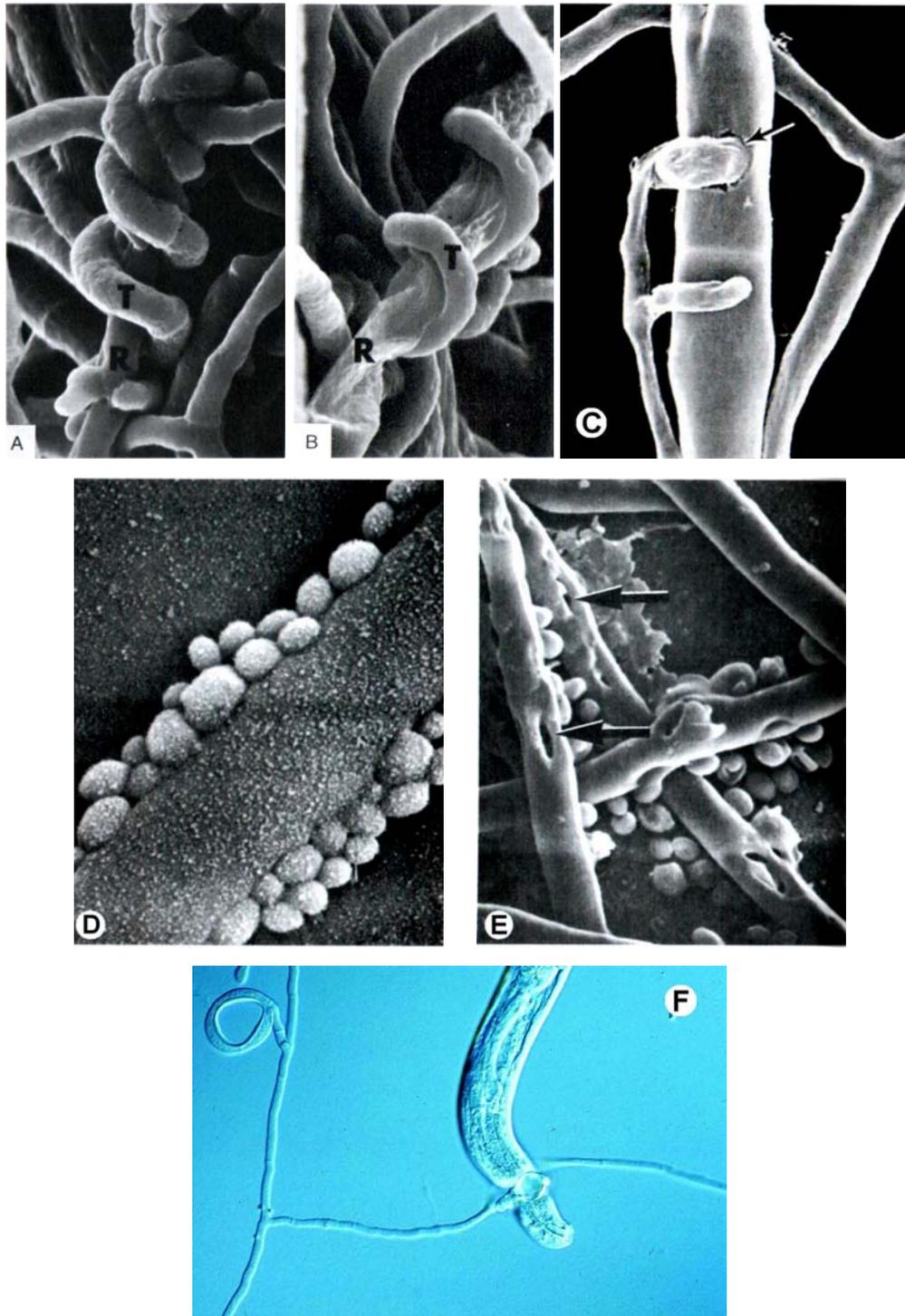
In natura esistono molti microrganismi capaci di controllare, totalmente o parzialmente, la popolazione di un patogeno. Ci sono infatti molti habitat nei quali una malattia risulta del tutto assente o appena manifesta a causa dell'impossibilità del patogeno di espletare la sua virulenza o di espletarla in maniera ridotta (in questo caso il suolo è chiamato soppressivo). Questo fenomeno è dovuto sia alle caratteristiche chimico-fisiche del terreno che alla presenza di microrganismi in grado di esercitare un'azione antagonista nei confronti del patogeno. Tra questi ricordiamo funghi appartenenti ai generi *Trichoderma*, *Penicillium*, *Sporidesmium*, batteri appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Streptomyces* (Whipps, 1997).

I meccanismi fondamentali grazie ai quali i microrganismi antagonisti svolgono la loro azione di contenimento della popolazione patogena includono: i) inibizione del patogeno attraverso la produzione di composti antimicrobici (antibiosi); ii) competizione per il ferro mediante la produzione di siderofori; iii) competizione per i siti di infezione e per i nutrienti forniti dai semi e dalle radici; induzione dei meccanismi di difesa della pianta; iv) inattivazione dei fattori di germinazione del patogeno presenti sui semi o negli essudati radicali; v) degradazione dei fattori di patogenicità come le tossine prodotte dal patogeno; vi) parassitismo, con eventuale produzione di enzimi esocellulari (come chitinasi e  $\beta$ -1,3 glucanasi), che degradano le pareti cellulari del patogeno (Whipps, 1997). Nessuno di questi meccanismi è necessariamente esclusivo, anzi accade frequentemente che un singolo microrganismo antagonista possa adoperare contemporaneamente diversi meccanismi di azione per controllare svariate fitopatie.

Il parassitismo è una forma di interazione di tipo nutrizionale e quindi parassitaria che si instaura tra l'antagonista ed il patogeno. L'antagonista stabilisce un'intima associazione

con il patogeno, da cui preleva parte o tutti i suoi nutrienti (Fig. 2). Questo meccanismo prevede normalmente una fase di contatto fisico con l'ospite che assomiglia per molti aspetti alla tipica interazione pianta-patogeno (Elad, 1995). L'interazione specifica tra antagonista e patogeno fungino è detta micoparassitismo e comporta generalmente la lisi delle pareti cellulari del patogeno mediante la secrezione di enzimi degradativi (CWDEs), che agiscono talora in combinazione con antibiotici e altre sostanze tossiche prodotte dall'agente di biocontrollo.

La competizione può instaurarsi per lo spazio o per le sostanze nutritive necessarie al patogeno per l'attacco parassitario o per il suo sviluppo. In particolare, per diverse specie vegetali è stata osservata una riduzione della colonizzazione delle radici da parte di *Fusarium oxysporum* in presenza di ceppi non patogeni della stessa specie (Schneider, 1984; Mandeel e Baker, 1991; Eparvier e Alabouvette, 1994). Tra gli esempi più noti di competizione per le sostanze nutritive vi è la competizione per il ferro in suoli dove il pH è inferiore a 7, operata soprattutto da batteri del genere *Pseudomonas* che hanno sviluppato sistemi di assimilazione del ferro altamente efficaci. In tal modo, l'antagonista, sequestrando il ferro e rendendolo indisponibile per gli altri microrganismi, riesce ad escludere il patogeno dalla nicchia ecologica abituale, esponendolo quindi a stress ambientali e nutrizionali e/o interrompendone il ciclo riproduttivo (Duijff *et al.*, 1991).



**Figura 2.** Immagini al microscopio elettronico di alcuni esempi di micoparassitismo. **(A)** Effetto della parassitizzazione di *Trichoderma harzianum* (T) su *Rhizoctonia solani* (R) dopo 2 giorni e **(B)** dopo 6 giorni; **(C)** ifa di una specie non patogena di *Pythium* che penetra un'ifa di *Phytophthora*; **(D)** il lievito *Pichia guilliermondi* su un'ifa di *Botrytis* e **(E)** su un'ifa di *Penicillium*; **(F)** il fungo *Arthrobotrys dactyloides* mentre intrappola un nematode (foto da Agrios, 1998).

Funghi e batteri antagonisti possono produrre anche una grande varietà di composti antibiotici, come la gliovirina e la gliotossina prodotte da diversi ceppi di *T. virens* (Bisset, 1991), che hanno un importante ruolo nel controllo di *Pythium* (Wilhite *et al.*, 1994); la chetomina prodotta dal genere *Chaetomium* e attiva nei confronti di *Venturia inaequalis*, agente causale della ticchiolatura del melo (Davis *et al.*, 1992); o gli antibiotici zwittermicina A e kanosamina prodotti da *Bacillus cereus*, che inibiscono lo sviluppo di Oomiceti attraverso la deformazione dei tubetti germinativi (Silo-Suh *et al.*, 1994). Vanno anche ricordate le *Pseudomonas* fluorescenti, batteri in grado di produrre le fenazine (i primi antibiotici a risultare chiaramente implicati nel biocontrollo) e che utilizzano dei sensori ambientali (basati ad esempio sulla concentrazione di un autoinduttore) per determinare la densità della popolazione nella rizosfera e regolare la produzione di antibiotici (Pierson *et al.*, 1994).

Tra i più interessanti funghi ad azione antagonista troviamo quelli appartenenti al genere *Trichoderma*. Si tratta di funghi filamentosi terricoli, a rapida crescita, con conidi unicellulari di colore verde ed ife ramificate con cellule polinucleate (Rifai, 1996). Questo genere racchiude un'elevata gamma di biotipi che si estende dai colonizzatori del suolo, con alto potenziale di biodegradazione, ai simbionti vegetali che colonizzano la rizosfera provocando un incremento sia nello sviluppo ipogeo che epigeo della pianta (Harman e Kubicek, 1998). In particolare, la capacità di sfruttare una grande varietà di sorgenti nutritive e di resistere/degradare numerosi composti tossici, insieme all'abbondante produzione di conidi e all'adattabilità a diverse condizioni ambientali, conferiscono a questo genere una elevata competitività rispetto alla restante microflora del terreno e ne fanno una presenza ubiquitaria nei suoli di tutte le principali aree geografiche (Harman *et al.*, 2004b; Monte, 2001).

Numerose specie di *Trichoderma* sono utilizzate in agricoltura e nell'industria: gli isolati di *T. reesei* sono ampiamente utilizzati per la produzione di proteine, mentre altri ceppi di biocontrollo vengono impiegati comunemente come biopesticidi, biofertilizzanti e biostimolanti su diverse specie di piante (Harman e Kubicek, 1998). Questo è reso possibile grazie all'elevato quantitativo di propagoli del fungo che possono essere prodotti velocemente e a costi relativamente contenuti, per poi essere inseriti in appositi formulati (sia liquidi che in polvere) che possono essere conservati per mesi senza vedere ridotta la loro efficacia. Al momento oltre 50 diversi prodotti a base di *Trichoderma* sono presenti sul mercato mondiale, e vengono impiegati per

proteggere ed aumentare la produttività di numerose colture orto-frutticole ed ornamentali (Tab. 3).

**Tabella 3.** Esempi di formulati commerciali a base di *Trichoderma*.

<b>Prodotto</b>	<b>Ingrediente attivo</b>	<b>Patogeno bersaglio</b>	<b>Coltura protetta</b>
<b>Binab T™ (Svezia)</b>	<i>T. harzianum</i> (ATCC 20476), <i>T. polysporum</i> (ATCC 20475)	Batteri e funghi	Alberi da frutta, ornamentali, graminacee
<b>Bio-Fungus™</b>	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Pythium sp.</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Phytophthora</i>	Ananas, ciliegio, specie a fiore, ornamentali, alberi da fusto
<b>Antagon™ (Belgio)</b>	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Pythium sp.</i> , <i>Rhizoctonia Solanii</i>	Culture ortive
<b>Harzian 20™ (Francia)</b>	<i>T. harzianum</i> (NPP TH 20)	<i>Armillaria</i> , <i>Pythium sp.</i> , <i>Sclerotinia</i> <i>sp.</i>	Alberi da frutta, vite, orchidee
<b>PlantShield™ RootShield™ (USA)</b>	<i>T. harzianum</i> T- 22 <i>T. harzianum</i> <i>Rifai</i>	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Pythium sp.</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Thielaviopsis</i> , <i>Myrothecium</i> , <i>Cylindrocladium</i> , <i>Botrytis</i>	Cavolo, cetriolo, pomodoro, ornamentali, alberi
<b>Promote™ Promot Plus™ (Canada)</b>	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Pythium sp.</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	Culture in serra
<b>Root Pro™ (Israele)</b>	<i>T. harzianum</i>	<i>Athelia rolfsii</i> , <i>Fusarium</i> <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> <i>Sclerotinia</i> , <i>Thanatephorus</i>	Culture ortive
<b>T-22™ (USA)</b>	<i>T. harzianum</i> T- 22	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Pythium sp.</i> , <i>Rhizoctonia sp.</i> , <i>Sclerotinia</i>	Ornamentali, ortive, culture floricole
<b>Tri 002/003™ (Olanda)</b>	<i>T. harzianum</i>	Vari batteri e funghi	Rosa, begonia, rododendro, pomodoro, crisantemo, cetriolo
<b>Trichodex™ (Israele)</b>	<i>T. harzianum</i> T- 39	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Monilia laxa</i> <i>Collectotrichum</i> , <i>Fulvia fulva</i> , <i>Plasmopara viticola</i> , <i>Pseudoperonospora</i>	cetriolo, uva, soia, fragole, nettarine, pomodoro, girasole
<b>Trichodowels™ (Nuova Zelanda)</b>	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>Armillaria sp.</i> , <i>Phytophthora</i> <i>Chondrostereum purpureum</i>	Drupacee, pomacee, vite
<b>Trichobject™ (Nuova Zelanda)</b>	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>Armillaria</i> , <i>Botryosphaeria</i> <i>Chondrostereum purpureum</i>	Kiwi, susino, vite ornamentali
<b>Trichopel™ (Nuova Zelanda)</b>	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>Fusarium oxisporum</i> , <i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i> , <i>Pythium</i>	Ortive, ornamentali, culture sotto serra
<b>Trichoseal™ (Nuova Zelanda)</b>	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>Botryosphaeria sp.</i> <i>Chondrostereum</i> <i>purpureum</i>	Frutticole, ornamentali vite, orchidee
<b>Trisan™ (Tailandia)</b>	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>Fusarium oxisporum</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Thanatephorus</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i>	Culture sotto serra, ornamentali culture, ortive
<b>TurfShield™ (USA)</b>	<i>T. harzianum</i> T- 22	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Pythium sp.</i> , <i>Rhizoctonia sp.</i> , <i>Sclerotinia</i>	Graminacee, prati (campi da golf)

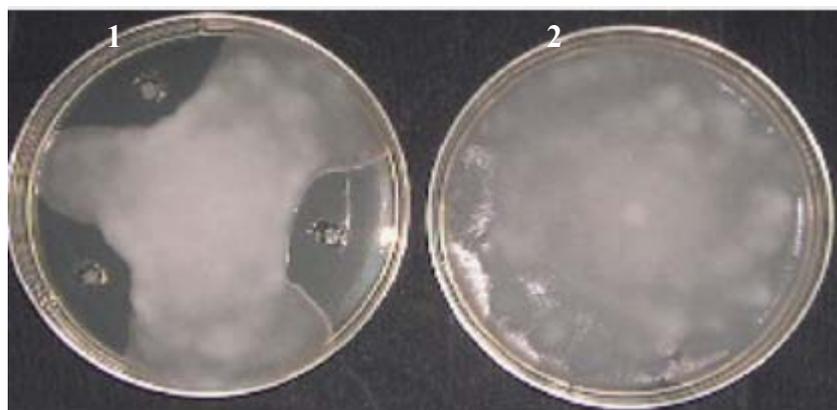
Alcuni biotipi sono capaci di contrastare i funghi fitopatogeni mediante la competizione per le sostanze nutritive e/o lo spazio, l'antibiosi e/o il micoparassitismo. Oltre alle

suddette forme di antagonismo, nuovi meccanismi sono stati trovati in alcune specie e ceppi di *Trichoderma* quali: l'inattivazione degli enzimi del patogeno, la detossificazione di sostanze antibiotiche o composti antimicrobici prodotti e rilasciati dal fungo ospite e/o dalla microflora del suolo, o in maniera indiretta la stimolazione dei meccanismi di difesa della pianta ospite (Benítez *et al.*, 2004; Elad, 2003; Harman *et al.*, 2004a).

Diversi ceppi di *Trichoderma* agiscono anche come competitori dei funghi patogeni nella loro fase saprofitica, specialmente quando i nutrienti sono il fattore limitante (Simon e Sivasithamparam, 1989). Essi competono per gli essudati di semi che stimolano la germinazione dei propagoli di funghi patogeni nel suolo e più in generale competono con i microrganismi del suolo per i nutrienti e/o lo spazio.

La competizione riguarda anche una più veloce colonizzazione delle ferite, evitando quindi l'infezione, come accade per il patogeno *Chondrostereum purpureum* (Corke, 1974). Inoltre *Trichoderma* spp. sono in grado di inibire o degradare pectinasi o altri enzimi essenziali per i funghi patogeni vegetali quali *B. cinerea* per penetrare la superficie delle foglie (Simon e Sivasithamparam, 1989). Sono stati anche isolati ceppi in grado di promuovere l'attività di batteri non patogeni (Vrany *et al.*, 1990) e di funghi micorrizici, simbionti obbligati delle piante, i quali inizialmente sopprimono la resistenza della pianta durante il processo di infezione (Guenoune *et al.*, 2001) e questi, una volta che si sono stabiliti sulle radici della pianta bersaglio, ne inducono una resistenza sistemica (Pozo *et al.*, 2002, Pozo e Azcón-Aguilar, 2007).

Diverse specie e ceppi del genere *Trichoderma* producono numerosi metaboliti tossici noti per la loro attività antibiotica, tra cui il 6-pentil- $\alpha$ -pirone, l'harzianolide, la gliovirina, la gliotossina, la viridina, la tricodermina (Papavizas, 1985), ma anche terpeni, derivati isocianidici e famiglie complesse di peptaboli (Sivasithamparam e Ghisalberti, 1998; Reino *et al.*, 2007). La produzione di antibiotici è stata spesso correlata con la capacità di biocontrollo, e l'applicazione di antibiotici purificati si è dimostrata efficace nel controllo dei patogeni al pari dell'utilizzo del corrispondente microrganismo (Fig. 3; Vinale *et al.*, 2008). Oltre ad avere attività microbica diretta, le molecole dotate di attività antibiotica prodotte da *Trichoderma* agiscono in sinergismo con altri fattori (CWDEs), contribuendo a realizzare il processo di biocontrollo nel suo complesso (Schirmböck *et al.*, 1994; Lorito *et al.*, 1996a, b; Fogliano *et al.*, 2002; Woo *et al.*, 2002).



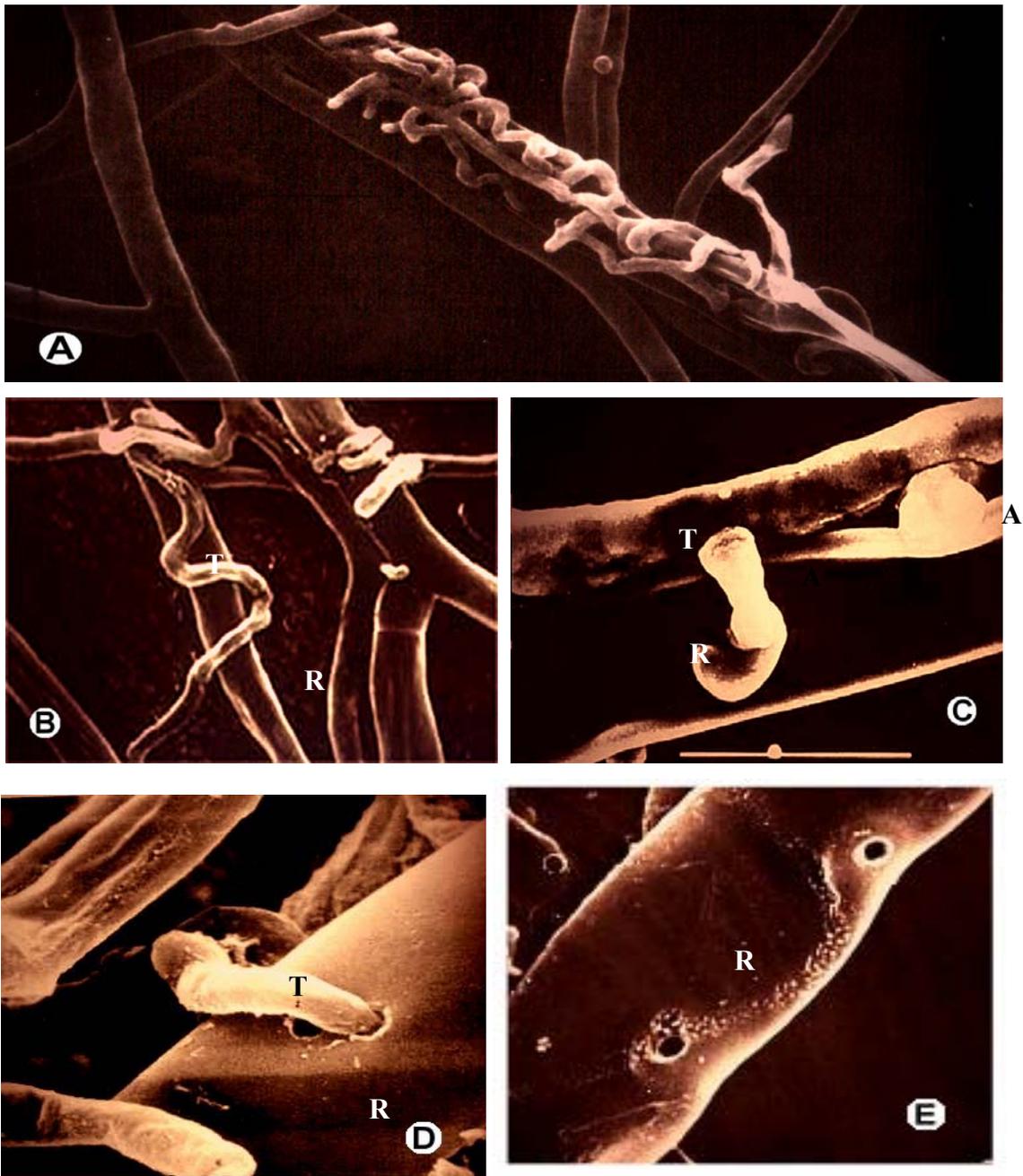
**Figura 3.** Inibizione della crescita di *Pythium ultimum* da parte dell'antibiotico 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone (6PP) di *T. harzianum*. 1: mezzo di coltura contenente il 6PP; 2: mezzo non contenente il 6PP (controllo). Foto da Vinale *et al.*, 2008.

È stato inoltre dimostrato che *Trichoderma* spp. sono molto resistenti a una varietà di tossine e composti xenobiotici, incluso antibiotici prodotti da altri microrganismi, composti antimicrobici di origine vegetale e fungicidi di sintesi (Harman *et al.*, 2004b). Infatti alcuni ceppi di *Trichoderma* hanno sviluppato dei meccanismi in grado di inattivare gli enzimi del patogeno e di detossificare sostanze antibiotiche, o composti antimicrobici, prodotti e rilasciati dal fungo ospite e/o dalla microflora del suolo. La base molecolare di questo meccanismo di resistenza è stata parzialmente delucidata con la recente scoperta che l'espressione di trasportatori ABC (ATP binding cassette) di *Trichoderma* è indotta dalla presenza di funghi fitopatogeni o dai loro metaboliti (Lanzuise *et al.*, 2002).

In generale, il micoparassitismo sembra giocare un ruolo chiave nell'attività antagonista di *Trichoderma* (Fig. 4). Il complesso processo micoparassitico consiste nel riconoscimento dell'ospite-bersaglio, nell'attacco e nella successiva penetrazione ed uccisione di esso. Durante questa serie di eventi *Trichoderma* secerne un ricco cocktail di CWDEs capaci di idrolizzare la parete cellulare di vari ospiti (Kubicek *et al.*, 2001; Howell, 2003; Woo *et al.*, 2006). Importanti componenti del sistema multienzimatico di *Trichoderma* spp. sono le chitinasi (de la Cruz *et al.*, 1992), le  $\beta$ -1,3-glucanasi (de la Cruz *et al.*, 1995b; Lorito *et al.*, 1994; Noronha e Ulhoa, 1996), le  $\beta$ -1,6-glucanasi (de la Cruz *et al.*, 1995a; de la Cruz e Llobell, 1999), le  $\alpha$ -1,3-glucanasi (Ait-Lahsen *et al.*,

2001) e diverse proteasi (Geremia *et al.*, 1993; Suarez, 2001). Alcuni enzimi litici possono essere prodotti sia nei processi di antagonismo che di saprofitismo fornendo ai ceppi che hanno entrambe le attività un vantaggio in termini di efficienza di colonizzazione di differenti nicchie ecologiche del terreno. In particolare, è stato attribuito un ruolo chiave nel micoparassitismo alle chitinasi (Woo *et al.*, 1999) ed alle glucanasi (Benitez *et al.*, 1998). Ad ogni modo, anche le proteasi fungine potrebbero essere coinvolte in maniera significativa nel processo di degradazione della parete cellulare del fungo ospite, dal momento che la parete cellulare fungina contiene polimeri di chitina e glucani immersi e legati covalentemente ad una matrice proteica (Kapteyn *et al.*, 1996).

Il potenziale antimicrobico di *Trichoderma* è la base per le applicazioni di diversi ceppi di questo fungo come alternativa al controllo chimico contro un'ampia varietà di funghi fitopatogeni (Chet, 1987; Harman e Bjorkman, 1998). Chiaramente l'uso degli organismi antagonisti nella lotta contro le malattie delle piante dipende anche dalla possibilità di poterli includere in formulazioni commerciali utilizzabili in agricoltura. Negli Stati Uniti, ad esempio, sono disponibili, oltre a preparazioni a base di *T. harzianum* e *T. virens*, usate principalmente contro patogeni terricoli, anche formulati a base di spore di *Bacillus subtilis*, impiegati per trattamenti ai semi di cotone, arachide, mais, e diversi legumi. In Italia i prodotti a base di microorganismi utilizzabili nella lotta biologica contro i parassiti sono attualmente 12 (fonte: Istituto sperimentale per la patologia vegetale, Roma; [www.ispave.it](http://www.ispave.it)), come riportato in tabella 4. Tuttavia, nonostante l'elevato numero di brevetti per biopesticidi, il numero di formulati commerciali non ha raggiunto i livelli attesi; negli Stati Uniti ciò è dovuto in parte allo scarso interesse riscontrato dalle grandi aziende nello sviluppo e nella registrazione di tali prodotti, mentre in Europa il problema principale è rappresentato, oltre che dai costi, dalla lentezza della burocrazia che impiega svariati anni per approvare l'utilizzo di un prodotto (Montesinos, 2003).



**Figura 4.** Immagini al microscopio elettronico di eventi di micoparassitizzazione messi in atto da *Trichoderma harzianum* (T) ai danni di *Rhizoctonia solani* (R). (A) e (B): tipica reazione di avvolgimento (coiling) con strutture ad uncino sviluppate attorno all'ifa dell'ospite; (C): particolare di strutture simili ad appressori (A) nell'interazione *Trichoderma*-patogeno; (D): perforazione dell'ifa di *R. solani*; (E): evidenza di fori su un'ifa di *R. solani* dalla quale *Trichoderma* è stato rimosso (foto da Elad *et al.*, 1983).

**Tabella 4.** Prodotti fitosanitari a base di microrganismi utilizzabili in Italia ai sensi del Reg. CEE n.2092/91.

<b>Microrganismo</b>	<b>Pianta trattata</b>	<b>Classificazione / Patogeno controllato</b>	<b>Formulato (Numero registrazione)</b>	<b>Compatibilità con altri fitofarmaci</b>
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	fragola, vite, pomodoro, melanzana, peperone, melanzana, cetriolo, zucchino, melone, cocomero, etc.	Controlla varie specie di oidi	AQ 10 WG (11786)	compatibile con bioinsetticidi come <i>B. thuringensis</i> e <i>T. harzianum</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	melo, pero, vite	<i>Botrytis cinerea</i> (su vite), <i>Venturia</i> spp. ed <i>Erwinia amylovora</i> (su pomacee)	SERENADE WP (12628)	miscelabile con altri fungicidi
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Ortive, cereali, floreali, ornamentali, etc.	Insetticida ad ampio spettro	Sono registrati oltre 50 formulati a base di <i>B. thuringensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> , ssp. <i>tenebrionis</i> e ssp. <i>aizawai</i>	miscela con numerosi acaricidi, insetticidi, fungicidi e coadiuvanti
<i>Beauveria bassiana</i>	Culture orto-frutticole	Micoinsetticida attivo contro tripidi, ditteri tripetidi, alcune specie di afidi, tingidi, cicaline, etc.	BOTANIGARD 22 WP (11700) BOTANIGARD SE (11701) BOVERAL OF (11578) NATURALIS (10479)	è compatibile con altri insetticidi e fertilizzanti
<i>Coniothyrium minitans</i>	colture orticole, floricole, frutticole suscettibili all'attacco di <i>Sclerotinia</i> spp.	<i>Sclerotinia</i> spp.	CONTANS WG (11252)	evitare miscele con tutti i prodotti che possono reagire con la sostanza organica
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	va inoculato al terreno. Può essere utilizzato su tutte le colture	nematodi fitoparassiti del genere <i>Meloidogyne</i> spp.	BIOACT WG (13016)	non miscibile con altri fungicidi
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	semente di cereali	Fungicida utilizzato per il controllo di Elmintosporiosi, Carie, Carboni, Septoriosi, etc.	CEDOMON (12678)	il prodotto si impiega da solo.
<i>Sireptomycetes griseoviridis</i>	pomodoro, peperone, melanzana, cetriolo, melone, zucca, cocomero, basilico, ciclamino, gerbera, garofano	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Pyrenocheta lycopersici</i> , <i>Phytophthora capsici</i>	MYCOSTOP (10506)	sconsigliata la distribuzione congiunta con fungicidi o fertilizzanti concentrati
<i>Trichoderma harzianum</i>	vite, drupacee, actinidia, fragola, pomodoro, peperone, melanzana, melone, cetriolo, zucchino, cocomero, lattughe e simili	attivo su <i>Armillaria mellea</i> , <i>Cylindrocladium</i> spp., <i>Myrothecium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Thielaviopsis</i> spp., <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Verticillium dahliae</i>	RADIX (13593) REMEDIER (13158) ROOTSCHILD GRANULES (12379) TRIANUM G (12378) VENDINA (13221)	è preferibile usare il prodotto da solo
<i>Trichoderma viride</i>	pomodoro, peperone, lattuga, radicchio, rucola, melone, finocchio, carciofo, sedano, fagiolo, fagiolino, zucchino, melanzana, cetriolo, floricole e ornamentali in vaso	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i> spp., insieme a <i>T. harzianum</i> anche <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Thielaviopsis basicola</i> , <i>Phytophthora capsici</i>	RADIX (13593) REMEDIER (13158)	è preferibile usare il prodotto da solo
Virus della Granulosa di <i>Adoxophyes orana</i> (AoGV)	melo, pero, cotogno, albicocco, ciliegio, susino, ribes nero, ribes rosso, forestali (betulacee)	Insetticida usato per il controllo della Capua ( <i>Adoxophyes orana</i> )	CAPEX (12341)	non compatibile con i formulati a base di rame e con i prodotti fitosanitari ad effetto repellente nei confronti di <i>Adoxophyes orana</i>
Virus della Granulosa di <i>Cydia Pomonella</i> (CpGV)	noce, melo, pero, cotogno, nashy, albicocco, ciliegio, susino, ribes, forestali (betulacee)	Insetticida usato per il controllo di <i>Cydia pomonella</i>	CARPOSTOP (12368) CARPOVIRUSINE (10952) MADEX (10327) VIRGO (12113)	evitare di miscelare con antiparassitari o fertilizzanti a reazione alcalina, prodotti a base di rame e zolfo

## **1.2. Biotecnologie applicate allo studio delle interazioni pianta-microrganismi**

Con l'introduzione e lo sviluppo delle moderne tecniche di biologia molecolare oggi si è in grado di studiare in dettaglio le interazioni tra pianta e microrganismi, analizzandone i meccanismi e i fattori molecolari coinvolti. Ad esempio è possibile introdurre e far esprimere nelle cellule vegetali DNA esogeno in grado di conferire, tra l'altro, resistenza ai patogeni. Svariate sono le strategie messe a punto per il trasferimento del DNA nelle cellule, così come molti sono i sistemi utilizzati per selezionare i trasformanti, regolare il livello di espressione del transgene, nonché consentirne una rapida identificazione grazie ai cosiddetti geni "reporter".

La difesa delle piante dalle malattie richiede lo sviluppo di nuovi strumenti di lotta da impiegare in strategie alternative all'utilizzo di prodotti chimici che comportano un elevato rischio per l'ambiente e per la salute dei consumatori. Le biotecnologie possono contribuire in questo senso consentendo la formulazione di nuovi biopesticidi a base di microrganismi antagonisti, di piante transgeniche resistenti, di kit immunologici e molecolari per la diagnosi delle malattie o per il monitoraggio dei patogeni nell'ambiente (Lorito *et al.*, 2004).

L'impiego di microrganismi antagonisti nella difesa delle piante da patogeni ed erbe infestanti è iniziato circa 50 anni fa e a tutt'oggi annovera numerosi prodotti a base di funghi o batteri impiegati come biofitofarmaci (Fravel, 2005). Questi prodotti possono consistere in un singolo microrganismo o nella combinazione di più agenti antagonisti con diverse modalità di azione.

Numerosi isolati batterici e fungini hanno dato ottimi risultati in laboratorio o anche *in vivo* quando adoperati in condizioni ambientali controllate; tuttavia pochi fra questi hanno mostrato un'attività di biocontrollo sufficiente quando impiegati nelle normali condizioni di campo. Il problema è spesso dovuto alla bassa sopravvivenza dei microrganismi antagonisti nell'ambiente, o ad una concentrazione troppo elevata richiesta per esercitare l'attività di biocontrollo. Nella pratica, infatti, l'efficacia di un biofitofarmaco è fortemente dipendente dalla dose d'impiego, al pari dei pesticidi di sintesi (Montesinos e Bonaterra, 1996). Questo introduce un nuovo problema che deve essere risolto a livello biotecnologico durante lo sviluppo di un nuovo formulato: lo sviluppo di opportune metodiche di progettazione e fermentazione industriale, nonché la

formulazione del prodotto commerciale più idonea ad essere immessa sul mercato (Fravel, 2005). Un'ulteriore difficoltà è data dal potenziale rischio tossicologico e di impatto ambientale che l'introduzione del biopesticida potrebbe causare nella catena alimentare o nell'ambiente. Prima di raggiungere lo sviluppo commerciale, un ceppo antagonista quindi deve soddisfare criteri di sicurezza riguardanti l'assenza di tossicità e l'incapacità di produrre effetti collaterali indesiderati, deve adattarsi facilmente all'ambiente e mostrare una certa persistenza in campo (Lorito *et al.*, 2004). A causa di queste numerose restrizioni, solo un numero limitato di prodotti raggiunge alla fine il mercato (Montesinos *et al.*, 2002).

Una nuova generazione di prodotti chimici, ottenuti mediante sintesi chimica o biotecnologica, è basata sull'impiego di molecole che non presentano attività antimicrobica *in vitro*, ma che invece elicitano le risposte di difesa della pianta nei confronti dei patogeni. Diversi composti di questo tipo sono attualmente già commercializzati in alcuni paesi e includono derivati dell'acido acetilsalicilico come il benzotiadiazolo (BTH; Agrawal *et al.*, 1999). Un altro esempio interessante è dato dalla registrazione e commercializzazione delle proteine codificate dai geni *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) di batteri fitopatogeni, utilizzati per la difesa delle colture e come promotori della crescita. Queste proteine stimolano in pianta diverse risposte allo stress e la loro applicazione ha esercitato numerosi effetti benefici (Wei *et al.*, 1992).

Negli ultimi 20 anni differenti strategie molecolari sono state utilizzate per l'ottenimento di piante transgeniche resistenti a stress di varia natura. La resistenza delle piante alle malattie può essere aumentata mediante l'espressione transgenica di geni codificanti per composti ad attività antifungina. Il concetto di "resistenza geneticamente acquisita" è oggi ampiamente applicato in una varietà di strategie che si basano sull'espressione in pianta di geni di varia origine (Lorito e Scala, 1999).

La lotta contro gli insetti è condotta essenzialmente utilizzando transgeni codificanti proteine con proprietà insetticide; mentre contro i virus la maggior parte delle strategie sono volte ad interferire con i processi infettivi e replicativi del patogeno inserendo nella pianta porzioni del genoma virale. Più complessa è l'induzione di resistenza transgenica verso funghi e batteri dove si cerca di produrre piante resistenti attraverso l'espressione di geni coinvolti nell'interazione pianta-patogeno.

Batteri e funghi rappresentano oggi una ricca sorgenti di geni potenzialmente utili per aumentare la resistenza a malattie causate da diversi microrganismi, virus ed insetti.

Le principali linee di ricerca hanno finora riguardato:

- l'aumento della risposta di difesa della pianta attraverso il potenziamento dell'arsenale antimicrobico che essa già possiede oppure fornendo ad essa nuove armi di difesa che contribuiscano ad ostacolare l'attacco del patogeno. Tale scopo si può raggiungere attraverso l'uso di promotori costitutivi o inducibili per controllare la sintesi di prodotti genici coinvolti nella difesa o attraverso l'inserimento in pianta di geni di resistenza eterologhi isolati da altre piante o microrganismi (tabella 5).
- l'alterazione dell'interazione molecolare e dei segnali di riconoscimento pianta-patogeno per ampliare il range di patogeni riconoscibili dalla pianta. Ciò si realizza inserendo in pianta geni codificanti per fattori di avirulenza o per prodotti genici coinvolti nel riconoscimento del patogeno, ovvero inducendo i normali meccanismi di difesa localizzata o sistemica (tabella 6);
- il conferimento alla pianta della capacità di sintetizzare enzimi o tossine in grado di inattivare i composti fitotossici prodotti dal patogeno o l'aumento della tolleranza della pianta verso di essi (tabella 6).

Per lo sviluppo di nuove biotecnologie è importante la conoscenza del sistema biologico da alterare. È possibile agire sia sulla trasmissione dei segnali indotta da infezione patogena che sui geni coinvolti nel meccanismo di interazione pianta-patogeno. Un nuovo approccio è rappresentato dall'uso dei geni di resistenza per il controllo di malattie, aumentando sia il numero di recettori nelle piante o introducendo nuovi recettori in modo che la pianta abbia una maggiore capacità di percepire il patogeno. Tra i vantaggi legati all'uso dei geni di resistenza troviamo che sono ereditabili e permanenti nella pianta transgenica; la resistenza può essere espressa quando e dove necessaria ed è meno alterata da fattori quali il tipo di suolo, il clima, la rotazione delle colture, gli agenti di biocontrollo. La metodica inoltre è semplice e sicura anche dal punto di vista ambientale e non richiede l'applicazione di agenti chimici o di biocontrollo. Tuttavia la comparsa di razze virulente del patogeno in grado di superare la resistenza è un fenomeno tutt'altro che raro e tra gli altri svantaggi troviamo che i geni di resistenza sono difficili da introdurre in piante refrattarie all'incrocio, possono

essere analizzati solo attraverso inoculazione con l'appropriata razza del patogeno e richiedono un lungo lavoro di reincrocio per ristabilire i caratteri desiderati.

Per evitare la comparsa di nuove razze virulente si cerca di introdurre in pianta più geni di resistenza contemporaneamente. Inoltre, oggi è possibile la costruzione di geni di resistenza chimerici o sintetici che codificano per nuove specificità di riconoscimento.

Molte proteine antifungine ed antibatteriche sono efficaci su diversi patogeni e funzionano sinergicamente o in combinazione anche con altri composti biologicamente attivi, quali gli antibiotici (Lorito *et al.*, 1996b).

**Tabella 5.** Geni microbici espressi in pianta che aumentano le risposte di difesa a patogeni (Lorito e Scala, 1999).

Gene codificante	Origine	Attività/Effetto	Pianta
<b>Chitinasi(chiA)</b>	<i>Serratia marcescens</i>	Chitinasi antifungina. Resistenza a <i>Alternaria longipes</i> e <i>Rhizoctonia solani</i>	Tabacco
<b>Chitinasi(chiI)</b>	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Chitinasi coinvolta nell'autolisi. Resistenza a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Botrytis cinerea</i>	Tabacco
<b>Chitosanasi</b>	<i>Streptomyces</i> sp.	Chitosanasi antifungina	Tabacco
<b>Endochitinasi (chit42)</b>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Chitinasi antifungina. Resistenza a <i>A. alternata</i> , <i>A. solani</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>R. solani</i>	Tabacco, patata, mela, petunia, uva
<b>Glucosio-ossidase</b>	<i>Aspergillus niger</i>	Generazione ROS e HR. Resistenza a <i>Erwinia carotovora</i> e <i>Phytophthora infestans</i> . Resistenza ad ampio spettro verso funghi e batteri.	Patata
<b>Ribonucleasi batterica con promotore inducibile (prpI-1)</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Ribonucleasi localizzata nel sito di infezione. Riduzione della sporulazione di <i>P. infestans</i>	Patata
<b>Ribonucleasi (pac1)</b>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Degradazione dei dsRNA. Resistenza a virus.	Tabacco
<b>Trichodiene Sintasi (Tri5)</b>	<i>Fusarium sporotrichoides</i>	Produzione di fitoalessina sesquiterpenoide. Resistenza a microbi e insetti.	Tabacco
<b>Tossina killer</b>	<i>Ustilago maydis</i>	Tossicità verso specie simili a <i>Ustilago</i> . Resistenza a <i>U. maydis</i>	Tabacco
<b>Tossina del colera, subunità A</b>	<i>Vibrio cholerae</i>	Antibatterico. Resistenza a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Tabacco
<b>Tossina B.t.</b>	<i>B. thuringensis</i>	Insetticida ad ampio spettro.	Mais, patata, cotone, pomodoro, riso, <i>Arabidopsis</i> , etc.

**Tabella 6.** Geni microbici espressi in pianta che attivano le risposte di difesa della pianta o proteggono dalle tossine dei patogeni (Lorito e Scala, 1999).

Gene codificante	Origine	Attività/Effetto	Pianta
<b>Avirulenza (avr9,inf1)</b>	<i>Cladosporium fulvum</i> , <i>P. infestans</i>	Elicita HR. Resistenza a PVX	Tabacco, pomodoro
<b>Avirulenza (avrPto)</b>	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Elicita risposte di difesa. Resistenza a batteri e virus.	Pomodoro
<b>Virulenza (Ecp2)</b>	<i>C. fulvum</i>	Elicita HR, resistenza a <i>C. fulvum</i> .	Pomodoro
<b>β-cryptogeina</b>	<i>P. cryptogea</i>	Elicita le risposte di difesa. Resistenza a largo spettro	Patata, tabacco
<b>Pompa protonica di opsina batterica</b>	<i>Halobacterium halobium</i>	Attiva SAR e LAR. Resistenza a virus, <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> e <i>P. infestans</i>	Tabacco e patata
<b>Pectato liase (PL3)</b>	<i>E. carotovora</i>	Attiva le risposte di difesa producendo elicitori da tessuti di pianta. Resistenza a <i>E. carotovora</i>	Patata
<b>Oligogalatturonide liase</b>	<i>E. carotovora</i>	Degrada oligomeri zuccherini in derivati inattivi. Interferisce con il signalling e inibisce la patogenicità nell'interazione patata/ <i>E. carotovora</i>	Patata
<b>Resistenza alla tabtossina</b>	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Inattivazione tabtossina. Resistenza a <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Tabacco
<b>Ornitina carbamoiltransferase (argK)</b>	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Resistenza alla faseolotossina batterica. Inibizione formazione sintomi.	Fagiolo, tabacco

Il sistema di difesa attivato dalle piante contro i patogeni può essere alterato per produrre costitutivamente alti livelli di composti antimicrobici. Sebbene sia stato identificato un numero consistente di geni codificanti per tali proteine, non ne sono stati saggiati molti in piante transgeniche per migliorare la resistenza alle malattie. I geni codificanti per le chitinasi sono stati quelli più usati per migliorare la difesa delle piante nei confronti dei patogeni fungini (Harman e Kubicek, 1998). Tali enzimi sono in grado di degradare i residui dell'omopolimero lineare di  $\beta$ -1,4-N-acetyl-D-glucosammina, che rappresenta un componente essenziale della parete cellulare della maggior parte dei funghi fitopatogeni, e mostrano *in vitro* una forte attività inibitoria della germinazione e della crescita ifale (Lorito, 1997).

Sono stati isolati da diverse specie vegetali vari geni codificanti chitinasi e sono stati trasferiti da una specie all'altra, di solito sotto il controllo di promotori costitutivi (Broglie *et al.*, 1991; Neuhaus *et al.*, 1991; Punja e Raharjo, 1996). Ad esempio, carote transgeniche esprimenti una chitinasi di tabacco hanno mostrato una maggiore resistenza a diversi patogeni fungini, ma non si è riscontrato alcun aumento di resistenza quando è stata usata una chitinasi di petunia (Punja e Raharjo, 1996).

La trasformazione di piante con chitinasi di origine vegetale non ha portato ad adeguati livelli di resistenza; probabilmente ciò è dovuto al fatto che le chitinasi vegetali hanno una debole attività antifungina, degradano solo l'apice ifale e sono inibitori di un limitato numero di specie patogene.

L'espressione di chitinasi o glucanasi fungine in pianta sembra aver superato con successo i limiti delle chitinasi vegetali, sia in termini di livello che di spettro di resistenza ai funghi patogeni (Terakawa *et al.*, 1997; Lorito *et al.*, 1998). Questi geni producono enzimi dotati di forte attività inibitoria nei confronti di numerosi funghi fitopatogeni e possono essere combinati sinergicamente con vari composti, ottenendo miscele altamente efficaci. Lorito *et al.* (1998) hanno espresso costitutivamente in tabacco e patata, un gene codificante per l'endochitinasi *chit42* del fungo di biocontrollo *T. harzianum*. Il gene *chit42* utilizzato da *T. harzianum* per attaccare e parassitizzare una varietà di funghi fitopatogeni (Schirmböck *et al.*, 1994; Lorito, 1998; Lorito e Woo, 1998; Woo *et al.*, 1999) codifica per uno dei più potenti enzimi chitinolitici, capace di degradare rapidamente qualsiasi struttura fungina contenente chitina (clamidospore, ife mature e sclerozi, ecc..) e inibisce una grande varietà di funghi *in vitro* (Lorito *et al.*, 1993). Sono stati ottenuti alti livelli di espressione del gene fungino in differenti tessuti

vegetali senza alcun effetto visibile sulla crescita e sullo sviluppo delle piante. Le linee transgeniche selezionate hanno mostrato un'attività chitinolitica fino a quattrocento volte maggiore delle linee controllo e quasi completa resistenza nei confronti di patogeni fogliari *Alternaria alternata*, *A. solani* e *B. cinerea* e di patogeni terricoli *Rhizoctonia solani* e *S. sclerotiorum* (Lorito *et al.*, 1998).

A seguito di questo studio, sono stati trasferiti diversi geni di *T. harzianum* in varie specie coltivate, tra cui melo, petunia, pisello, fagiolo, frumento, pomodoro, erba medica, uva, ecc., e, in particolare, sono stati ottenuti risultati positivi in melo nei confronti di *Venturia inequalis*, e in riso nei confronti di *R. solani* (Bolar *et al.*, 1997).

Sono stati usati anche altri geni codificanti per composti antimicrobici per ingegnerizzare piante di tabacco e patata e renderle più resistenti a stress biotici. È stato espresso in patata un gene isolato da *Aspergillus niger* codificante per una glucosio-ossidasi (Wu *et al.*, 1995) al fine di incrementare il livello di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nei tuberi e nelle foglie transgeniche a seguito dell'infezione batterica. La progenie transgenica ha mostrato una resistenza migliorata nei confronti di *Erwinia amilovora* subsp. *carotovora* sia in condizioni aerobiche che anaerobiche. Le linee transgeniche erano anche meno suscettibili all'attacco di *P. infestans*, indicando che l'espressione transgenica di enzimi microbici, capaci di generare specie reattive dell'ossigeno, può conferire resistenza ad un'ampia gamma di malattie fungine e batteriche.

Un'altra applicazione biotecnologica è basata sull'impiego di geni di virulenza e di resistenza per indurre la morte programmata delle cellule nel sito di infezione o per attivare una condizione di resistenza sistemica acquisita in pianta (Jones, 2001; Staskawicz, 2001). Sulla base del modello del doppio sensore proposto da de Wit (1992), sono state trasferite in pianta coppie di geni *Avr/R* con promotori inducibili attivati da elicitori non specifici prodotti da diversi patogeni vegetali. A seguito dell'interazione fra i prodotti dei geni *Avr* ed *R* si avrà l'attivazione di una risposta ipersensibile, e quindi, della resistenza. Il sistema può essere applicato nei confronti di un gran numero di patogeni (di fatto tutti quelli che attivano il promotore) ed è stato accertato che questa strategia funziona in tabacco esattamente come in pomodoro.

Altra strategia è quella di trasformare le piante con geni i cui prodotti inibiscono fattori di virulenza (ad esempio tossine) dei patogeni. Un risultato positivo è stato ottenuto con piante di tabacco e fagiolo divenute più resistenti a *P. syringae* mediante il trasferimento di geni i cui prodotti inattivano la tabtossina prodotta dal patogeno o

rendevano la pianta insensibile alla tossina (Anzai *et al.*, 1989; De la Fuente-Martinez *et al.*, 1992).

Oltre che per incrementare la resistenza delle piante alle malattie, numerosi lavori di ingegneria genetica sono stati condotti per esprimere in pianta geni che conferissero maggiore resistenza a fattori ambientali, come la temperatura, la concentrazione salina, gli inquinanti, i pesticidi chimici, o per trasferire caratteristiche agronomiche interessanti (forma, colore o consistenza dei frutti, etc.), per incrementare la produzione di metaboliti secondari o di antigeni microbici nel tentativo di realizzare l'immunizzazione di uomini ed animali sfruttando gli alimenti (Lorito e Scala, 1999).

I risultati finora ottenuti dimostrano quindi come le biotecnologie rappresentino un settore in rapida espansione ed evoluzione, e prevedano uno studio approfondito dei meccanismi molecolari che sono alla base dell'interazione pianta-altri organismi, finalizzato alla produzione di nuove conoscenze utili in campo medico, agricolo e industriale.

### **1.3. Tecniche utilizzate per lo studio delle interazioni pianta-microrganismi**

Alcune delle tecniche molecolari utilizzate per lo studio delle interazioni pianta-microrganismi si basano sull'analisi degli acidi nucleici e delle proteine (comparazione degli acidi nucleici, comparazione delle proteine, ibridazione, sequenziamento). Molti geni vengono espressi differenzialmente durante l'interazione pianta-patogeno-antagonista.

Per l'identificazione dei geni microbici, che codificano per fattori di patogenicità o virulenza, e dei geni di resistenza della pianta è possibile utilizzare due approcci:

- Approccio diretto: si parte dalla conoscenza del prodotto genico potenzialmente coinvolto nella patogenicità o resistenza, per poi studiare l'effetto di una modifica del relativo gene.

Ad esempio *Botrytis cinerea* secreta numerose endopoligalatturonidasi potenzialmente coinvolte nella patogenicità. È stato clonato un gene (Bcpg1) codificante per una endopoligalatturonidasi utilizzando una sonda eterologa da *Aspergillus*, e si è dimostrato che questo gene è espresso durante l'infezione di pomodoro. Il gene è stato interrotto tramite "partial gene replacement" e i mutanti sono stati saggiati per

patogenicità e virulenza su foglie di pomodoro e su mele. Questi risultavano ancora patogenici, ma davano infezioni secondarie (es. crescita su lesioni già presenti) significativamente ridotte rispetto al ceppo selvaggio, dimostrando che il gene Bcpg1 non è necessario per la patogenicità ma lo è per una piena virulenza (ten Have *et al.*, 1998).

- Approccio indiretto: consiste nell'analisi del profilo di espressione comparando, tramite tecniche differenziali e sottrattive, i profili di espressione genica per individuare i geni potenzialmente coinvolti nell'interazione, i fattori di patogenicità/virulenza e i geni di resistenza, e clonando i geni specificamente espressi.

Una recente variazione è il sequenziamento su larga scala di EST's (expresses sequense tags) da librerie indotte dalla presenza di una o due componenti dell'interazione, l'uso di chips o microarray specialmente nel caso in cui il genoma di una specie vegetale o microbica sia stato totalmente sequenziato. Importante è vedere se i geni indotti dall'interazione siano di fatti espressi specificatamente in risposta ad una delle componenti di interazione.

È possibile utilizzare mutanti difettivi o distrutti e super-espressi o sotto-espressi per stabilire definitivamente se un gene è importante per la tolleranza ad un patogeno o per la patogenicità. Questo approccio utilizza variazioni naturali o indotte in organismi modello e la successiva applicazione dei mutanti (più o meno resistenti/patogenici) come strumento per identificare i geni modificati dalla mutazione.

Ad esempio per determinare il ruolo delle tossine prodotte da *Alternaria alternata* durante l'interazione compatibile con mela (tossina AM), pera (tossina AK) e pomodoro (tossina AAL) sono stati ottenuti mutanti difettivi per la produzione di queste tossine. La tecnica utilizzata prevede la formazione di integrazioni ectopiche a seguito di trasformazioni con DNA plasmidico, e l'ottimizzazione del protocollo REMI (restriction enzymr-nimediated integration) per ottenere una libreria di trasformanti "plasmid-tagged" da saggiare per la produzione di tossine. Il metodo REMI permetteva non solo di aumentare la frequenza di integrazione, ma di favorire l'inserimento del DNA plasmidico come singola copia per ogni sito di ricombinazione. Sono stati così ottenuti mutanti difettivi nella produzione di tossina AAL, che non causavano malattia su varietà di pomodoro normalmente suscettibili, indicando che questa tossina è un fattore di patogenicità necessario per *A. alternata*.

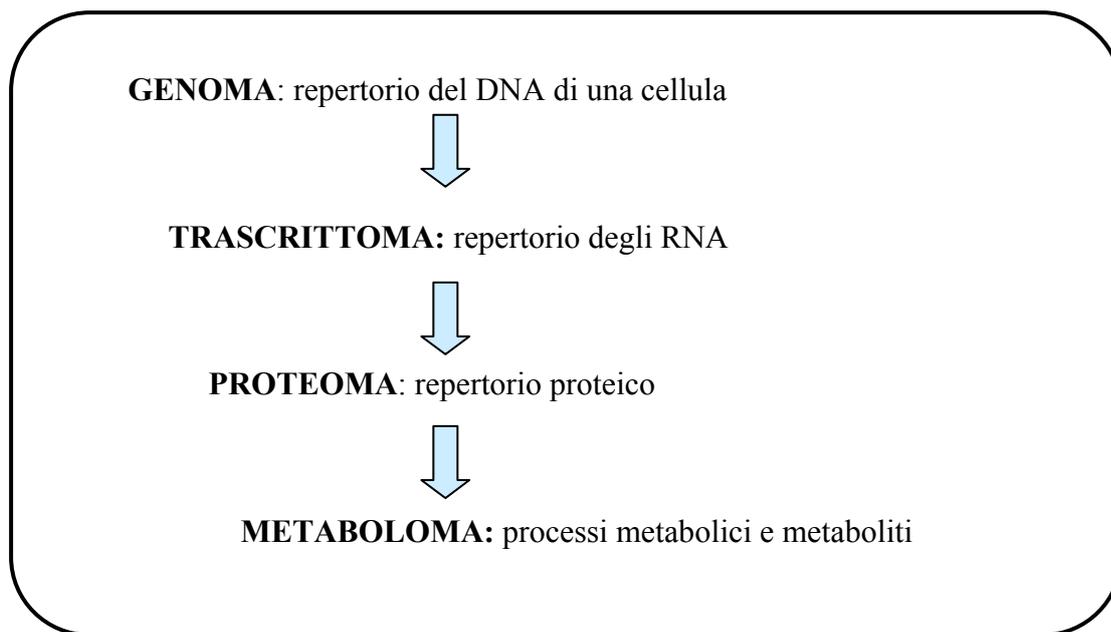
Con la tecnica del “differential- display RT-PCR” è stata studiata l’interazione tra *B. cinerea* e pomodoro. Dall’analisi comparativa dei profili ottenuti includendo come controllo sia i prodotti di amplificazione del patogeno e della pianta da soli, sia quelli relativi all’interazione di pomodoro con altri patogeni (*Phytophthora* e TNV), sono stati individuati tre frammenti amplificati in maniera differenziale che rappresentano i geni di *Botrytis* espressi in pianta durante l’attacco, e quattro cDNA prodotti dalla pianta in risposta al fungo (Benito *et al.*, 1996).

È possibile effettuare anche analisi biochimiche partendo dalla conoscenza di un particolare enzima o via metabolica importanti per la resistenza o per la patogenicità.

Contemporaneamente a ricerche in campo genetico, pochi studi di tipo proteomico sono stati realizzati sull’interazione pianta-microrganismi. Nella maggior parte dei casi, tuttavia, si è trattato di ricerche su proteine specifiche precedentemente isolate.

D’altra parte per una corretta comprensione dei meccanismi alla base dei processi vitali, è fondamentale la caratterizzazione della funzione espletata da ogni singolo gene e lo studio dei meccanismi che ne regolano l’espressione. La sequenza nucleotidica di ciascun gene o, semplicemente, quella di un Open Reading Frame (ORF) non dà, infatti, nessuna indicazione sulla funzione ad essa associata. La misura del rispettivo RNA messaggero (mRNA) può fornire qualche informazione in più, poiché la concentrazione cellulare di diverse specie di mRNA riflette il grado di attività dei geni corrispondenti; tale parametro, tuttavia, non è correlato necessariamente alla concentrazione finale delle proteine tradotte (Aebersold *et al.*, 1987).

Tali considerazioni hanno portato alla necessità di guardare al quadro completo delle proteine prodotte da una cellula o da un organismo in determinate condizioni ambientali, studiando quali sequenze siano realmente espresse e quale sia la struttura finale delle rispettive catene polipeptidiche sintetizzate (incluse modificazioni post-traduzionali). Si è entrati, quindi, nella cosiddetta “era Post-Genomica”, nella quale l’obiettivo scientifico non risulta più lo studio del genoma di un organismo, bensì quello del suo PROTEOMA, termine che sta proprio ad indicare l’insieme delle PROTEINE espresse da un corrispondente genOMA (Fig. 5).



**Figura 5.** Rappresentazione schematica delle connessioni tra funzioni e componenti dei sistemi metabolici.

### ***1.3.1. Analisi proteomica delle interazioni pianta-microrganismi***

La proteomica può essere definita come l'analisi sistematica del proteoma, che rappresenta il complemento proteico del genoma (Pandey e Mann, 2000; Patterson e Aebersold, 2003; Phizicky *et al.*, 2003). Questa tecnologia rappresenta uno strumento essenziale per la comprensione della funzione dei geni e per definire un quadro molecolare completo del funzionamento di una cellula, ora che numerosi studi sono stati intrapresi e completati per determinare la sequenza dell'intero patrimonio genetico di una grande varietà di organismi viventi. Questo insieme allo sviluppo delle moderne tecniche per la caratterizzazione delle proteine ha fatto sì che la proteomica diventasse un settore trainante della genomica funzionale.

Lo studio del proteoma risulta, in genere, più complesso di quello del genoma. La natura conservativa del DNA, infatti, consente un'analisi sistematica di un oggetto di studio per sua natura statico. L'analisi del proteoma invece prevede l'osservazione dinamica della modulazione della sintesi proteica, secondo le condizioni ambientali in cui la cellula o tessuto viene a trovarsi. Vanno poi considerate le modifiche post-traduzionali che subiscono le catene polipeptidiche sintetizzate che ne condizionano, a volte, le proprietà funzionali. In pratica, si osserva dove e quando un gene viene tradotto a seconda delle condizioni o del ciclo vitale della cellula.

La proteomica si basa sull'impiego di tecnologie di analisi diverse: biochimiche, genetiche, informatiche ecc., che consentono di studiare simultaneamente migliaia di proteine e che, nel loro insieme, permetteranno in futuro di catalogare, decifrare le strutture, le interazioni e le funzioni di tutte le proteine. Accanto all' SDS-PAGE e all'elettroforesi bidimensionale (2DE) si collocano i sistemi di separazione come l'HPLC e soprattutto i metodi di caratterizzazione fine come la spettrometria di massa (MS). Vi sono poi i 'protein array' e le tecniche di sequenziamento diretto delle proteine e specifici software per l'interpretazione e il confronto di spot proteici su gel 2D o array proteici, e per l'analisi delle masse ottenute con la MS. E' possibile anche realizzare studi proteomici quantitativi con l'impiego di un reagente innovativo chiamato ICAT (isotope-coded affinity tag) nel sistema LC-MS/MS (Han *et al.*, 2001).

La proteomica sta diventando sempre più uno strumento importante nello studio delle interazioni pianta-microrganismi dal momento che consente di collegare direttamente le proteine alla loro funzione. La proteomica vegetale si è concentrata prevalentemente su specie modello, come *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*. Gli obiettivi di tali lavori spaziavano dall'analisi proteomica dei singoli organelli, tessuti, sospensioni cellulari o frazioni subcellulari, allo studio dello sviluppo della pianta e della risposta a stress di varia natura (Canovas *et al.*, 2004; Park, 2004; Rossignol *et al.*, 2006). Oltre 50 lavori pubblicati negli ultimi 3 anni hanno sfruttato l'approccio proteomico per studiare le alterazioni nei livelli proteici delle piante in risposta a stress biotici (attacchi virali, batterici, fungini, studio dei meccanismi di resistenza e signalling, risposta a erbivori e parassiti delle piante) e abiotici (aridità, salinità, caldo, eccesso di luce, carenze nutrizionali, elevati livelli di CO<sub>2</sub>, inquinanti, etc.). In maniera analoga è stata valutata, anche se in un numero inferiore di lavori, la risposta dei microrganismi all'interazione con la pianta: sono stati identificati numerosi fattori molecolari coinvolti nei meccanismi di virulenza dei patogeni (Fernández-Acero *et al.*, 2006a,b; Kazemi-Pour *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007; Smolka *et al.*, 2003), nonché centinaia di proteine associate allo sviluppo e al funzionamento di benefiche interazioni tra piante e microrganismi della rizosfera (Bestel-Corre *et al.*, 2004).

#### **1.4. Scopo della tesi**

Le basi molecolari dei sistemi complessi multicomponente che producono un effetto positivo per la salute della pianta sono per lo più sconosciuti. Inoltre l'influenza che un

agente di biocontrollo può esercitare sull'esito delle interazioni tra una pianta ed un microrganismo patogeno non è stata ancora analizzata mediante l'uso della tecnica proteomica, nonostante questa rappresenti uno strumento efficace per studiare questo tipo di processi biologici (Woo *et al.*, 2006).

L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi consiste nello studiare, mediante l'utilizzo combinato di tecniche di genomica funzionale (analisi proteomica) e di biologia vegetale e fitopatologia, le interazioni che avvengono normalmente in natura tra l'agente di biocontrollo *Trichoderma*, la pianta ospite e diversi funghi patogeni. Le informazioni così ottenute sui fattori molecolari (geni, proteine, metaboliti, ecc..) coinvolti in tali interazioni possono aiutare a realizzare nuovi strumenti per migliorare la resistenza delle piante a diversi stress biotici e abiotici, incluse importanti fitopatie, nonché a migliorare le conoscenze relative al meccanismo di controllo biologico messo in atto dai funghi antagonisti sia nei loro processi di interazione con la pianta sia con l'agente patogeno.

Pertanto, allo scopo di studiare l'interazione pianta-patogeno-antagonista, è stato realizzato un sistema di analisi proteomica che consenta il recupero dei proteomi di ciascun componente. In seguito è stata effettuata un'analisi completa dei proteomi di interazione in tutte le possibili combinazioni, utilizzando diverse specie vegetali e microbiche per ottenere informazioni sulle proteine differenziali accumulate. Sono state di fatto individuate ed analizzate le proteine differenziali potenzialmente importanti nelle interazioni tra pianta, patogeno ed agente antagonista ottenute dall'analisi dei proteomi d'interazione di ciascuna componente del sistema. E' stata effettuata un'analisi funzionale per valutare il pattern di accumulo di alcune proteine differenzialmente prodotte, individuare le omologie con proteine presenti in banca dati ed ipotizzare un ruolo, nell'eventualità che possano essere impiegate nel campo delle biotecnologie applicate alla difesa delle colture.

Dalle informazioni ottenute è stata effettuata una caratterizzazione dei geni codificanti per alcune delle proteine differenziali esaminate, mediante uno studio funzionale di espressione. I risultati ottenuti con i diversi approcci sono stati quindi confrontati e messi in relazione nel tentativo di formulare un quadro d'insieme dei fattori molecolari coinvolti in vario modo nelle interazioni complesse tra pianta, microrganismi patogeni e funghi antagonisti del genere *Trichoderma*.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1. Ceppi fungini e piante utilizzate

I funghi antagonisti usati in questo lavoro sono stati *Trichoderma harzianum* ceppo T22 (ATCC 20847), e *T. atroviride* ceppo P1 (ATCC 74058), i quali sono stati allevati su patate dextrose agar (PDA) fino ad ottenere una completa sporulazione. Le spore sono state raccolte utilizzando 10 ml di acqua distillata sterile con 0.1% Tween-20, quindi filtrate per allontanare i residui di micelio, sciacquate con acqua distillata sterile, concentrate e conservate a -20°C in una soluzione di glicerolo 20% (v/v) fino al loro utilizzo.

Gli agenti fitopatogeni utilizzati sono stati: *Botrytis cinerea* (ceppo 309, isolato da tabacco), *Rhizoctonia solani* (ceppo 1556, isolato da pomodoro) e *Pythium ultimum*, tutti allevati su PDA, tranne *Botrytis* per il quale è stato scelto il MEP (malt extract + mycological peptone).

Le piante impiegate nei saggi sono state il pomodoro (*Lycopersicon esculentum* cv. San Marzano) e il fagiolo (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Cannellino), i cui sono stati sterilizzati immergendoli per 1 minuto in una soluzione di ipoclorito 1% (v/v), quindi sono stati lavati abbondantemente con acqua sterile.

### 2.2. Crescita di *Trichoderma* in condizioni di non interazione

Per le colture liquide di *T. harzianum* ceppo T22, una sospensione di  $8 \times 10^8$  spore/ml è stata inoculata in 200 ml di patate dextrose broth (PDB) contenuti in una beuta da 300 ml. Il micelio, cresciuto a 25°C su un agitatore rotante per 72h a 120 rpm, è stato filtrato attraverso carta Whatman 3MM-CHR (Whatman, UK) e lavato con 500 ml di acqua distillata grado Milli-Q. Il micelio raccolto è stato quindi utilizzato per inoculare 300 ml di mezzo minimo (SM) in una beuta da 500ml, contenenti per litro: 680 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 870 mg  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 200 mg KCl, 200 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg  $\text{FeSO}_4$ , 2 mg  $\text{MnSO}_4$ , 2 mg  $\text{ZnSO}_4$ , con aggiunta di glicerolo 2% w/v, glucosio 1% w/v, glucosio 4% w/v, saccarosio 1% w/v, rispettivamente, come fonti di carbonio. Le beute sono state incubate a 25°C su un agitatore rotante a 120 rpm per 96h. Il micelio è stato quindi raccolto mediante filtrazione attraverso carta Whatman 3MM-CHR e conservato in aliquote da 1 g a -20°C fino al suo utilizzo.

### **2.3. Preparazione di biomassa, pareti cellulari e filtrati colturali dei patogeni**

Per ottenere la biomassa di *B. cinerea*, *R. solani* e *P. ultimum*, i funghi patogeni sono stati allevati in PDB a 28°C su un agitatore rotante a 120 rpm per 7 giorni. La coltura fungina è stata sterilizzata a 121°C per 20 minuti. Il micelio è stato filtrato attraverso carta Whatman 3MM-CHR e lavato tre volte con acqua deionizzata sterile grado Milli-Q, quindi liofilizzato e ridotto in polvere usando un pestello e un mortaio. La polvere è stata risospesa in mezzo SM ad una concentrazione finale di 10 mg/ml e sterilizzata a 121°C per 30 minuti prima dell'uso.

Le pareti cellulari dei suddetti patogeni sono state ottenute preparando un litro di 1X SM+1% saccarosio in una beuta da due litri. Il substrato è stato poi inoculato con 2 ml di una sospensione di spore del patogeno ( $2 \times 10^6$  spore/ml). La beuta è stata posta in incubazione sotto agitazione a 25°C per 7-10 giorni. Successivamente è stata raccolta la biomassa del patogeno con un filtro con pori da 0.22 µm. In un cilindro è stata misurata la quantità di biomassa e, ad essa, successivamente è stato aggiunto l'1% di SDS.

Il contenuto del cilindro è stato versato nell'omogeneizzatore Waring Blendor (New Hartford, Connecticut, U.S.A.) e centrifugato per 1 minuto alla prima velocità e poi per 5 minuti alla seconda velocità. Il contenuto dell'omogeneizzatore, successivamente, è stato versato nei tubi da 500 ml per centrifuga Sorval RC5 Plus (Newtown, U.S.A.), i quali sono stati equilibrati e centrifugati a 7000 rpm per 30 minuti.

Eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso in acqua distillata sterile ed è stato successivamente centrifugato a 7000 rpm per 30 minuti. Sono stati così effettuati diversi lavaggi con acqua deionizzata sterile per eliminare completamente l'SDS. Il pellet è stato poi raccolto in piastra, pesato, congelato e infine liofilizzato. Al momento dell'uso le pareti così ottenute sono state sterilizzate a 121°C per 20 minuti.

Per ottenere i filtrati colturali dei patogeni in esame, ciascun fungo fitopatogeno è stato cresciuto in mezzo SM + glucosio 2% a 28°C su un agitatore rotante a 120 rpm per 7 giorni e, sotto cappa a flusso laminare, è stato raccolto il filtrato colturale mediante filtrazione con carta Whatman 3MM-CHR.

## **2.4. Crescita di *Trichoderma* in condizioni di interazione con agenti fitopatogeni**

Per valutare la risposta antagonistica di *T. harzianum*, il fungo è stato allevato in un mezzo contenente biomassa, filtrato colturale o pareti cellulari dei funghi fitopatogeni (*B. cinerea*, *R. solani* e *P. ultimum*).

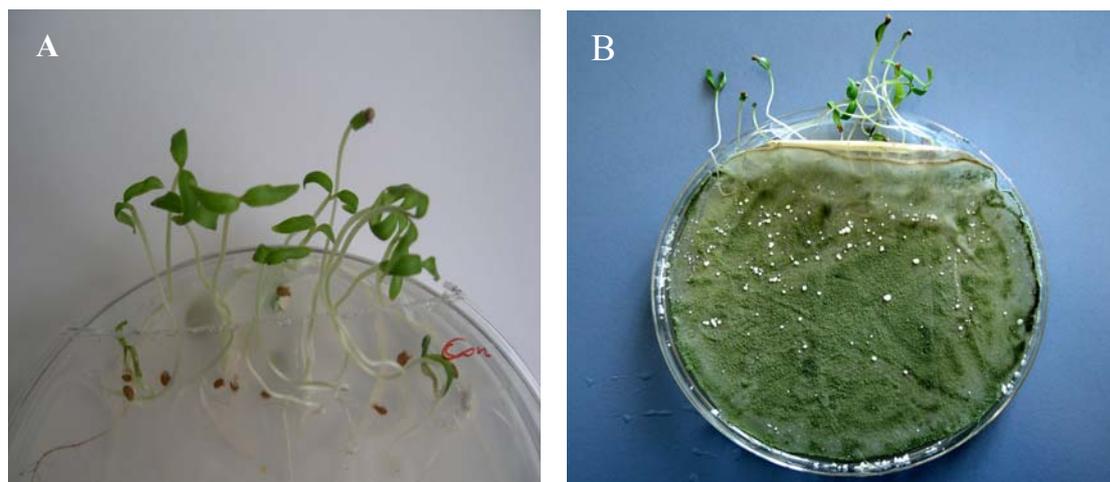
La biomassa dei patogeni è stata addizionata alla concentrazione dello 1% w/v al mezzo SM, successivamente inoculato con il micelio di *T. harzianum* (preparato come descritto nel par. 2.2). Analogamente le pareti cellulari (0,5% w/v) di ciascun fungo fitopatogeno sono state aggiunte al filtrato colturale (FC) ottenuto crescendo i funghi in SM a 28°C su un agitatore rotante a 120 rpm per 7 giorni. A tale mezzo di coltura è stato successivamente addizionato il micelio di *T. harzianum* (preparato come descritto nel par. 2.2). I campioni sono stati lasciati a 25°C su un agitatore rotante per 72h a 120 rpm, dopodiché il micelio del fungo antagonista è stato raccolto mediante filtrazione con un imbuto Buchner 0.4 µM e conservato in aliquote da 1 g a -20°C fino al suo utilizzo.

## **2.5. Allestimento del saggio di interazione su substrato agarizzato tra *Trichoderma*, piante di pomodoro e agenti fitopatogeni**

Per analizzare la risposta di biocontrollo di *T. harzianum* è stato utilizzato un saggio di interazione effettuato su piastre di water agar 1.5% (WA) di 15 cm di diametro contenenti piantine di pomodoro ivi germinate al buio e in posizione verticale. Quando le piantine hanno raggiunto una grandezza sufficiente (2-3 cm di fusto e 4-5 cm di radici distese sulla piastra) è stata creata un'intercapedine nella piastra, per consentire al fusto di fuoriuscirne (Fig. 6).

Le piantine di pomodoro germinate in piastra sono state inoculate dopo circa 15 giorni con pezzetti di micelio di differenti agenti fitopatogeni (*B. cinerea*, *R. solani* e *P. ultimum*) cresciuti precedentemente su piastre di PDA. Dopo 4 giorni è stato posto, sulle piastre Petri delle piante infette, un disco di cellofan sul quale era stato fatto crescere il micelio di *T. harzianum* ceppo T22, precedentemente trasferito da piastre di PDA. Il saggio di interazione è stato condotto a temperatura ambiente per tre giorni.

Ciascun esperimento è stato effettuato in triplicato e sono stati condotti esperimenti analoghi di controllo dove una delle componenti era assente, così da individuare eventuali differenze dovute alla presenza/assenza di ciascuna delle componenti del sistema.



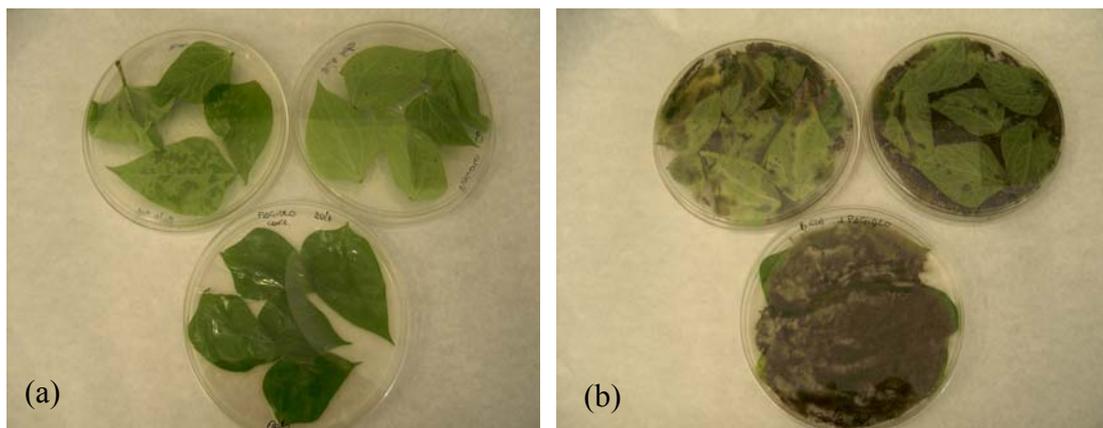
**Figura 6.** Piantine di pomodoro germinate in piastre di WA 1,5% (A), con aggiunta del micelio di *T. harzianum* ceppo T22 cresciuto su disco di cellofan in PDA (B).

## **2.6. Allestimento del saggio di interazione su substrato agarizzato tra *Trichoderma*, foglie di fagiolo ed un patogeno fogliare**

Piante di fagiolo sono state cresciute in terreno sterile per tre settimane, dopodiché le foglie sono state raccolte, lavate per tre volte con acqua deionizzata sterile e poste su piastre di WA 1,5% di 15 cm di diametro (Fig. 7).

I conidi del patogeno *Botrytis cinerea* sono stati inoculati alla concentrazione di  $5 \times 10^5$  conidi/ml su piastre di PDA, 15 cm di diametro, sopra un disco di cellofan. Dopo 4 giorni di incubazione a 25°C, il disco di cellofan contenente il micelio è stato trasferito su piastre di WA di 15 cm di diametro sopra le foglie che erano state precedentemente disposte in modo da consentire l'interazione.

*T. atroviride* ceppo P1 è stato inoculato alla concentrazione di  $5 \times 10^5$  conidi/ml su piastre di PDA, 15 cm di diametro, sopra un disco di cellofan. Dopo tre giorni di incubazione a 25°C il disco di cellofan su cui era cresciuto il micelio è stato trasferito sulle piastre di WA sopra le altre due componenti del sistema. Il saggio di interazione tri-componente e i rispettivi controlli con solo una o due componenti sono stati condotti a temperatura ambiente per tre giorni.



**Figura 7.** Foglie di fagiolo su piastre di WA 1,5% (a), con aggiunta del micelio di *T. atroviride* ceppo P1 e del patogeno *B. cinerea* cresciuti separatamente su disco di cellofan in PDA (b).

### **2.7. Allestimento del saggio di interazione su substrato agarizzato tra *Trichoderma*, radici di fagiolo ed un patogeno terricolo**

In questo saggio i semi di fagiolo sono stati fatte germinare in magenta sterili contenenti perlite, poi lasciati aperti per consentire alle piante di svilupparsi normalmente in altezza. Dopo circa tre settimane le piante cresciute (20-30 cm di altezza) sono state raccolte e le loro radici lavate più volte con acqua per rimuovere i residui di perlite. Le piante sono poi state trasferite su piastre di WA 1,5%, 15 cm di diametro, distendendo le loro radici sulla superficie del mezzo e creando un'intercapedine nelle piastre in modo tale che lo stelo potesse fuoriuscire da esse (Fig. 8).

Il patogeno terricolo *R. solani* è cresciuto su piastre di PDA a 25°C per tre giorni e poi una porzione di micelio (1-2 cm<sup>2</sup>) è stata prelevata dalla piastra e usata per inoculare una piastra di PDA, 15 cm di diametro, sopra un disco di cellofan. Dopo 5 giorni di incubazione a 25°C, il micelio ha ricoperto tutta la piastra e il cellofan su cui è cresciuto il patogeno è stato trasferito su piastre di WA 1,5%, 15 cm di diametro, al di sopra delle radici della pianta, precedentemente preparate.

*T. atroviride* ceppo P1 è stato inoculato a concentrazione di  $5 \times 10^5$  conidi/ml su piastre di PDA, 15 cm di diametro, sopra un disco di cellofan. Dopo tre giorni di incubazione a 25°C il micelio è stato trasferito sulla piastra di WA al di sopra delle altre due componenti dell'interazione (Fig. 8).

Il saggio di interazione tri-componente e i rispettivi controlli con solo una o due componenti sono stati condotti a temperatura ambiente per tre giorni.



**Figura 8.** Piante di fagiolo su piastre di WA 1,5%, con aggiunta del micelio di *T. atrovide* ceppo P1 e del patogeno *R. solani* cresciuti separatamente su disco di cellofan in PDA.

## **2.8. Estrazione delle proteine intracellulari**

Il protocollo di estrazione delle proteine intracellulari utilizzato per questo lavoro di tesi è descritto da Jacobs *et al.* (2001) e qui applicato con alcune modifiche. Un grammo di micelio fungino (peso fresco) del patogeno o dell'antagonista, o di tessuto vegetale (foglie o radici) sono stati sospesi in 10 ml di una soluzione contenente 20% acido tricloroacetico (TCA) in acetone (-20°C) e 0.2% ditiotreitolo (DTT), e macinati con un ultraturrax (T25basic, IKA Labortechnik) in un bagno di ghiaccio. I campioni sono stati posti a -20°C per almeno tre ore per consentire la completa precipitazione delle proteine. Dopo centrifugazione a 30000g a 4°C per 20 minuti, i pellet sono stato lavati per tre volte con acetone (-20°C) contenente 0.2% DTT e asciugati sotto il flusso di una cappa chimica a temperatura ambiente. I pellet sono stati risospesi in circa 2 ml di buffer di reidratazione [9 M urea, 2% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), 1% DTT, 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)], e posti su un agitatore orbitale per 2h in modo da assicurare la completa solubilizzazione delle proteine precipitate. I campioni sono stati poi centrifugati a 30000g a 20°C per 1h e il surnatante recuperato da ciascuno, contenente le proteine in sospensione, è stato conservato in aliquote a -40°C fino al suo utilizzo. Una aliquota di ciascun campione è stata usata per determinare la concentrazione delle proteine

mediante il DC protein assay kit (BIO-RAD, Richmond, CA, USA), secondo le istruzioni della casa produttrice.

## **2.9. Estrazione delle proteine esocellulari di *Trichoderma***

Per ottenere le proteine esocellulari prodotte da *T. harzianum* ceppo T22 in condizioni stimolanti le capacità antagonistiche, il fungo è stato allevato in mezzo liquido prima in PDB e poi in SM, come descritto nel par. 2.2. Nel mezzo salino le condizioni di induzione utilizzate sono state: 1) filtrato colturale (FC) di *B. cinerea*; 2) FC di *R. solani*; 3) FC di *P. ultimum*; 4) 1% w/v biomassa (BM) di *B. cinerea*; 5) 1% w/v BM di *R. solani*; 6) 1% w/v BM di *P. ultimum*; 7) saccarosio 1% w/v (controllo).

I campioni sono stati incubati a 25°C su un agitatore rotante a 120 rpm per 3 giorni, al termine dei quali il micelio è stato separato dal FC mediante filtrazione con carta Miracloth (Calbiochem, Germany). Il liquido ottenuto è stato liofilizzato ed il pellet risospeso nel minimo volume possibile di acqua distillata, quindi dializzato abbondantemente contro acqua distillata a 4°C utilizzando una membrana Spectrachom con cut-off di 3500 Da. Dopo la dialisi i campioni sono stati nuovamente liofilizzati, risospesi in circa 2 ml di buffer di reidratazione ed estratti come descritto nel paragrafo precedente per le proteine intracellulari. La concentrazione delle proteine è stata determinata mediante il DC protein assay kit (BIO-RAD).

## **2.10. Elettroforesi bidimensionale (2-DE)**

La focalizzazione isoelettrica (IEF) è stata realizzata con strisce di Immobiline “Dry Strips” (IPG, Immobilized pH Gradient, BIO-RAD) costituite da gel di poliacrilammide polimerizzato su supporto plastico, disidratato e congelato. Le strip lunghe 7 cm con intervallo lineare di pH da 3 a 10 sono state reidratate con una soluzione contenente 9 M urea, 2% CHAPS, 1% DTT, 2% amfoliti pH 3-10 e 10 mM inibitore di proteasi PMSF (SIGMA). Duecento microlitri della soluzione proteica totale (corrispondenti a 200 µg di proteine totali) sono stati caricati in un vassoio per la focalizzazione ed assorbiti nel gel della strip (1h passivamente a temperatura ambiente e 12h attivamente applicando una corrente di 50V). La IEF è stata condotta utilizzando il PROTEAN IEF Cell system (BIO-RAD) e le IPGs strip sono state focalizzate fino ad accumulare un totale di 14 kV/h utilizzando un programma di focalizzazione in 3 fasi (250V per 1h, 4 kV per 3h e poi fino a raggiungere 10 kV/h). Dopo la focalizzazione, le strip sono state equilibrate

ponendole sotto agitazione in 10 ml di una soluzione contenente 6M Urea, 0.05M Tris/HCL pH8.8, 20% glicerolo, 2% SDS, 2% DTT per 10 minuti e successivamente in 10 ml di una soluzione contenente 6M Urea, 0.05M Tris/HCL pH8.8, 20% glicerolo, 2% SDS, 2.5% iodocetammide per altri 10 minuti. Le strip così ridotte e alchilate sono state posizionate sopra un gel verticale di poliacrilammide (15%T) in un Mini-Protean 3 Cell (BIO-RAD). Poiché deve esserci continuità tra il margine del gel e quello della strip, è stato necessario creare un letto di agarosio (0,5%) prima della deposizione di quest'ultima. I gel sono stati corsi con una corrente costante di 150V per circa 75 minuti in tampone 1X tris-glicina-SDS (TGS, BIO-RAD). Lo stesso protocollo di reidratazione è stato usato per le strip lunghe 11 cm con intervallo di pH da 4 a 7. Il programma per la focalizzazione è stato: 220V per 20 minuti, 8 kV per 3.5h, 8 kV fino a raggiungere 20 kV/h, per circa 35 kV/h totali. Dopo l'equilibratura delle strip, la separazione in SDS-PAGE è stata condotta a 10°C su gel di poliacrilammide (12%T) con un sistema Protean II xi Cell (BIO-RAD) a 70V per tutta la notte. Al termine delle corse elettroforetiche, i gel sono stati lavati per 3 volte in acqua deionizzata di grado Milli-Q per 5 minuti e quindi immersi in SimplyBlue SafeStain G-250 (Invitrogen, California, USA) su un agitatore rotante. Dopo tre ore il colorante è stato rimosso e i gel sono stati decolorati in acqua deionizzata grado Milli-Q, in accordo al manuale di istruzione.

### **2.11. Analisi delle immagini**

Al termine della colorazione, l'immagine di ciascun gel è stata acquisita mediante Imaging Densitometer GS-800 (BIO-RAD) ed analizzata con il software PD-Quest (BIO-RAD). Le immagini dei gel sono state ottenute utilizzando un filtro rosso (lunghezza d'onda 595-750 nm) e una risoluzione di 36.3 x 36.3 µm per i gel piccoli (7 x 7 cm) e 63.5 x 63.5 µm per quelli grandi (12 x 12 cm). L'intensità del segnale di ciascuno spot è stata determinata in unità pixel (Densità Ottica, OD) e normalizzata rispetto alla somma delle intensità di tutti gli spot inclusi nell'immagine standard. Gli spot proteici sono stati considerati come differenziali quando si registrava nelle condizioni di interazione esaminate una variazione di intensità di almeno 2 volte rispetto a quella del relativo controllo.

Il software PD-QUEST consente di effettuare analisi sia qualitative che quantitative degli spot presenti sui gel e messi a confronto. Mediante analisi qualitativa si identificano le proteine differenzialmente espresse presenti in un gel, ma non nell'altro;

gli spot possono essere considerati “ON”, cioè presenti, o “OFF”, cioè assenti, nel campione quando paragonati al controllo. Con l’analisi quantitativa si analizzano gli spot le cui intensità relative (valutate in termini di OD) sono “aumentate” o “diminuite” di un fattore che abbiamo posto per convenzione pari a 2, in risposta alle condizioni di interazione applicate. Gli spot “inalterati” invece sono tutti quelli la cui quantità relativa non è variata significativamente rispetto al controllo.

## **2.12. Digestione degli spot su gel, spettrometria di massa ed analisi *in silico***

Gli spot proteici che dall’analisi condotta con il software PD-QUEST sono risultati più interessanti, ovvero che hanno presentato, dal confronto delle varie condizioni di interazione esaminate, i maggiori e più riproducibili cambiamenti, sia qualitativi che quantitativi sono stati tagliati dal gel 2-D con un bisturi e preparati per la digestione con tripsina effettuata con il protocollo descritto da Ha et al. (2002).

I peptidi digeriti sono stati risospesi in 10 µl di una soluzione di acido acetico 1% e mescolati in rapporto 1:1 con una matrice di una soluzione satura di acido- $\alpha$ -ciano-4-idrossinamico contenente 10 mg/ml acetonitrile (ACN) e 0.2% acido trifluoroacetico (TFA) in rapporto 70:30. Un’aliquota di 1 µl della soluzione di ciascun campione è stata caricata nei pozzetti della piastra dello spettrometro di massa Voyager-DE-Pro MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight, Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) e lasciata seccare. Lo strumento è equipaggiato di un laser con emissione pulsata a 337 nm che opera in modalità reflector su ioni positivi nell’intervallo di massa tra 890 e 3500 Da. La calibrazione delle masse è stata effettuata utilizzando come standard interni i frammenti ionici 18-39 dell’ormone adrenocorticotropico (ACTH, SIGMA) a 2465,1989 Da e l’angiotensina III umana (MP Biomedicals, Irvine, CA, U.S.A.) a 931,5154 Da.

Il confronto delle masse dei peptidi ottenuti (Peptide Mass Fingerprint, PMF) è stato effettuato all’interno del database NCBI nr (National Centre Biotechnology Information non-redundant) nell’ambito delle proteine di specie fungine e vegetali, oltre che a tutte quelle presenti in quel momento nel database. A tale scopo è stato utilizzato il programma Mascot (Matrix Science, London, UK) applicando i seguenti criteri di ricerca: 1 taglio incompleto consentito e l’alchilazione delle cisteine mediante carbamidometilazione scelta come possibile modificazione della proteina. Il programma

Mascot è in grado di confrontare i valori sperimentali determinati con quelli teorici dei peptidi ottenuti dall'idrolisi virtuale di tutte le proteine contenute nella banca dati con l'agente proteolitico impiegato. La ricerca fornisce una lista di possibili candidati e ad ogni proteina è associato un punteggio che indica la probabilità che i peptidi riscontrati nell'analisi appartengano a quella data specie. Un'analisi Mascot modificata è stata effettuata utilizzando un database di sequenze espresse EST di *Trichoderma*, costruito come descritto da Suárez *et al.* (2005) e supportato dal progetto europeo TRICHOEST (<http://www.trichoderma.org>; Rey *et al.*, 2004). Il database contiene più di 14000 cloni cDNA ottenuti da librerie di mRNA isolati da miceli di diverse specie di *Trichoderma* allevati in condizioni di simulato antagonismo/biocontrollo.

Inoltre, il programma Motif (<http://motif.genome.jp>) è stato applicato ai database Pfam e Pfam\_fs per determinare se le proteine note condividessero con gli spot proteici analizzati dei domini conservati nelle aree che corrispondevano alle sequenze dedotte dei peptidi.

Alcuni spot differenziali, infine, come quelli prodotti da *B. cinerea* nell'interazione con foglie di fagiolo e *T. atroviride* ceppo P1 o dalle foglie di fagiolo nell'interazione con *T. atroviride* ceppo P1 e *B. cinerea*, sono stati analizzati mediante analisi MALDI-TOF/TOF con un Proteomics Analyzer 4700 (Applied Biosystems), calibrato prima di ciascun esperimento. I campioni sono stati desalificati e concentrati utilizzando ZipTips C18 (Millipore, Bedford, Mass., U.S.A.), lavati con 0.1% TFA (10 µl x 2), ed eluiti con 10 µl di TFA 0,1% in una soluzione di acqua e ACN in rapporto di 1:1. I campioni, infine, sono stati caricati sulla piastra del MALDI e trattati con una soluzione satura di acido- $\alpha$ -ciano-4-idrossinnamico come descritto precedentemente. I dati ricavati dall'analisi MS/MS sono stati utilizzati per effettuare ricerche di omologie con proteine note presenti nel database NCBI Inr utilizzando il software GPS Explorer ed il programma Mascot.

## **2.13. Determinazione della sequenza proteica mediante degradazione**

### **Edman**

La degradazione di Edman automatizzata consente di determinare la sequenza N-terminale di una proteina. Una breve porzione di sequenza (10-15 amminoacidi) è un'informazione sufficiente per l'identificazione non ambigua di una specie proteica in seguito al confronto con la struttura primaria delle proteine note, presenti in banche dati

di sequenza. Tale ricerca può essere facilmente realizzata avvalendosi di alcuni programmi disponibili in rete. Il sequenziamento è stato effettuato dal centro Bioindustry Park Canadese Collereto Giacosa (To) e i risultati della sequenza ottenuta sono stati analizzati utilizzando il programma MPsrchpp e il database unipar, o in alternativa il programma Blast.

#### **2.14. Ricerca di geni codificanti ciclofilline in librerie EST di *Trichoderma* spp.**

Le librerie EST di *Trichoderma*, costruite nell'ambito del progetto europeo TRICHOEST ([www.trichoderma.com](http://www.trichoderma.com)), sono state analizzate alla ricerca di geni codificanti per ciclofilline dal momento che, essendo state ottenute facendo crescere *Trichoderma* in molteplici condizioni di interazione (ad esempio in presenza di piante e/o patogeni), possono fornire un quadro abbastanza rappresentativo dei geni potenzialmente coinvolti nelle complesse interazioni pianta-patogeno-antagonista.

La ricerca di sequenze uniche e contigs (segmenti di sequenze che se sovrapposti danno la sequenza totale originale) potenzialmente codificanti per ciclofilline è stata effettuata mediante il programma BLASTX.

#### **2.15. Amplificazione tramite PCR di frammenti codificanti per ciclofilline in *T. atroviride* e *T. harzianum***

Le reazioni polimerasiche sono state condotte in un volume totale di 50 µl utilizzando come template il DNA genomico di *T. atroviride* ceppo P1 e di *T. harzianum* ceppo T22. I primer utilizzati sono stati disegnati sulle regioni conservate di proteine note codificanti ciclofilline, in particolare della ciclofillina A di *Beauvaria bassiana* (gi|23664288) risultata omologa dello spot 6204 di *T. atroviride* ceppo P1 (Tab. 12).

Per entrambi i funghi è stata utilizzata la coppia di primer 1244FOR (GGTCGCATCAACTTCAACCT) e 1244REV (ACCTCGCCGAAGACGACGT), che ha dato luogo in reazioni di PCR a un prodotto di amplificazione di 467 bp, e la coppia di primer 1244FOR e 00170REV (GTCGTGCTTCAGCTGGAAG), che ha dato un prodotto di amplificazione di 289 bp. Il protocollo utilizzato per i cicli termici è stato il seguente:

## Materiali e metodi

Fase	N. cicli	Temperatura (°C)	Tempo
Denaturazione	1x	94	2'
Amplificazione:	30x		
-Denaturazione		94	30''
-Appaiamento		60	45''
-Allungamento		72	60''
Allungamento finale	1x	72	10'

Per le reazioni di PCR sono state utilizzate le seguenti condizioni:

COMPONENTI DELLA REAZIONE	CONCENTRAZIONI FINALI
Taq polimerasi	1 unità
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 mM
PCR buffer 10x	1x
dNTPs (2.5 mM)	150 µM
DNA	20 ng
Primer	20 picomoli
Acqua	Fino a 50 µl

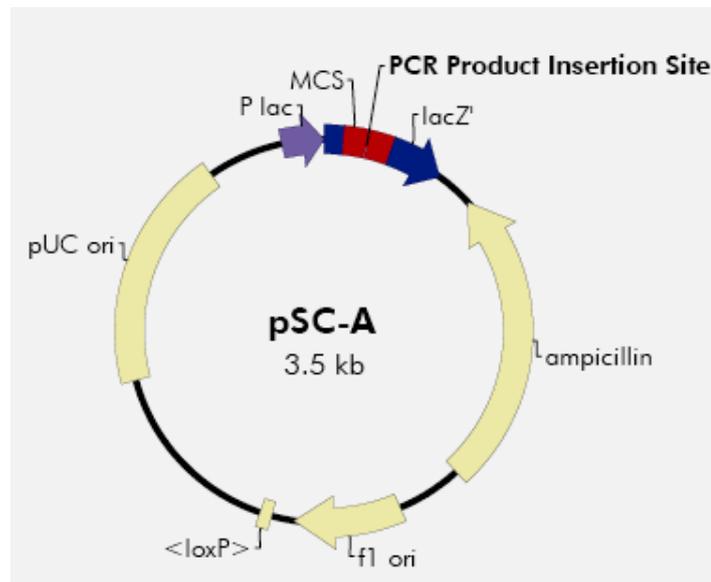
Il DNA genomico per entrambi i funghi è stato ottenuto mediante estrazione con fenolo-cloroformio a partire da micelio allevato in coltura agitata in PDB per 72 ore alla temperatura di 24°C. La biomassa è stata raccolta separando il substrato per filtrazione con carta Miracloth (Calbiochem), lavata ripetutamente con acqua distillata sterile e asciugata con carta assorbente. Il micelio è stato dapprima immerso in azoto liquido e poi posto in tubi in polipropilene da 50 ml a liofilizzare. La biomassa liofilizzata è stata polverizzata con l'ausilio di una spatola e immediatamente sottoposta ad estrazione. Un grammo di micelio liofilizzato è stato sospeso in 10 ml di buffer di estrazione (NaCl 0,5 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, SDS 1% pH 7.5), al quale sono stati aggiunti 5ml di fenolo e 5 ml di cloroformio-alcool isoamilico (24:1). La sospensione è stata agitata delicatamente e quindi centrifugata a 4° C per 30 minuti a 12000 rpm. La fase acquosa recuperata è stata digerita con 50µl di RNasi (10 mg/ml) per 1 ora a 37° C. Terminata la digestione sono stati aggiunti 10 ml di fenolo-cloroformio, il campione è stato agitato

delicatamente e centrifugato nuovamente. La fase acquosa è stata sottoposta ad una nuova estrazione fenolo-cloroformio e ad una con solo cloroformio. Alla fase acquosa recuperata (contenente il DNA genomico) è stato aggiunto isopropanolo e il tutto è stato centrifugato a temperatura ambiente per 15 minuti. Il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo al 70%, lasciato asciugare e poi risospeso in TE (Tris 10 mM - EDTA 10 mM, pH 8.0). Il DNA ottenuto è stato quantificato tramite elettroforesi su gel d'agarosio per comparazione con un DNA standard.

## 2.16. Clonaggio e sequenziamento di frammenti genici codificanti per ciclofilline in *T. atroviride* e *T. harzianum*

### 2.16.1. Ligazione in vettore plasmidico

Per il clonaggio dei frammenti di DNA amplificati mediante PCR è stato usato lo StrataClone<sup>TM</sup> PCR cloning kit contenente il plasmide pSC-A (Stratagene, CA, U.S.A.) (Fig. 9).



**Figura 9:** Mappa circolare del vettore pSC-A riportante: sequenza codificante il frammento  $\alpha$  della  $\beta$ -galattosidase ( $lacZ'$ ); sito di clonaggio multiplo (MCS); regione del gene di resistenza all'ampicillina (ampicillin); sito di inizio della replicazione del ss-DNA (fl ori); sequenza del promotore lac (P lac); sito di inizio della replicazione pUC.

Il sistema sfrutta l'efficiente attività di ricongiungimento del DNA di una topoisomerasi I del *Vaccinia* virus e l'attività di ricombinazione della ricombinasi Cre del batteriofago P1. Il prodotto di PCR amplificato con una Taq DNA polimerasi contiene residui di

adenina all'estremità 3' ai quali si legano facilmente le estremità del vettore modificato contenenti uridina. Le ligazioni sono state effettuate utilizzando 3 µl di Buffer di clonaggio StrataClone™, 1 µl di mix del vettore e 2 µl del prodotto di PCR (5-50 ng). La miscela di reazione è stata mescolata mediante ripetuto pipettaggio e lasciata a temperatura ambiente per 5 minuti, trascorsi i quali il campione è stato posto in ghiaccio.

### *2.16.2. Trasformazione delle cellule competenti*

Un tubo di cellule competenti StrataClone SoloPack per ciascun campione è stato posto in ghiaccio e ad esso è stato aggiunto 1 ml della miscela di clonaggio. La miscela è stata incubata su ghiaccio per 20 minuti, trasferita per 45 secondi a 42°C e poi di nuovo posta in ghiaccio per 2 minuti. Alla miscela di reazione sono stati aggiunti 250 µl di una soluzione di SOC (Bacto-tryptone 2%, Bacto yeast extract 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, glucosio 20 mM) a 42°C e l'intera miscela è stata poi posta in agitazione per 1 h a 37°C.

### *2.16.3. Analisi dei trasformanti*

Aliquote di 10 e 100 µl di sospensione batterica sono state piastrate sul mezzo LB (Luria Bertani) costituito da 5 g/l di Bacto yeast extract, 10 g/l di peptone, 5mg/l di NaCl e 15 g/l di agar tecnico e contenente come mezzo selettivo 100 µg/ml di ampicillina. Su ciascuna piastra sono stati spatolati 40 µl di una soluzione 2% di 5 bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galattopiranoside (X-Gal) in dimetilformammide (DMF), substrato dell'enzima della β-galattosidasi. Tale substrato permette l'analisi dei trasformanti recanti l'inserito poiché il sito di clonaggio del plasmide è localizzato all'interno del gene Lac Z, codificante per l'enzima β-galattosidasi. L'inserzione del frammento di DNA esogeno interrompe la sequenza codificante del gene che pertanto non viene espresso. Le colonie batteriche trasformate con plasmidi contenenti l'inserito appaiono bianche, mentre quelle contenenti il plasmide vuoto appaiono blu.

Le colonie sviluppatasi dopo 16-18 ore di incubazione a 37° C, sono state trasferite in tubi contenenti 3ml di LB + ampicillina 100 µg/ml e incubate a 37° C per 16 ore in agitazione in modo da ottenere una concentrazione di cellule batteriche sufficiente per la successiva estrazione di DNA plasmidico.

#### *2.16.4. Estrazione del DNA plasmidico*

L'estrazione del DNA plasmidico dalle cellule competenti trasformate è stata effettuata utilizzando colonnine NucleoSpin<sup>®</sup> (Macherey-Nagel, Germany), secondo il protocollo consigliato dalla ditta produttrice. In breve, le cellule competenti trasformate sono state lisate con apposite soluzioni tampone per liberare il DNA plasmidico; questo è stato legato ad una speciale membrana di silice contenuta in colonnine pronte all'uso che hanno consentito l'allontanamento del lisato cellulare e l'eluizione del DNA plasmidico purificato.

#### *2.16.5. Digestione enzimatica e sequenziamento dei cloni*

Aliquote di 5 µl di DNA plasmidico estratti dai campioni provenienti dai prodotti di PCR di 467 e 289 bp di *T. atroviride* ceppo P1 e *T. harzianum* ceppo T22 sono stati digeriti con 1 µl dell'enzima di restrizione *EcoRI* (Promega, WI, U.S.A.), in presenza di 2 ml di buffer H (Promega) ed il complemento a 20 µl di acqua. Questo enzima presentava siti di riconoscimento fiancheggiati il punto di inserzione del prodotto di PCR sul vettore plasmidico pSC-A, ed ha consentito, pertanto, di visualizzare su gel di agarosio in presenza di bromuro d'etidio le bande di DNA plasmidico delle dimensioni attese.

I cloni che hanno mostrato di possedere l'inserito di interesse sono stati sequenziali dalla PRIMM s.r.l. (Milano, Italia).

### **2.17. Analisi Southern**

Aliquote di 5 µg di DNA genomico di *T. atroviride* ceppo P1 e *T. harzianum* ceppo T22 sono state digerite singolarmente con 50 unità degli enzimi di restrizione *EcoRI* e *HINDIII* (aventi siti di taglio esterni alla sequenza), *PvuII*, *KpnI* e *NCO* (aventi siti di taglio interni alla sequenza) (Promega) a 37°C per 16 ore, ed i frammenti ottenuti sono stati separati per elettroforesi (40V per 6 ore) su gel d'agarosio allo 0.7 % (p/v) in tampone TAE (Tris 10 mM, Acetato di sodio 1 mM, EDTA 1 mM pH 7.5). Dopo l'elettroforesi, il gel è stato immerso, due volte per 15 minuti, in una soluzione contenente NaOH 0.5 M e NaCl 1.5 M, al fine di ottenere la denaturazione del DNA, e neutralizzato per immersione, due volte per 15 minuti, in una soluzione di Tris-HCl 0.5 M pH 7.5, NaCl 3 M. La migrazione dei frammenti su una membrana di nylon (Nytran

13 N, Schleicher e Schuell) è stata ottenuta per capillarità in presenza di tampone SSC 10X (l' SSC 1X è costituito da una soluzione tamponata a pH 7.0, di NaCl 0.14 M e citrato di sodio 0.01 M). Prima dell'ibridazione il DNA è stato fissato sulla membrana tramite esposizione ai raggi UV (1.5 kJ/min) per 3 minuti, per ciascuno dei lati, e la membrana è stata preibridizzata in un'apposita soluzione (Sambrook *et al.*, 1989) a 42°C. Per gli esperimenti descritti nel presente lavoro sono state utilizzate tecniche non radioattive di marcatura delle sonde molecolari. In particolare è stato utilizzato il sistema DIG della Roche che prevede la marcatura della sonda con digossigenina tramite PCR. Dopo la preibridazione, la membrana è stata posta a contatto con la soluzione contenente la sonda marcata con digossigenina (la concentrazione di sonda utilizzata era pari a 25 ng/ml nella soluzione di ibridazione), precedentemente denaturata per immersione in acqua a 100° C per 10 minuti e rapido raffreddamento su ghiaccio. La fase di ibridazione è stata protratta per la durata di una notte a 65°C. Dopo tale passaggio la membrana è stata sottoposta a 3-4 lavaggi in presenza di una soluzione tampone SSC a pH 7.0 contenente lo 0.1% in peso di SDS, 750mM di NaOH e 75 mM di sodio citrato. Per la rivelazione dell'avvenuta ibridazione si è usata la procedura indicata dal protocollo Roche, che prevede il trattamento con un anticorpo diretto contro la digossigenina e marcato con l'enzima fosfatasi alcalina, seguito da incubazione in una soluzione di un substrato chemiluminescente per la fosfatasi (CPD Star, Roche). La defosforilazione enzimatica di tale substrato porta alla formazione dell'anione metastabile dioxene fenolato che si decompone ed emette luce a 466 nm. Il segnale luminoso serve ad impressionare la lastra autoradiografica, il cui sviluppo rivela i risultati dell'avvenuta ibridazione.

## **2.18. Studio di espressione di ciclofilline in *T. atroviride* ceppo P1**

### *2.18.1. Condizioni di crescita*

Per valutare l'espressione di geni codificanti per ciclofilline in *Trichoderma* sono stati allestiti saggi di crescita in cui il fungo è stato allevato in diverse condizioni, sia su mezzo liquido (SM 1X) che solido (piastre di WA 1%). Le condizioni di crescita possono essere così schematizzate:

---

<b>1</b>	<b>SM 1X + GLICEROLO 2% w/v</b>
<b>2</b>	<b>SM 1X + GLUCOSIO 0,5% w/v (carbon starvation)</b>
<b>3</b>	<b>FC T. ATROVIRIDE P1</b>
<b>4</b>	<b>FC RHIZOCTONIA</b>
<b>5</b>	<b>SM 1X + SHOCK TERMICO (47°C, 60')</b>
<b>6</b>	<b>WA 1% + RHIZOCTONIA</b>
<b>7</b>	<b>WA 1% + BOTRYTIS su cellophane</b>
<b>8</b>	<b>WA 1% + RADICI + RHIZOCTONIA su cellophane</b>
<b>9</b>	<b>WA 1% + FOGLIE + BOTRYTIS su cellophane</b>
<b>10</b>	<b>WA 1% + FOGLIE</b>
<b>11</b>	<b>WA 1% + RADICI</b>

Nel caso del mezzo liquido, cento microlitri di una soluzione  $1 \times 10^6$  /ml di spore di *T. atroviride* ceppo P1 sono stati inoculati in 100 ml di PDB contenuti in beute da 250 ml e la coltura è stata posta in agitazione per 2g a 25°C e 120 rpm. La biomassa è stata filtrata su carta Miracloth (Calbiochem), lavata con acqua distillata sterile ed inoculata in 100 ml di substrato (SM 1X o FC di *R. solani* /*T. atroviride* P1) in beute da 250 ml. La coltura è stata posta in agitazione per 2g a 25°C a 120 rpm, ad eccezione della condizione di shock termico per la quale la biomassa inoculata in SM 1X è stata posta in agitazione per 1h a 47°C a 120 rpm. Per le condizioni di crescita su mezzo solido (piastre di WA 1%), è stata seguita una procedura analoga a quanto descritto nei paragrafi 2.6 e 2.7 per l'allestimento dei saggi di interazione su substrato agarizzato tra *Trichoderma*, piante (foglie o radici) e patogeni (*B. cinerea*, *R. solani*).

Per la preparazione dei filtrati colturali (FC) dei funghi è stata utilizzata la procedura descritta nel par. 2.3.

Dopo 2 giorni di crescita, il micelio di *Trichoderma* è stato recuperato (mediante filtrazione dal mezzo liquido o con una spatola dalla membrana di cellophane posta sulle piastre di WA) e si è proceduto immediatamente con l'estrazione dell'RNA.

### *2.18.2. Estrazione dell'RNA*

Per l'estrazione dell'RNA totale dal micelio di *T. atroviride* ceppo P1 ci si è serviti del TRI REAGENT™ (Sigma), utilizzando il protocollo descritto dalla casa produttrice. La quantizzazione dell'RNA è stata effettuata con uno spettrofotometro SmartSpec (BIO-RAD) opportunamente calibrato.

### *2.18.3. Analisi northern*

Aliquote di 5µg di RNA totale sono state denaturate a 65°C in presenza di formaldeide e formammide e poi separate elettroforeticamente in un gel di agarosio/formaldeide contenente l'1% in peso di agarosio, e il 6 % in volume di formaldeide, in un tampone di MOPS 40mM a pH7.0.

La corsa elettroforetica è stata effettuata a 45V per 6 ore. Dopo questo tempo il fronte di migrazione raggiungeva, di norma, i  $\frac{3}{4}$  della lunghezza del gel. Il trasferimento dell'RNA sulla membrana di nylon (Nytran 13N) è stato fatto per capillarità in un tampone SSC 10X, in modo analogo alla procedura descritta per l'analisi Southern, così come i successivi passaggi di fissaggio, preibridazione, ibridazione, lavaggio e rilevazione del segnale.

### **2.19. Separazione delle frazioni proteiche da filtrati colturali di *Trichoderma* spp. mediante SDS-PAGE e sequenziamento di proteine**

Venti ml dei filtrati colturali (FC) prodotti da diverse specie di *Trichoderma* (*T. harzianum* ceppo T22, *T. atroviride* ceppo P1 e ceppo Fyto822), allevati per sette giorni in MS (Murashige and Skoog, Sigma) e + 1% di glucosio, sono stati portati a secco, risospesi in 1ml di acqua e successivamente dializzati per 16 ore e liofilizzati. I campioni ottenuti sono stati sottoposti al protocollo "chitin-binding" (proteine che legano la chitina) per separare le proteine che legano la chitina da quelle che non legano. In particolare, i filtrati colturali liofilizzati sono stati risospesi in 1ml di buffer (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8), a cui sono stati aggiunti circa 20 mg di chitina di granchio (Sigma) e mantenuti in agitazione per circa due ore a 25°C. La sospensione è stata poi centrifugata per tre minuti a 13.000 rpm. Il surnatante, che rappresenta la frazione di proteine che non legano la chitina, è stato congelato in azoto liquido e liofilizzato. Il pellet è stato lavato due volte con lo stesso buffer ed è stata rimossa ogni traccia di liquido. Il pellet di chitina è stato risospeso in 200µl di SDS 1% ed è stato mantenuto a 95°C per 10 minuti. Successivamente la miscela è stata centrifugata e il surnatante è stato recuperato, congelato in azoto liquido e liofilizzato, ottenendo la frazione di proteine che si è legata alla chitina.

Le frazioni proteiche liofilizzate legate alla chitina sono state risospese nel tampone di corsa SDS 1X e separate mediante elettroforesi verticale in condizioni denaturanti

tricina-SDS-PAGE. È stato usato il sistema per elettroforesi Mini-Protean 3 Cell (BIO-RAD). Il gel di corsa conteneva il 16 % di acrilammide mentre quello di separazione il 4 % di acrilammide, preparati in tampone Tris 3M + 0.3 % SDS.

Il tampone al catodo era composto da: 0.1 M Tris, 0.1 M tricina e 0.1% SDS, pH 8.5; mentre quello all'anodo: 0.2 M Tris-HCl, pH 8.9. Il gel è stato corso a 120 volts per 1 ora e 30 minuti. A corsa ultimata le proteine sono state colorate con nitrato di argento e/o con Blue di Coomassie (Morrissey, 1981).

Una banda di circa 10 kDa è stata escissa dal gel di poliacrilammide per essere sottoposta a sequenziamento amminoacidico dell'estremità N-terminale secondo la reazione di degradazione di Edman. La sequenza amminoacidica è stata analizzata con il software BLASTX, confrontandola con quelle contenute nella banca dati GeneBank del National Center for Biotechnological Information (consultabile al sito internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## **2.20. Clonaggio del gene *hytr1***

### *2.20.1. Purificazione dell'RNA messaggero (mRNA)*

Per ottenere l'RNA messaggero (mRNA) dal micelio di *Trichoderma*, il fungo è stato allevato in coltura agitata in PDB per 72 h alla temperatura di 24°C. La biomassa è stata filtrata con carta Miracloth (Calbiochem), lavata ripetutamente con acqua distillata sterile e asciugata con carta assorbente. Il micelio è stato dapprima immerso in azoto liquido e poi posto in tubi in polipropilene da 50 ml a liofilizzare. La biomassa liofilizzata è stata infine polverizzata con l'ausilio di una spatola e immediatamente sottoposta ad estrazione dell'RNA totale con TRI REAGENT™ (Sigma), utilizzando il protocollo descritto dalla casa produttrice.

La purificazione dell'mRNA è stata effettuata con il GenElute™ mRNA Miniprep Kit (Sigma). A 100µg di RNA totale disciolti in 100µl di acqua sono stati aggiunti 15µl di una matrice di polystirene con oligo d(T). La miscela è stata incubata per 3 minuti a 70°C per denaturare l'RNA, e poi per 10 minuti a 25°C per permettere il legame dell'mRNA alla matrice di oligo d(T). Dopo aver centrifugato la miscela, il pellet è stato risospeso in 500µl di soluzione di lavaggio e caricato su filtri GenElute spin filter per effettuare due lavaggi. A lavaggi ultimati, alle colonnine sono stati aggiunti 50µl di soluzione di eluizione, quindi il tutto è stato incubato a 70°C per 5 minuti e centrifugato.

### 2.20.2. PCR-RACE 3'

Il clonaggio del gene codificante per l'idrofobina HYTRA1 è stato effettuato mediante PCR-RACE 3' utilizzando il sistema 5'/3'RACE (Boehringer Mannheim); questo prevede l'utilizzo di un "oligo dT-anchor primer" e della trascrittasi inversa del virus AMV per la conversione dell'mRNA in cDNA e l'amplificazione tramite PCR del cDNA con un primer specifico e un "PCR anchor primer".

<i>Sintesi del cDNA</i>	<i>PCR sul cDNA</i>
1µg (5µl) di mRNA	1µl di cDNA
2µl di buffer reverse transcriptase 10X	1µl di dNTPs
2µl di dNTPs	1µl di PCR anchor primer
1µl di oligo dT-anchor primer	1µl di primer specifico Hydr F1
1µl di AMV reverse transcriptase	0,5µl di Taq DNA polimerasi
9µl di H <sub>2</sub> O	5µl di buffer 10X
La miscela è stata incubata per 1 ora a 55°C e per altri 10 minuti a 65°C	3µl di MgCl <sub>2</sub>
	16,5µl di H <sub>2</sub> O

Il protocollo utilizzato per i cicli termici è stato il seguente:

Fase	N. cicli	Temperatura (°C)	Tempo
Denaturazione	1x	94	5'
Amplificazione:	30x		
<i>-Denaturazione</i>		94	30''
<i>-Appaiamento</i>		54	45''
<i>-Allungamento</i>		72	60''
Allungamento finale	1x	72	10'

I primer utilizzati per la PCR-RACE 3' sono stati:

- **oligo dT-anchor primer:**

5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Questo primer si appaia con la coda di polyA dell'mRNA che ha 16 T, 22 basi riconosciute da tre enzimi di restrizione (*Mlu I*, *Cla I*, *Sal I*) all'estremità 5', e una base selettiva all'estremità 3' (V= A, C o G).

- **PCR anchor primer:** 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3'  
primer reverse con sequenza omologa alle 22 basi dell'estremità 5' dell' oligo dT-anchor primer.
- **Hytra1 F1 primer:** 5'-GCTGTCTGCCCTACC-3'  
primer specifico forward di 15 nt disegnato sulla sequenza dei primi 5 amminoacidi all'N-terminale della proteina HYTRA1 separata tramite SDS-PAGE.

L'amplificato è stato subclonato nel vettore pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) ed è stato sequenziato.

## **2.21. Caratterizzazione fisiologica dell'idrofobina HYTRA1**

### *2.21.1. Purificazione di HYTRA1 da filtrato colturale*

Beute contenenti 100 ml di MS 1% glucosio sono state inoculate con  $1 \times 10^7$  spore di *T. harzianum* T22 e poste in agitazione a 150 rpm alla temperatura di 25°C in luce continua per 7 giorni. Trascorso tale tempo la coltura è stata filtrata con carta Whatman 3MM-CHR per allontanare il micelio. Il filtrato colturale recuperato è stato trasferito in tubi Falcon da 50 ml e poi omogeneizzato con un ultraturrax per 5 min alla massima velocità, in maniera tale da insufflare aria nella soluzione. Questa operazione ha portato alla formazione di uno spesso strato di schiuma sulla superficie della soluzione, contenete l'idrofobina in forma relativamente pura (Richards, 1993). La schiuma è stata quindi raccolta, disciolta in circa 10 ml di 80% etanolo e quindi portata a secco con Speedvac. La proteina così ottenuta è stata risospesa in una soluzione di 20% etanolo contenente MS + 1% glucosio, e quantizzata con il saggio Bradford (BIO-RAD).

### *2.21.2. Saggi di attività di HYTRA1 su funghi patogeni*

L'attività antifungina della proteina nativa HYTRA1 è stata valutata mediante saggi di inibizione della germinazione delle spore di *Botrytis cinerea*, *A. alternata* e dello stesso *T. harzianum* ceppo T22. Le miscele di reazione (90 µl), contenenti 500 conidi di ciascun fungo in 30 mM di tampone sodio fosfato pH 6.8 e PDB 1%, sono state inoculate ciascuna con 10 µl di una soluzione 10 µM di HYTRA1 ed incubate in piastre ELISA a 25°C in una camera umida. Le piastre sono state controllate ad intervalli

regolari di tempo utilizzando un microscopio invertito (Zeiss) e ciascun esperimento è stato ripetuto in 2 giorni separati, con 3 repliche ciascuno.

Sono stati condotti anche saggi di attività *in vivo* su piante di pomodoro inoculate artificialmente con una soluzione contenente spore di *B. cinerea* ( $1 \times 10^6$  spore/ml in 30 mM di tampone sodio fosfato pH 6.8) e la proteina nativa HYTRA1 a differenti concentrazioni (0.62-10  $\mu$ M). Gli inoculi (10  $\mu$ l) sono stati effettuati su foglie *in vivo* e la comparsa delle aree necrotiche è stata registrata 72h dopo il trattamento.

### *2.21.3. Saggi di interazione di HYTRA1 con la pianta*

L'interazione di HYTRA1 con piante di pomodoro è stato saggiata al fine di esaminare la reazione della pianta alla presenza della sola idrofobina. In particolare, è stato valutato il manifestarsi di una reazione di ipersensibilità (HR) in pianta attraverso la comparsa delle tipiche aree necrotiche in corrispondenza del punto di inoculo dell'idrofobina. La proteina nativa è stata infiltrata alla concentrazione di 5  $\mu$ M (100  $\mu$ l) ed i sintomi sono stati controllati ad intervalli regolari di tempo sia sotto luce visibile che ultravioletta, dal momento che alcuni dei composti coinvolti nella risposta della pianta all'attacco di un patogeno (soprattutto polifenoli) sono autofluorescenti (Heath, 2000; Nicholson e Hammersmidt, 1992).

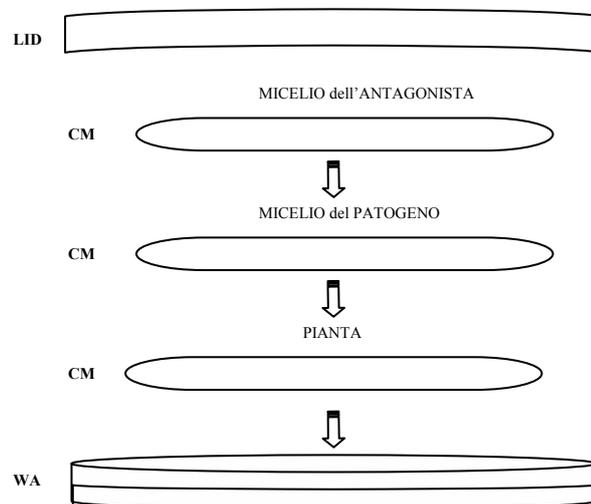
L'effetto sulla crescita e lo sviluppo della pianta dovuto all'inoculo di HYTRA1 a varie concentrazioni è stato valutato: a) su piante di pomodoro i cui semi sono stati fatti germinare in tubi sterili contenenti un substrato (MS + saccarosio 1% w/v) addizionato con HYTRA1; e b) su talee di pomodoro trasferite in tubi contenenti una soluzione dell'idrofobina pura. Nell'esperimento a) è stata valutata l'altezza delle piantine germinate *in vitro* in presenza dell'idrofobina dopo 4 settimane di crescita a 25°C e con fotoperiodo di 16h di luce/8 h di buio, rispetto al controllo in assenza della proteina, mentre in b) è stato analizzato l'effetto sulla radicazione delle talee dopo 3 settimane di crescita in condizioni analoghe a quanto riportato per l'esperimento precedente. Le concentrazioni saggiate in entrambi gli esperimenti sono state: 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5.0 e 10  $\mu$ M.

### 3. RISULTATI

#### 3.1. Interazioni multi-componente e separazione dei proteomi

E' stato analizzato il cambiamento del proteoma del fungo antagonista *Trichoderma* allevato sia in condizioni di non interazione, che durante l'interazione con diverse piante (pomodoro, fagiolo) e agenti fitopatogeni (*Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum*). Inoltre, sono state estratte ed analizzate le proteine da piante poste in contatto con il micelio del patogeno e/o dell'antagonista, valutando altresì la risposta sistemica delle piante in presenza delle due componenti fungine del sistema. In ciascun esperimento è stato valutato anche il cambiamento del profilo proteico del patogeno.

L'utilizzo negli esperimenti di interazione multi-componente di larghi supporti (dischi Petri del diametro di 15 cm) e di membrane di cellophane per separare i tre partner ha consentito sia il contatto sia il successivo recupero selettivo dei tessuti fungini e vegetali (Fig. 10). In precedenti esperimenti, invece, l'impiego di co-culture in mezzo liquido nelle quali la separazione delle tre componenti era stata realizzata con l'uso di membrane da dialisi non ha permesso l'instaurarsi di una sufficiente interazione tra la pianta e le componenti microbiche (dati non mostrati).



**Fig. 10.** Schema del sistema utilizzato per effettuare in piastra le interazioni a due o tre componenti tra pianta, patogeno e agente antagonista. Il materiale vegetale (foglie o radici), adagiato su di un disco di cellophane sterile (CM), è stato posto su piastre di water agar (WA) in dischi di Petri del diametro di 15 cm. Il micelio fungino dell'antagonista o del patogeno, precedentemente cresciuti su piastre di PDA sopra un disco sterile di cellophane (CM), sono stati posti al di sopra dei tessuti vegetali.

Le procedure sperimentali sono state ottimizzate modificando la durata dell'interazione, la quantità dell'inoculo, lo stadio di crescita del materiale vegetale trasferito nelle piastre Petri, etc. allo scopo di ottimizzare le condizioni di separazione e raccolta delle proteine dalle componenti vegetali/microbiche impiegate. Una soddisfacente resa di proteine estratte, sia in termini qualitativi sia quantitativi, è stata ottenuta sia dalle foglie che dai miceli (ad es. 5-10 mg di proteine totali per grammo di materiale fresco). Tuttavia i risultati degli estratti proteici ottenuti dai tessuti radicali non sono stati inseriti in questo lavoro dal momento che la risoluzione degli spot sui gel 2D non è stata soddisfacente, anche applicando un protocollo specifico per l'estrazione di proteine da radici (Saravanan e Rose, 2004).

Tutti gli estratti proteici ottenuti sono stati prima analizzati utilizzando strip lunghe 7 cm con un intervallo di pH da 3 a 10 per ottenere una visione globale delle proteine totali. I risultati sono stati quindi confermati utilizzando strip di formato maggiore (11 o 17 cm di lunghezza). I dati riportati in questo lavoro fanno comunque riferimento ai gel bidimensionali ottenuti con l'impiego di strip lunghe 7 cm e con un intervallo di pH 3-10, se non altrimenti specificato. L'analisi dei gel effettuata con il software PD-Quest (Bio-Rad) ha consentito la realizzazione di mappe bidimensionali per ciascuna condizione d'interazione, e di effettuare quindi un'analisi qualitativa e quantitativa degli spot proteici differenziali. I gel ottenuti, infatti, hanno permesso la separazione di centinaia di proteine, fornendo così un quadro rappresentativo di ciascun proteoma. Per alcuni spot, inoltre, l'omologia riscontrata con proteine presenti in banca dati è stata confermata dalla presenza di domini conservati che corrispondevano alle sequenze dedotte dei peptici ottenuti su gel 2-D.

### **3.2. Analisi delle proteine intracellulari di *Trichoderma* in condizioni di non interazione**

Sono stati analizzati gli effetti di differenti sorgenti di carbonio sul proteoma del fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* ceppo T22. E' stato utilizzato come controllo il proteoma del fungo cresciuto in mezzo salino (SM) in presenza di glicerolo ad una concentrazione del 2% (w/v), in quanto è stato dimostrato che questa fonte di carbonio non agisce né come induttore né come repressore dell'attività enzimatica del fungo antagonista (Mach *et al.*, 1999).

In tabella 7 sono stati riportati i risultati dell'analisi dei gel bidimensionali delle proteine intracellulari di *T. harzianum* ceppo T22 cresciuto in presenza di glucosio (1 o 4% w/v) o saccarosio (1% w/v). Gli spot totali ottenuti durante la crescita del fungo in condizioni di non induzione (glicerolo 2%) sono stati 184.

**Tabella 7.** Numero di spot differenziali prodotti da *T. harzianum* ceppo T22 cresciuto in presenza di differenti sorgenti di carbonio.

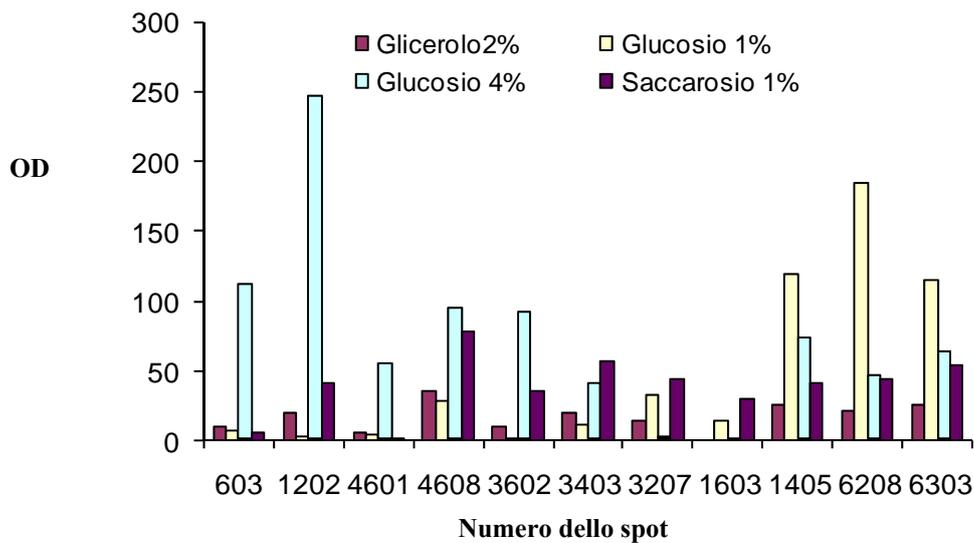
<sup>a</sup> Spot assenti nel controllo (ON) / presenti solo nel controllo (OFF)

<sup>b</sup> Spot la cui intensità è aumentata, diminuita o è invariata rispetto al controllo.

SM (1x) +	Spot totali	ON <sup>a</sup>	OFF <sup>a</sup>	Aumentati <sup>b</sup>	Ridotti <sup>b</sup>	Inalterati <sup>b</sup>
Glucosio 1%	122	16	37	32	15	21
Glucosio 4%	158	48	39	39	7	13
Saccarosio 1%	118	17	32	55	10	21

Confrontando gli spot di *T. harzianum* cresciuto in presenza dei diversi carboidrati è emerso un diverso andamento nel numero di spot differenziali rispetto al controllo. In particolare 16 e 17 spot sono prodotti *ex novo* (ON) in presenza di 1% glucosio e 1% saccarosio, mentre un numero decisamente superiore (48) sono stati ottenuti aumentando la concentrazione di zucchero (glucosio 4%). E' stato invece registrato un incremento del numero di spot la cui intensità aumentava rispetto al controllo (spot "aumentati") quando *Trichoderma* era allevato in presenza di saccarosio rispetto al glucosio (sia 1 che 4%).

Il numero degli spot assenti (OFF) rispetto al controllo si è mantenuto grosso modo costante nelle diverse condizioni saggiate (mediamente 36). Confrontando tutti gli spot aumentati, abbiamo rilevato la presenza di 11 spot la cui intensità è aumentata in tutte le condizioni analizzate (Fig. 11).



**Figura 11.** Intensità degli spot differenziali prodotti da *T. harzianum* ceppo T22 cresciuto in presenza di differenti sorgenti di carbonio. Sono riportati in figura solo gli spot la cui intensità è aumentata in tutte le condizioni saggiate rispetto al controllo. Ciascuna barra rappresenta la quantità dello spot presente in un gel espressa come Densità Ottica (OD).

### 3.3. Analisi delle proteine intracellulari di *Trichoderma* in condizioni di interazione con agenti fitopatogeni

Il profilo proteico del fungo *T. harzianum* ceppo T22 è stato analizzato per valutare la risposta alla presenza in coltura liquida di pareti cellulari (CWs) e biomassa (BM) di patogeni fogliari (*B. cinerea*) e terricoli (*P. ultimum*, *R. solani*), tutti ospiti dell'attività micoparassitaria di questo ceppo.

L'analisi dei gel bidimensionali ha evidenziato numerose proteine differenziali nelle varie interazioni rispetto alla condizione di controllo (glicerolo 2%). In tabella 8 sono mostrati i risultati dell'analisi dei gel bidimensionali delle proteine intracellulari di *T. harzianum* ceppo T22 a seguito dell'interazione con la biomassa dei patogeni usata come sola sorgente di carbonio, ovvero con i filtrati colturali di patogeni con aggiunta delle pareti cellulari degli stessi alla concentrazione dello 0.5% (w/v).

**Tabella 8.** Numero di spot differenziali prodotti da *T. harzianum* ceppo T22 cresciuto in presenza di biomassa (BM) o filtrati colturali (FC) + 0,5% w/v delle pareti cellulari di vari patogeni.

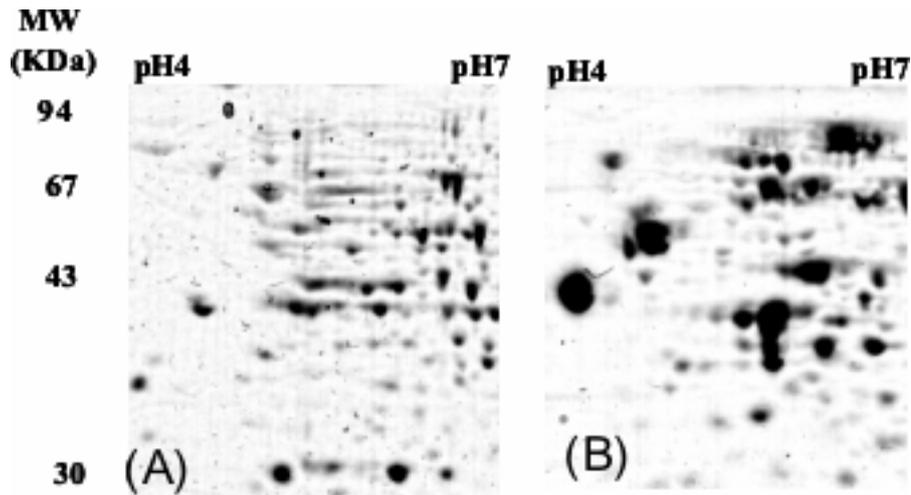
<sup>a</sup> Spot assenti nel controllo (ON) / presenti solo nel controllo (OFF)

<sup>b</sup> Spot la cui intensità è aumentata, diminuita o è invariata rispetto al controllo.

SM (1x) +	Spot totali	ON <sup>a</sup>	OFF <sup>a</sup>	Aumentati <sup>b</sup>	Ridotti <sup>b</sup>	Inalterati <sup>b</sup>
BM <i>Botrytis</i>	178	16	37	15	31	17
BM <i>Rhizoctonia</i>	201	11	34	23	27	20
BM <i>Pythium</i>	181	26	27	37	20	29
FC <i>Botrytis</i> + 0.5%CWs	283	29	24	25	20	18
FC <i>Rhizoctonia</i> + 0.5%CWs	232	30	37	22	15	22
FC <i>Pythium</i> + 0.5%CWs	280	46	26	26	31	29

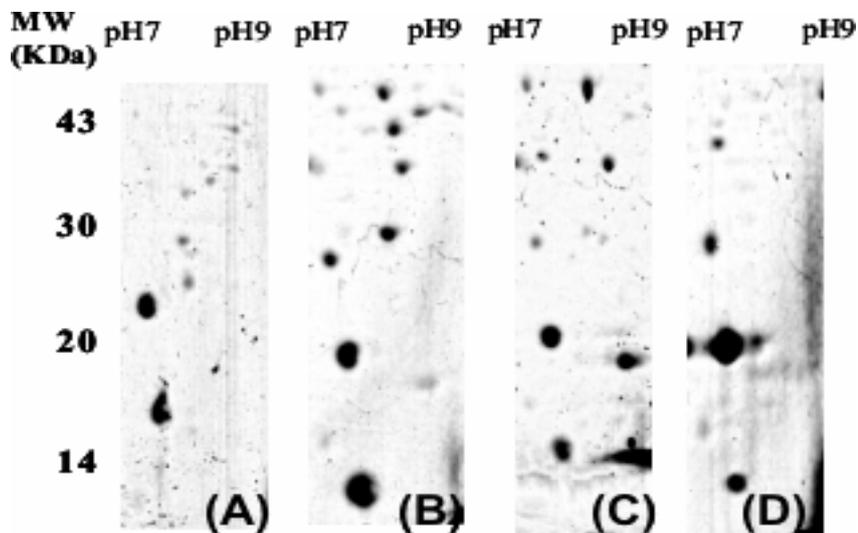
E' interessante notare come il numero totale degli spot presenti su gel sia significativamente più alto quando il *T. harzianum* ceppo T22 è allevato in presenza di filtrati colturali e pareti cellulari dei patogeni, rispetto al trattamento con la biomassa o rispetto al controllo (spot totali nel controllo = 184). Per quanto riguarda gli spot che risultano attivati durante l'interazione rispetto alla condizione di controllo (spot ON), si è registrato un aumento del numero di spot nella condizione di crescita in presenza del patogeno radicale *P. ultimum* rispetto a *B. cinerea* e *R. solani*, sia nel caso della biomassa sia del filtrato colturale addizionato di pareti cellulari di ciascun patogeno (tab. 8).

La presenza della biomassa di *P. ultimum* e *R. solani* ha incrementato l'accumulo di proteine con una massa molecolare compresa tra 30 e 94 kDa e punto isoelettrico tra 4 e 7, come mostrato in figura 12.



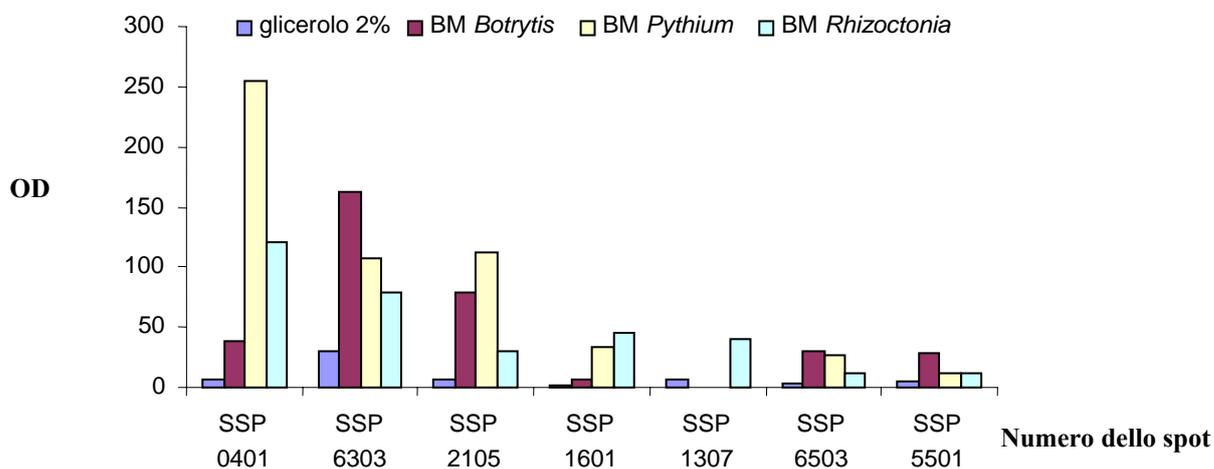
**Figura 12.** Confronto di una porzione dei gel 2-D contenente le proteine intracellulari di *T. harzianum* ceppo T22 allevato in mezzo salino (SM) in presenza di glicerolo 2% (A) o della biomassa del patogeno *P. ultimum* (B). La parte dei gel evidenziata è compresa tra 30 e 94 kDa di peso molecolare e punto isoelettrico tra pH 4 e 7.

In figura 13 sono mostrati anche le variazioni nell'accumulo di proteine a basso peso molecolare e con alti valori di punto isoelettrico nel proteoma di *T. harzianum* ceppo T22 cresciuto in presenza della biomassa dei vari funghi fitopatogeni.



**Figura 13.** Confronto di porzioni di gel 2-D dove si notano i cambiamenti del profilo di espressione di proteine a basso peso molecolare (14-43 kDa) e alti valori di punto isoelettrico (pH 7-9) di *T. harzianum* ceppo T22 cresciuto in mezzo salino (SM) in presenza della biomassa (BM) di differenti funghi fitopatogeni. (A): controllo (glicerolo 2%); (B): 1% BM di *P. ultimum*; (C): 1% BM *R. solani*; (D): 1% BM *B. cinerea*.

L'analisi condotta mediante il software PD-Quest sui set di spot differenziali ottenuti in presenza della biomassa dei diversi patogeni ha evidenziato la presenza di almeno 7 spot la cui intensità è aumentata rispetto al controllo in tutte le condizioni analizzate (figura 14).



**Figura 14.** Intensità degli spot differenziali prodotti da *T. harzianum* ceppo T22 in presenza della biomassa (BM) dei diversi patogeni la cui intensità è aumentata in tutte le condizioni analizzate rispetto al controllo. Ciascuna barra rappresenta la quantità dello spot presente in un gel espressa come Densità Ottica (OD).

### 3.4. Saggio di interazione su substrato agarizzato tra *Trichoderma*, piante di pomodoro e agenti fitopatogeni

Proteine differenzialmente prodotte sono state ottenute dall'analisi dei gel bidimensionali contenenti le proteine intracellulari del microrganismo antagonista *T. harzianum* ceppo T22 durante l'interazione con piante di pomodoro e agenti fitopatogeni (*B. cinerea*, *P. ultimum*, *R. solani*).

I ceppi selezionati sono stati applicati in un test di biocontrollo su piastre di water agar (WA 1.5%) contenenti piantine di pomodoro cresciute in presenza dei propagoli del patogeno incorporati nel mezzo. Il confronto del numero degli spot di *T. harzianum* cresciuto da solo (controllo) con quelli ottenuti in presenza delle piante infettate dai patogeni ha evidenziato una serie di cambiamenti nel numero di spot differenziali. In particolare, rispetto al controllo, sia il numero di spot prodotti *ex novo* (ON) sia quello degli spot la cui intensità è aumentata sono risultati maggiori quando *Trichoderma* è

stato allevato su piantine infette dai patogeni terricoli *P. ultimum* e *R. solani*, rispetto al patogeno fogliare *B. cinerea* (tab. 9).

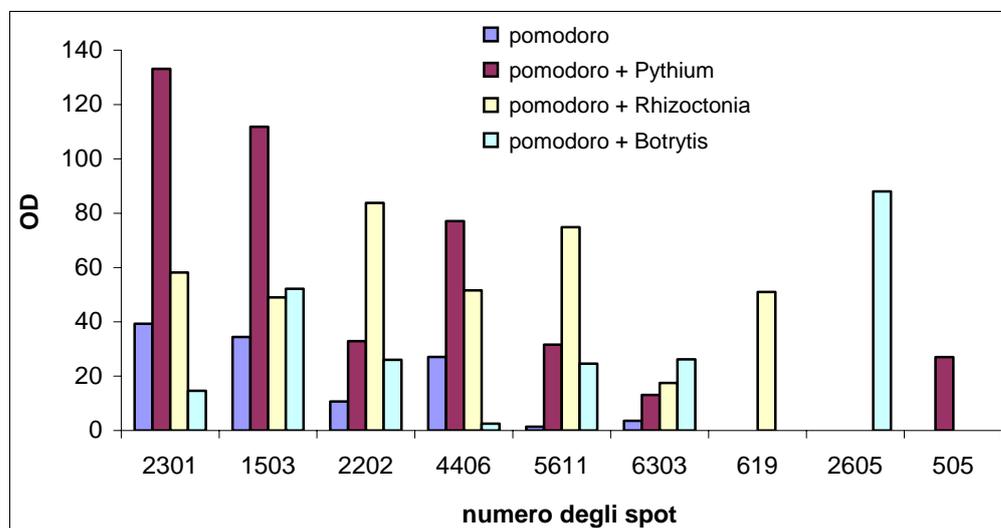
**Tabella 9.** Numero di spot differenziali prodotti da *T. harzianum* ceppo T22 durante l'interazione con piantine di pomodoro e patogeni su piastre di water agar (WA 1,5%).

<sup>a</sup> Spot assenti nel controllo (ON) / presenti solo nel controllo (OFF)

<sup>b</sup> Spot la cui intensità è aumentata, diminuita o è invariata rispetto al controllo.

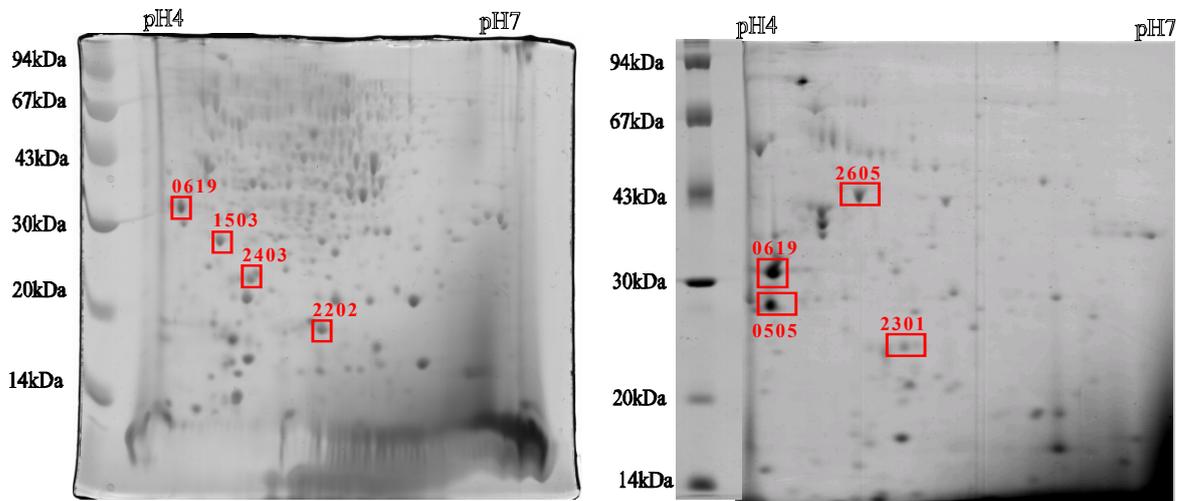
Condizione	SPOT totali	ON <sup>a</sup>	OFF <sup>a</sup>	Aumentati <sup>b</sup>	Ridotti <sup>b</sup>	Inalterati <sup>b</sup>
<i>B. cinerea</i>	152	27	28	27	15	29
<i>R. solani</i>	435	41	11	55	11	41
<i>P. ultimum</i>	444	40	7	66	19	49

Il software usato per l'analisi degli spot ha inoltre individuato, nell'ambito degli spot la cui intensità è aumentata rispetto al controllo, ben 16 spot differenziali presenti in tutte le condizioni di analisi (Fig. 15).



**Figura 15.** Intensità di alcuni degli spot differenziali prodotti da *T. harzianum* ceppo T22 in presenza della sola pianta o della pianta infettata dai diversi patogeni, la cui intensità è aumentata rispetto al controllo. Ciascuna barra rappresenta la quantità dello spot presente in un gel espressa come Densità Ottica (OD).

Gli spot differenziali che dall'analisi condotta con il software PD-Quest sono risultati essere maggiormente modificati rispetto al controllo, sono stati prelevati dai gel ed ulteriormente analizzati (Fig. 16). Nello specifico, 3 spot sono stati sottoposti a sequenziamento Edman, mentre altri 13 sono stati processati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. I risultati ottenuti sono stati utilizzati per effettuare il Peptide Mass Fingerprint (PMF) alla ricerca di omologie con proteine note. Degli spot sottoposti a questa analisi *in silico*, quelli riportati in tabella 10 hanno dato significative omologie con proteine analoghe presenti in banca dati.



**Figura 16.** Gel bidimensionali delle proteine estratte da *T. harzianum* ceppo T22 durante l'interazione con piantine di pomodoro e patogeni su piastre di water agar (WA 1,5%). Sono evidenziati gli spot su cui è stata effettuata la successiva analisi *in silico*. Strip 11 cm, pH 4-7.

## Risultati

**Tabella 10.** Risultati dell'analisi *in silico* delle proteine differenziali più interessanti prodotte da *T. harzianum* ceppo T22 durante l'interazione con pomodoro e vari patogeni. Peso molecolare (kDa)/ pI<sup>exp</sup>/<sup>th</sup> : pesi molecolari e punti isoelettrici sperimentali (ottenuti dai gel) e teorici (ottenuti dall'analisi *in silico*) degli spot considerati.

Numero dello Spot	Peso molecolare (kDa)/ pI <sup>exp</sup>	Nome della proteina (organismo)	Domini conservati	Punteggio	Peso molecolare (kDa)/ pI <sup>th</sup>	Tipo di analisi
<b>2301</b>	22.7/5.2	Proteina ipotetica ( <i>M. grisea</i> )	Dominio C- terminale di ripetizioni ricche di Leucina	27	17.2; 5.27	MS
<b>1503</b>	28.3/4.2	Proteina Y64G10A.2 ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	Cloacina	80	27.2	Edman
<b>2202</b>	18.1/5.8	Septina ( <i>Agaricus bisporus</i> )	Proteina divisione cellulare. I membri di questa famiglia legano GTP	32	18.7; 4.58	MS
<b>0619</b>	31.1/4.4	AAL134Wp ( <i>Eremothecium gossypii</i> )	RAS	38	41.2; 8.74	MS
<b>2605</b>	42.7/4.7	Proteina ipotetica ( <i>M. grisea</i> )	CTP:fosfocolina citidiltransferasi	42	42.3; 6.35	MS
<b>2403</b>	22.1/7.2	N-Bloccato	ND			Edman
<b>0505</b>	30.2/4.9	Precursore di 1,4- $\beta$ -cellobiosidasi ( <i>Claviceps purpurea</i> )	Glicosil idrolasi	24	49.3; 8.65	MS

L'analisi della porzione N-terminale della proteina corrispondente allo spot 1503 ha dato una sequenza di 12 aminoacidi (SNPVPXAPXQXE) che inserita in banca dati ha mostrato buona omologia con una ipotetica proteina del nematode *Caenorhabditis elegans*. Questa proteina presenta un dominio conservato di cloacina all'interno del quale ricadono anche i frammenti peptidici dello spot ottenuti dalla digestione con tripsina.

La proteina corrispondente allo spot 2301, che su gel 2-D è attivata soprattutto in presenza di *P. ultimum*, ha mostrato una buona omologia con una proteina di *Magnaporthe grisea*; la ricerca di domini conservati all'interno della sequenza trovata ha rilevato la presenza di un dominio C-terminale di ripetizioni ricche di leucine (LRR). La proteina 2202, attivata in particolar modo in seguito all'interazione del fungo antagonista con il patogeno *R. solani*, ha mostrato un'alta similarità con una proteina citoscheletrica di *Agaricus bisporus*, la septina, che ha un dominio conservato che lega il GTP.

La proteina corrispondente allo spot 0619, attivato solo in presenza del patogeno *R. solani* tra quelli saggiati, è stata analizzata mediante analisi di spettrometria di massa. Da questa è emerso che la migliore similarità si ha confrontando la sequenza dello spot con una proteina AAL134W di *Eremothecium gossypii*, avente un dominio conservato RAS in posizione 65-80.

La proteina corrispondente allo spot 2605, attivata in presenza di *B. cinerea*, ha mostrato una significativa omologia quando confrontata con una ipotetica proteina di *M. grisea* avente un dominio CTP (fosfocolina citidiltransferasi) coinvolto nella biosintesi della fosfatidilcolina.

La proteina dello spot 0505 ha mostrato un'alta similarità con il precursore dell'enzima 1,4- $\beta$ -cellobiosidasi di *Claviceps purpurea* con un dominio conservato glicosil idrolasico coinvolto nell'idrolisi della cellulosa.

### **3.5. Saggio di interazione su substrato agarizzato tra *Trichoderma*, foglie di fagiolo ed un patogeno fogliare**

In questo esperimento sono stati analizzati gli spot differenziali prodotti da *T. atroviride* ceppo P1 durante l'interazione con foglie di fagiolo e il patogeno fogliare *B. cinerea*.

Il proteoma di *T. atroviride* allevato da solo è stato usato come controllo rispetto alle condizioni di interazione a due (*Trichoderma* – pianta) e a tre componenti (*Trichoderma*

– pianta – patogeno). In particolare, più di 220 spot differenziali sono stati riscontrati come prodotti *ex novo*, assenti, aumentati o diminuiti quando *Trichoderma* è stato lasciato interagire con la pianta o con la pianta ed il patogeno insieme. Quando la condizione di interazione a tre (*Trichoderma* – pianta- patogeno) è stata confrontata con l’interazione *Trichoderma*- pianta, 57 spot sono stati prodotti *ex novo*, 93 erano presenti solo nel controllo, 25 avevano un’intensità aumentata e 62 diminuita. Ciò indica che la presenza di *B. cinerea* ha provocato importanti cambiamenti nel profilo proteico dell’antagonista durante l’interazione con la pianta (Tab. 11).

**Tabella 11.** Numero di spot differenziali prodotti da *T. atroviride* ceppo P1 (Trc) nelle diverse condizioni di interazione con foglie di fagiolo (Fag) e il patogeno *B. cinerea* (Bc) su piastre di water agar (WA 1,5%).

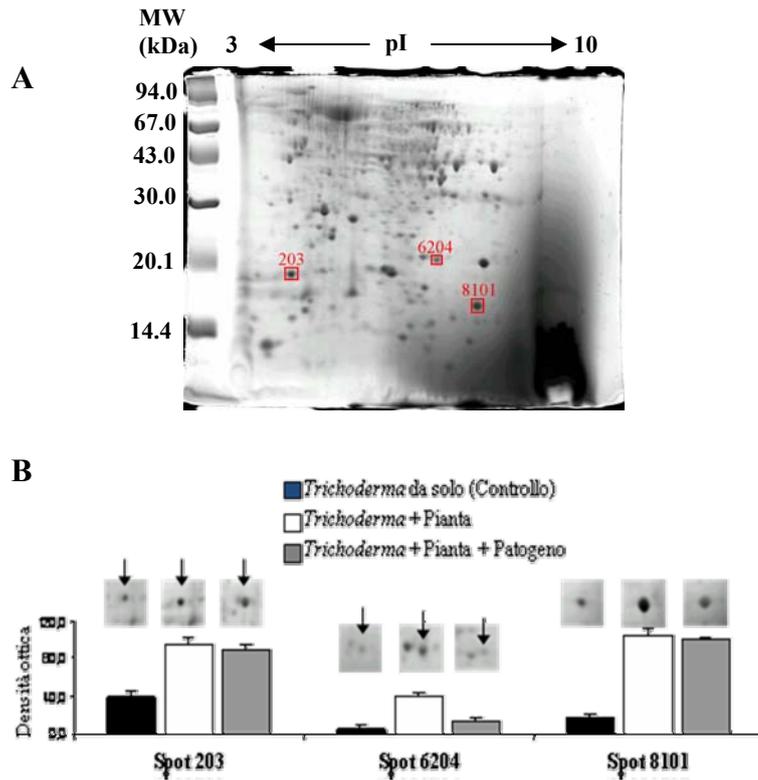
<sup>a</sup> Spot assenti nel controllo (ON) / presenti solo nel controllo (OFF)

<sup>b</sup> Spot la cui intensità è aumentata o è diminuita rispetto al controllo.

Condizione	SPOT totali	ON <sup>a</sup>	OFF <sup>a</sup>	Aumentati <sup>b</sup>	Ridotti <sup>b</sup>
<b>(Trc+Fag) vs. (Trc)</b>	248	82	64	77	25
(Trc+Fag+Bc) vs. (Trc)	222	88	54	45	35
(Trc+Fag+Bc) vs. (Trc+Fag)	237	57	93	25	62

Nell’ambito degli spot differenziali più interessanti, 17 sono stati analizzati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF, ma qui riportiamo i risultati relativi a soli 3 spot (Fig. 17).

L’analisi *in silico* effettuata con il programma Mascot ha rilevato alcune interessanti omologie con proteine note, come mostrato in tabella 12. Queste hanno riguardato, in particolare, una chinasi contenente un dominio conservato DnaJ (spot 203), una proteina simile ad una ciclofillina (spot 6204) ed una chitina sintasi (spot 8101).



**Figura 17.** **A:** Gel bidimensionale delle proteine estratte da *T. atroviride* ceppo P1 a seguito dell'interazione con foglie di fagiolo e *B. cinerea*. Sono evidenziati gli spot analizzati mediante MS MALDI-TOF, su cui è stata condotta l'analisi *in silico*. **B:** Livelli di intensità degli spot prodotti nelle condizioni di non-interazione (*Trichoderma* da solo), interazione a due (*Trichoderma* + pianta) o tre componenti (*Trichoderma* + pianta + patogeno). I cambiamenti delle intensità dei singoli spot sono mostrati nei piccoli riquadri dei gel posti al di sopra dei corrispondenti istogrammi. Ciascuna barra rappresenta la quantità dello spot presente in un gel espressa come Densità Ottica (OD).

## Risultati

**Tabella 12.** Risultati dell'analisi *in silico* di alcuni spot differenziali prodotti da *T. atroviride* ceppo P1 durante l'interazione con foglie di fagiolo e *B. cinerea*. Peso molecolare (kDa)/ pI<sup>ex</sup>/<sup>th</sup>: pesi molecolari e punti isoelettrici sperimentali (ottenuti dai gel) e teorici (ottenuti dall'analisi *in silico*) degli spot considerati.

<sup>a</sup> Ricerca effettuata nel database NCBIInr.

<sup>b</sup> Ricerca effettuata nel database TrichoEST.

Numero dello Spot	Peso molecolare (kDa)/ pI <sup>exp</sup>	Nome della proteina (organismo)	Numero accessione	Domini conservati	Peptidi confrontati	Peso molecolare (kDa)/ pI <sup>th</sup>	Copertura di Sequenza (%)	Punteggio
203 <sup>a</sup>	20.0; 4.7	Chinasi ( <i>Bos taurus</i> )	gi 27807457	Dominio DnaJ	6/6	57.5; 5.60	10	48
6204 <sup>a, b</sup>	22.0; 6.7	Ciclofillina A ( <i>Beauveria bassiana</i> )	gi 23664288	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	5/10	17.5; 8.65	28	47
8101 <sup>a</sup>	16.6; 7.6	Chitina sintasi ( <i>Malbranchea gypsea</i> )	gi 19966	Chitina sintasi	4/8	21.3; 9.32	25	31

Nel proteoma della pianta, la presenza di *Trichoderma* o di *Botrytis* ha determinato un accumulo di proteine differenziali simile (circa 140), come è stato possibile osservare confrontando le interazioni a tre partner rispetto a quelle a due (Tab. 13). In ogni caso, il confronto tra le due interazioni a due componenti (pianta – *Trichoderma* vs. pianta – *Botrytis*) ha evidenziato un risposta differente nel proteoma della pianta alla presenza dell’antagonista o del patogeno. Ad esempio, il fagiolo ha accumulato 43 nuovi spot, 34 erano assenti, 29 incrementati e 19 diminuiti in presenza dell’antagonista rispetto al patogeno.

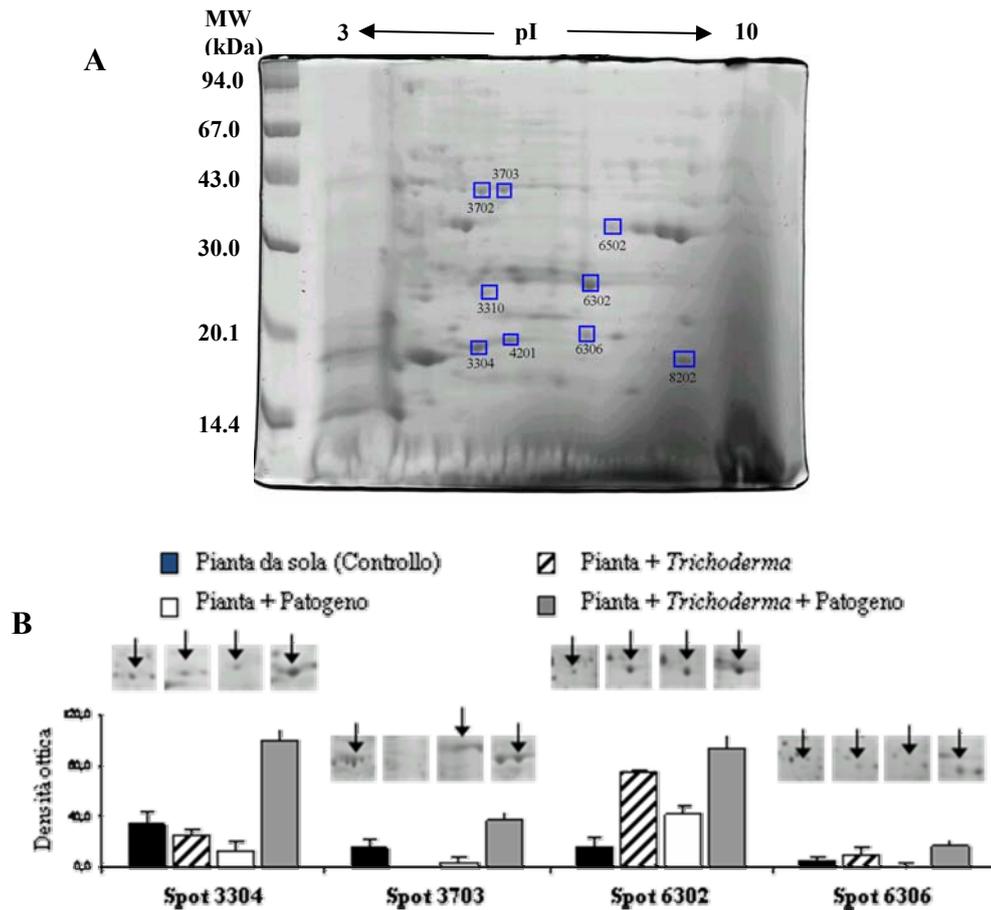
**Tabella 13.** Numero di spot differenziali prodotti dalle foglie di fagiolo (Fag) nelle diverse condizioni di interazione con *T. atroviride* ceppo P1 (Trc) e il patogeno *B. cinerea* (Bc) su piastre di water agar (WA 1,5%).

<sup>a</sup> Spot assenti nel controllo (ON) / presenti solo nel controllo (OFF)

<sup>b</sup> Spot la cui intensità è aumentata o è diminuita rispetto al controllo.

Condizione	SPOT totali	ON <sup>a</sup>	OFF <sup>a</sup>	Aumentati <sup>b</sup>	Ridotti <sup>b</sup>
(Fag+Trc) vs. (Fag)	191	39	87	27	38
(Fag+Bc) vs. (Fag)	267	87	70	39	71
(Fag+Trc+Bc) vs. (Fag)	194	34	78	45	37
(Fag+Trc+Bc) vs. (Fag+Trc)	141	57	53	22	9
(Fag+Trc+Bc) vs. (Fag+Bc)	144	51	49	31	13
(Fag+Trc) vs. (Fag+Bc)	125	43	34	29	19

Quattro dei circa 30 spot selezionati per l’analisi PMF (peptide mass fingerprint) sono riportati in figura 18. In tutti e quattro i casi sono state riscontrate omologie con proteine coinvolte nella risposta di difesa contro patogeni; in particolare le omologie hanno riguardato specifici domini collegati alla resistenza alle malattie, come ad esempio sequenze ricche in leucine, domini conservati SGS e Barwin, sequenze conservate del gruppo della taumatina (Tab. 14).



**Figura 18.** A: Gel bidimensionale delle proteine estratte da foglie di fagiolo durante l'interazione con *T. atroviride* ceppo P1 e *B. cinerea*. Sono evidenziati gli spot analizzati mediante MS MALDI-TOF, su cui è stata condotta l'analisi *in silico*. B: Livelli di intensità degli spot prodotti nelle condizioni di non-interazione (pianta da sola), interazione a due (pianta + *Trichoderma*, pianta + patogeno) o tre componenti (pianta + *Trichoderma* + patogeno). I cambiamenti delle intensità dei singoli spot sono mostrati nei piccoli riquadri dei gel posti al di sopra dei corrispondenti istogrammi. Ciascuna barra rappresenta la quantità dello spot presente in un gel espressa come Densità Ottica (OD).

*Risultati*

**Tabella 14.** Risultati dell'analisi *in silico* degli spot differenziali più interessanti prodotti da foglie di fagiolo che hanno interagito con *T. atroviride* ceppo P1 e *B. cinerea*. Peso molecolare (kDa)/ pI<sup>ex</sup>/<sup>th</sup>: pesi molecolari e punti isoelettrici sperimentali (ottenuti dai gel) e teorici (ottenuti dall'analisi *in silico*) degli spot considerati.

<sup>a</sup> Metodo di identificazione: spettrometro di massa 4700 MALDI TOF/TOF.

Numero dello Spot	Peso molecolare (kDa)/ pI <sup>exp</sup>	Nome della proteina (organismo)	Numero di accessione	Domini conservati	Peptidi confrontati	Peso molecolare (kDa)/ pI <sup>th</sup>	Copertura di Sequenza (%)	Punteggio
<b>3304</b>	19.4; 5.1	Proteina di resistenza simile a RPP8 ( <i>Arabidopsis arenosa</i> )	gi 37783161	Ripetizioni ricche di Leucina (LRR)	5/6	59.6; 6.57	8	32
<b>3703</b>	54.6; 5.2	Proteina simile a SGT ( <i>Brassica oleracea</i> )	gi 40974917	Dominio SGS	6/15	39.0; 4.95	20	40
<b>6302<sup>a</sup></b>	25.4; 6.9	Proteina PR-5b simile alla taumatina ( <i>Cicer arietinum</i> )	gi 3549691	Famiglia della taumatina	-	25.9; 5.26	C.I. %: 100	130
<b>6306</b>	19.6; 6.8	Proteina 4B correlata alla patogenesi ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	gi 19966	PR-proteins della Famiglia Barwin	2/2	15.2; 6.06	16	32

Spot differenziali sono stati riscontrati anche nel pattern proteico del patogeno (*B. cinerea*) in presenza della pianta da sola o in combinazione con *Trichoderma* (ad esempio, 157 e 204 spot differenziali, rispettivamente, nell'interazione con la pianta vs. *Botrytis* da sola e nella interazione a tre componenti vs. l'interazione *Botrytis* – pianta) (Tab. 15). Questi risultati indicano altresì che la presenza di *Trichoderma* induce notevoli cambiamenti nel proteoma della *Botrytis* mentre il fungo interagisce con la pianta.

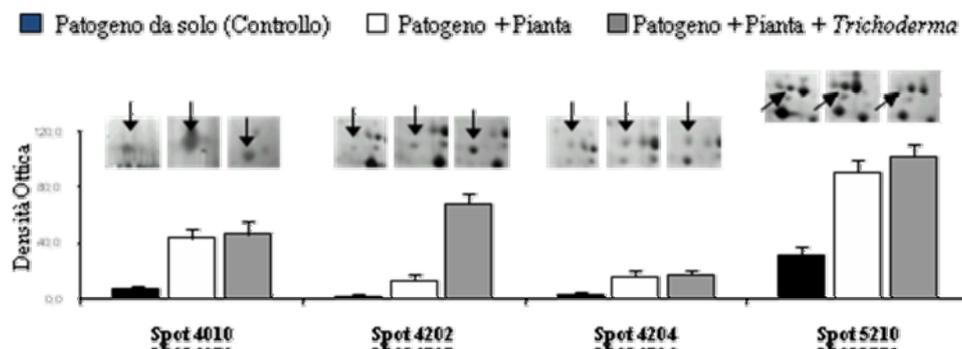
**Tabella 15.** Numero di spot differenziali prodotti dal patogeno *B. cinerea* (Bc) nelle diverse condizioni di interazione con foglie di fagiolo (Fag) e *T. atroviride* ceppo P1 (Trc) su piastre di water agar (WA 1,5%).

<sup>a</sup> Spot assenti nel controllo (ON) / presenti solo nel controllo (OFF).

<sup>b</sup> Spot la cui intensità è aumentata o è diminuita rispetto al controllo.

Condizione	SPOT totali	ON <sup>a</sup>	OFF <sup>a</sup>	Aumentati <sup>b</sup>	Ridotti <sup>b</sup>
<b>(Bc+Fag) vs. (Bc)</b>	157	23	44	44	46
(Bc+Fag+Trc) vs. (Bc)	226	39	38	106	43
(Bc+Fag+Trc) vs. (Bc+Fag)	204	64	15	82	43

Nell'ambito degli spot analizzati mediante tecnica MALDI-TOF/TOF, quattro hanno dato le omologie riportate in tabella 16. Le intensità delle proteine coinvolte nel processo di infezione delle interazioni *Botrytis*-pianta e *Botrytis*-pianta-*Trichoderma* erano significativamente più alte del controllo, come riportato in figura 19.



**Figura 19.** Intensità degli spot differenziali prodotti da *B. cinerea* durante l'interazione con *T. atroviride* ceppo P1 e foglie di fagiolo su cui è stata condotta l'analisi *in silico*. Sono riportati i livelli di intensità degli spot prodotti nelle condizioni di non-interazione (patogeno da solo), interazione a due (patogeno + pianta) o tre componenti (patogeno + pianta + *Trichoderma*). I cambiamenti delle intensità dei singoli spot sono mostrati nei

piccoli riquadri dei gel posti al di sopra dei corrispondenti istogrammi. Ciascuna barra rappresenta la quantità dello spot presente in un gel espressa come Densità Ottica (OD).

**Tabella 16.** Risultati dell'analisi *in silico* degli spot differenziali più interessanti prodotti dal patogeno *B. cinerea* che ha interagito con foglie di fagiolo e *T. atroviride* ceppo P1. Peso molecolare (kDa)/  $pI^{ex}$  /<sup>th</sup>: pesi molecolari e punti isoelettrici sperimentali (ottenuti dai gel) e teorici (ottenuti dall'analisi *in silico*) degli spot considerati. Metodo di identificazione: spettrometria di massa MALDI TOF/TOF.

Numero dello Spot	Peso molecolare (kDa)/ $pI^{exp}$	Nome della proteina (organismo)	Numero di accessione	Punteggio	Peso molecolare (kDa)/ $pI^{th}$	Indice proteico C.I. (%)
4010	12.0; 6.5	cutinasi ( <i>Botryotinia fuckeliana</i> )	gi 1177244	182	16.1; 9.20	100
4202	20.1; 6.3	Superossido dismutasi ( <i>B. fuckeliana</i> )	gi 40642968	121	15.9; 5.85	100
4204	21.1; 6.3	Ciclofillina citosolica 1 ( <i>B. fuckeliana</i> )	gi 33357682	259	19.6; 6.30	100
5210	21.0; 6.9	Putativa ciclofillina mitocondriale ( <i>B. fuckeliana</i> )	gi 33357681	490	24.2; 9.14	100

### 3.6. Saggio di interazione su substrato agarizzato tra *Trichoderma*, radici di fagiolo ed un patogeno terricolo

Quando l'interazione tra *T. atroviride* ceppo P1, radici di fagiolo ed il patogeno terricolo *R. solani* è stata confrontata con l'interazione *Trichoderma*-pianta, oltre 230 spot differenziali si sono accumulati nel proteoma del fungo antagonista. Sessantatre spot sono stati prodotti *ex novo*, 116 erano assenti, 27 incrementati e 29 ridotti (Tab. 17), dimostrando che la presenza di *R. solani* induce seri cambiamenti nel proteoma di *Trichoderma* mentre quest'ultimo interagisce con la pianta. Inoltre, circa 200 spot differenziali (nuovi, assenti, aumentati e ridotti) sono stati prodotti da *Trichoderma* durante l'interazione con la pianta da sola o in combinazione con il patogeno, rispetto alla condizione di controllo (*Trichoderma* allevato da solo).

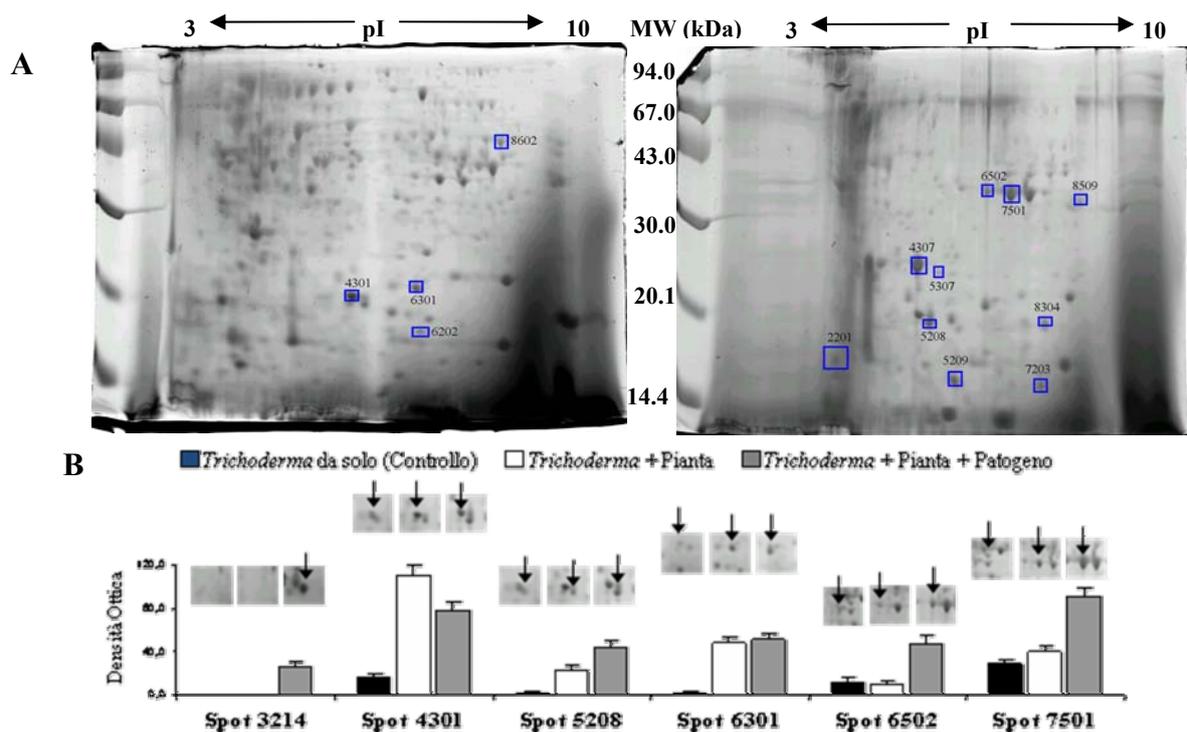
**Tabella 17.** Numero di spot differenziali prodotti da *T. atroviride* ceppo P1 (Trc) nelle diverse condizioni di interazione con radici di fagiolo (Fag) e il patogeno *R. solani* (Rs) su piastre di water agar (WA 1,5%).

<sup>a</sup> Spot assenti nel controllo (ON) / presenti solo nel controllo (OFF)

<sup>b</sup> Spot la cui intensità è aumentata o è diminuita rispetto al controllo.

Condizione	SPOT totali	ON <sup>a</sup>	OFF <sup>a</sup>	Aumentati <sup>b</sup>	Ridotti <sup>b</sup>
<b>(Trc+Fag) vs. (Trc)</b>	215	91	42	65	17
(Trc+Fag+Rs) vs. (Trc)	192	84	66	30	12
(Trc+Fag+Rs) vs. (Trc+Fag)	235	63	116	27	29

La figura 20 mostra i gel 2D su cui sono stati selezionati gli spot ed i loro rispettivi cambiamenti di intensità relative nelle diverse condizioni di interazione. Tali spot sono stati sottoposti alla successiva analisi MS, i cui risultati sono presentati nella tabella 18.



**Figura 20.** A: Gel bidimensionali delle proteine intracellulari prodotte da *T. atroviride* ceppo P1 durante l'interazione con radici di fagiolo (sinistra) e radici di fagiolo + *R. solani* (destra). Sono evidenziati gli spot su cui è stata effettuata l'analisi *in silico*. B: Livelli di intensità degli spot prodotti nelle condizioni di non-interazione (*Trichoderma* da solo), interazione a due (*Trichoderma* + pianta) o tre componenti (*Trichoderma* + pianta + patogeno). I cambiamenti delle intensità dei singoli spot sono mostrati nei piccoli riquadri dei gel posti al di sopra dei corrispondenti istogrammi. Ciascuna barra rappresenta la quantità dello spot presente in un gel espressa come Densità Ottica (OD).

## Risultati

**Tabella 18.** Risultati dell'analisi *in silico* degli spot differenziali più interessanti prodotti da *T. atroviride* ceppo P1 durante l'interazione con radici di fagiolo e *R. solani*. Peso molecolare (kDa)/ pI<sup>ex</sup>/<sup>th</sup>: pesi molecolari e punti isoelettrici sperimentali (ottenuti dai gel) e teorici (ottenuti dall'analisi *in silico*) degli spot considerati.

<sup>a</sup> Ricerca effettuata nel database NCBIInr. <sup>b</sup> Ricerca effettuata nel database TrichoEST.

Numero dello Spot	Peso molecolare (kDa)/ pI <sup>exp</sup>	Nome della proteina (organismo)	Numero di accessione	Domini conservati	Peptidi confrontati	Peso molecolare (kDa)/ pI <sup>th</sup>	Copertura di Sequenza (%)	Punteggio
3214 <sup>a</sup>	14.9; 4.9	Proteina di resistenza alla Brefeldina A ( <i>Schizosaccharomyces pombe</i> )	gi 6473569	Dominio RanBP1	6/16	22.3; 8.95	35	32
4301 <sup>a</sup>	19.8; 5.9	Ciclofillina A ( <i>Bos taurus</i> )	gi 7767529	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	3/4	10.3; 6.26	38	46
4307 <sup>a</sup>	24.8; 5.9	Proteina mitocondriale ribosomiale ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	gi 6323344	Dominio RNase 3	5/13	25.8; 9.21	24	40
5208 <sup>b</sup>	19.2; 6.1	Hex 1- Woronin body major protein ( <i>Trichoderma reesei</i> )	gi 34014958	Eukaryotic initiation factor 5A	4/4	18.4; 9.13	29	63
5209 <sup>a</sup>	15.9; 6.5	Proteina ipotetica ( <i>Magnaporthe grisea</i> )	gi 39964645	Famiglia acetiltransferase (GNAT)	3/6	20.6; 5.46	21	33
5304 <sup>a</sup>	20.1; 6.44	Proteina conservata ( <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> )	gi 76876374	Funzione sconosciuta	4/6	21.1; 4.78	30	51
5632 <sup>a</sup>	36.2; 6.6	Lipoil ligase ( <i>S. cerevisiae</i> )	gi 632368	Proteina Biotin/lipoate A/B famiglia ligase	5/8	37.2; 9.28	14	40

*Risultati*

**Continuo Tabella 18.** Risultati dell'analisi *in silico* degli spot differenziali più interessanti prodotti da *T. atroviride* ceppo P1 durante l'interazione con radici di fagiolo e *R. solani*. Peso molecolare (kDa)/ pI<sup>ex /th</sup>: pesi molecolari e punti isoelettrici sperimentali (ottenuti dai gel) e teorici (ottenuti dall'analisi *in silico*) degli spot considerati.

<sup>a</sup> Ricerca effettuata nel database NCBIInr.

<sup>b</sup> Ricerca effettuata nel database TrichoEST.

Numero dello Spot	Peso molecolare (kDa)/ pI <sup>exp</sup>	Nome della proteina (organismo)	Numero di accessione	Domini conservati	Peptidi confrontati	Peso molecolare (kDa)/ pI <sup>th</sup>	Copertura di Sequenza (%)	Punteggio
6301 <sup>a</sup>	20.9; 6.9	Idrofobina 3 ( <i>Pleurotus ostreatus</i> )	gi 17426760	Idrofobina fungina	3/8	11.2; 7.48	34	30
6502 <sup>a</sup>	35.2; 6.9	Trasportatore di membrana ABC ( <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> )	gi 17826825	Trasportatore ABC	4/5	31.4; 7.14	14	42
7203 <sup>a</sup>	15.6; 7.9	Proteina anonima ( <i>Debaryomyces hansenii</i> )	gi 49656833	Proteina ribosomiale S25	5/13	11.6; 10.24	46	45
7239 <sup>a</sup>	16.5; 8.0	HSP70 ( <i>S. pombe</i> )	gi 6473175	Proteina Hsp70	5/22	19.6; 8.03	36	31
7501 <sup>a</sup>	34.3; 7.3	Componente di trasportatore di membrana ABC ( <i>Ralstonia metallidurans</i> )	gi 22977505	Trasportatore ABC	4/4	38.8; 8.70	8	42
8602 <sup>a</sup>	44.4; 8.3	Proteina sconosciuta ( <i>Xenopus laevis</i> )	gi 47939698	Proteina carrier mitocondriale	6/7	33.1; 9.73	18	60

Lo spot 4301 ha mostrato una grossa similitudine con la ciclofillina A, una proteina contenente un dominio peptidil–prolil-cis-trans isomerasico (PPIase) coinvolto nel protein folding e ipoteticamente in molte altre funzioni cellulari (Arévalo-Rodriguez *et al.*, 2000; Gothel e Marahiel 1999). Lo spot 6301 è stato identificato come un'idrofobina fungina, mentre diversi membri della famiglia dei trasportatori ABC si sono differenzialmente accumulati nel proteoma dell'antagonista (spot 6502 e 7501). Inoltre, una omologia significativa è stata riscontrata tra la proteina corrispondente allo spot 5208 e la proteina Hex1 di *T. reesei* effettuando la ricerca all'interno del database TrichoEST.

Proteine intracellulari sono state estratte anche dalle foglie di fagiolo e analizzate per caratterizzare la risposta di difesa sistemica della pianta le cui radici sono state messe in contatto con i miceli del patogeno e/o dell'antagonista. L'analisi dei profili proteici ottenuti dall'interazione pianta-*Trichoderma-Rhizoctonia* (3 componenti) rispetto a quella pianta-*Trichoderma* (2 componenti) ha indicato la presenza di 127 spot differenziali dovuti alla presenza del patogeno, di cui 40 prodotti *ex novo*, 29 assenti, 28 con intensità aumentata e 30 ridotta (Tab. 19).

**Tabella 19.** Numero di spot differenziali prodotti dalle foglie di fagiolo (Fag) nelle diverse condizioni di interazione con *T. atroviride* ceppo P1 (Trc) e il patogeno *R. solani* (Rs) su piastre di water agar (WA 1,5%).

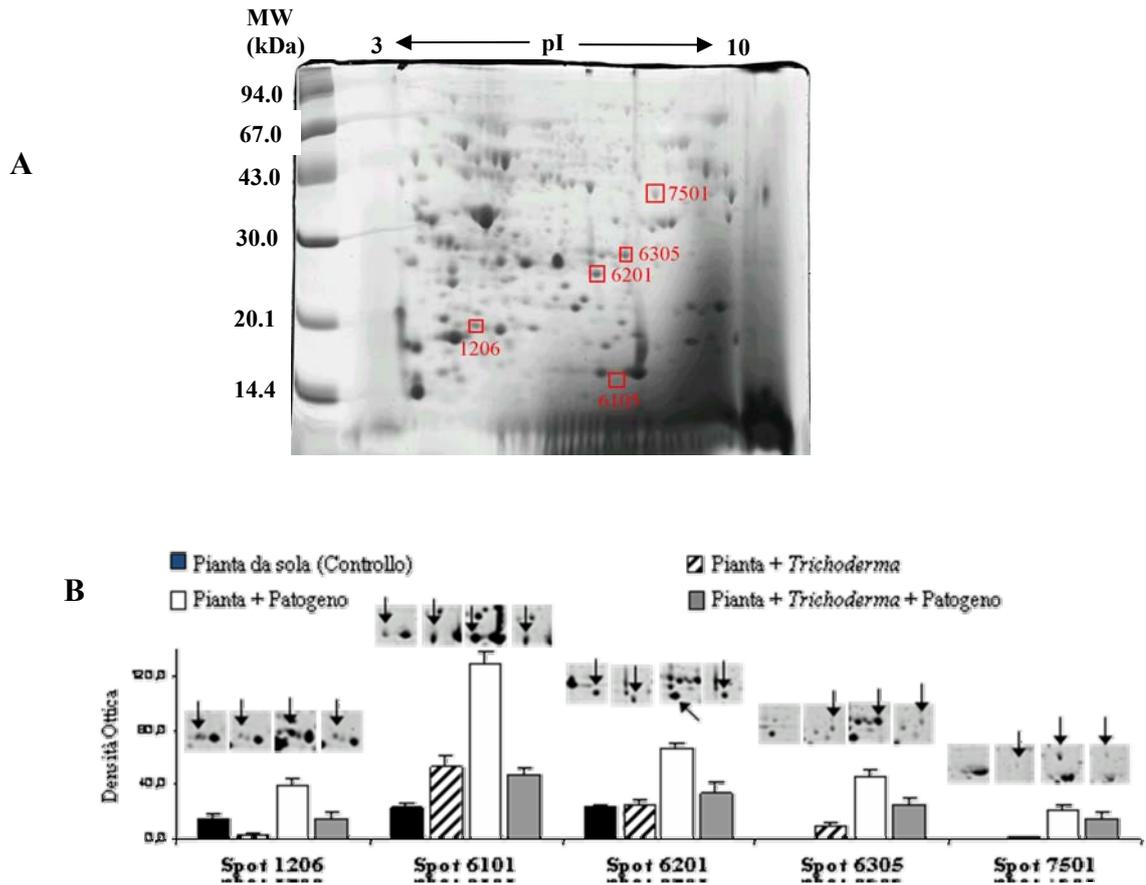
<sup>a</sup> Spot assenti nel controllo (ON) / presenti solo nel controllo (OFF)

<sup>b</sup> Spot la cui intensità è aumentata o è diminuita rispetto al controllo.

Condizione	SPOT totali	ON <sup>a</sup>	OFF <sup>a</sup>	Aumentati <sup>b</sup>	Ridotti <sup>b</sup>
(Fag+Trc) vs. (Fag)	149	37	51	35	26
(Fag+Rs) vs. (Fag)	300	151	23	107	19
(Fag+Trc+Rs) vs. (Fag)	155	45	47	37	26
(Fag+Trc+Rs) vs. (Fag+Trc)	127	40	29	28	30
(Fag+Trc+Rs) vs. (Fag+Rs)	312	28	168	23	93
(Fag+Trc) vs. (Fag+Rs)	306	19	176	20	91

Rispetto al trattamento pianta-patogeno, l'interazione a tre componenti ha prodotto più di 300 spot differenziali: di questi, 28 erano nuovi, 168 assenti, 23 aumentati e 93 diminuiti. La presenza dell'antagonista ha determinato una forte riduzione nel numero e nel livello di accumulo delle proteine vegetali rispetto all'interazione tra la pianta ed il patogeno, che invece ha prodotto il più alto numero di spot differenziali nuovi ed aumentati rispetto alla condizione di controllo (pianta da sola). Inoltre, quando l'interazione pianta-*Rhizoctonia* è stata confrontata con il controllo, 300 spot differenziali sono stati prodotti nel proteoma della pianta, di cui 151 nuovi, 23 assenti, 107 con intensità aumentata e 19 ridotta (Tab. 19).

Dei circa 30 spot differenziali selezionati per l'analisi PMF, 5 sono presentati in figura 21. Gli spot 1206, 6101, 6201 e 6305 hanno mostrato un maggior incremento nei rispettivi valori di intensità relativa quando la pianta era lasciata interagire con il patogeno rispetto all'interazione a tre dove era presente anche l'antagonista fungino. Queste proteine sono risultate essere omologhe di proteine di resistenza o di proteine legate alla patogenesi (PR-proteins), come riportato in tabella 20; inoltre è stata riscontrata la presenza di domini conservati (NB-ARC, NBS-LRR, famiglia Bet v I, etc.) noti per essere coinvolti nelle risposte della pianta a patogeni ed allo stress. Lo spot 7501, omologo di una proteina di resistenza di *Arabidopsis thaliana*, era assente nel controllo (pianta da sola) e indotto dalla presenza del patogeno (sia da solo che in combinazione con *Trichoderma*).



**Figura 21.** A: Gel bidimensionale delle proteine estratte da foglie di fagiolo le cui radici hanno interagito con *T. atroviride* ceppo P1 e *R. solani*. Sono evidenziati gli spot analizzati mediante MS MALDI-TOF, su cui è stata condotta l'analisi *in silico*. B: Livelli di intensità degli spot prodotti nelle condizioni di non-interazione (pianta da sola), interazione a due (pianta + *Trichoderma*, pianta + patogeno) o tre componenti (pianta + *Trichoderma* + patogeno). I cambiamenti delle intensità dei singoli spot sono mostrati nei piccoli riquadri dei gel posti al di sopra dei corrispondenti istogrammi. Ciascuna barra rappresenta la quantità dello spot presente in un gel espressa come Densità Ottica (OD).

*Risultati*

**Tabella 20.** Risultati dell'analisi *in silico* degli spot differenziali più interessanti prodotti da foglie di fagiolo le cui radici che hanno interagito con *T. atroviride* ceppo P1 e *R. solani*. Peso molecolare (kDa)/ pI<sup>ex</sup> /<sup>th</sup>: pesi molecolari e punti isoelettrici sperimentali (ottenuti dai gel) e teorici (ottenuti dall'analisi *in silico*) degli spot considerati.

Numero dello Spot	Peso molecolare (kDa)/ pI <sup>exp</sup>	Nome della proteina (organismo)	Numero di accessione	Domini conservati	Peptidi confrontati	Peso molecolare (kDa)/ pI <sup>th</sup>	Copertura di Sequenza (%)	Punteggio
1206	20.2; 4.4	Proteina di resistenza ( <i>Capsicum annuum</i> )	gi 6648973	NB-ARC	6/11	23.4; 8.20	25	48
6101	15.7; 6.8	Proteina di resistenza di tipo NBS-LRR ( <i>Oryza sativa</i> )	gi 7489504	NB-ARC	7/18	18.7; 5.21	29	35
6201	26.8; 6.5	Pathogenesis-related protein 10c ( <i>Sorghum bicolor</i> )	gi 58978001	PR-protein famiglia Bet v I	5/14	16.8; 5.56	30	39
6305	29.4; 7.0	Ribonuclease-like PR-10a ( <i>Malus x domestica</i> )	gi 15418744	PR-protein famiglia Bet v I	4/11	17.5; 5.62	28	41
7501	40.0; 7.5	Proteina di resistenza simile a RPP8 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	gi 32453361	NBS-LRR	5/6	58.6; 6.28	12	40

I cambiamenti del proteoma del patogeno terricolo *R. solani* sono stati analogamente studiati. Rispetto al controllo, un totale di circa 200 spot (prodotti *ex novo*, assenti, aumentati o ridotti) sono stati ottenuti lasciando *Rhizoctonia* interagire con le radici delle piante, o con le radici delle piante ed il fungo antagonista insieme (Tab. 21). Quando l'interazione *Rhizoctonia*-radici di fagiolo è stata confrontata con quella in cui il patogeno era lasciato da solo, sono stati prodotti nel proteoma del patogeno 37 spot nuovi, 69 assenti, 39 con aumentata intensità e 48 con intensità ridotta. Gli spot differenziali dell'interazione a tre componenti rispetto a quella a due *Rhizoctonia*-pianta, invece, sono stati 81 nuovi, 12 assenti, 51 incrementati e 56 ridotti. I dati indicano che la presenza di *Trichoderma* ha determinato importanti variazioni nel proteoma del patogeno durante la sua interazione con la pianta. Sfortunatamente, i risultati dei circa 20 spot prelevati dai gel, digeriti e analizzati mediante MS non hanno mostrato omologie significative con proteine presenti nel database NCBIInr.

**Tabella 21.** Numero di spot differenziali prodotti dal patogeno *R. solani* (Rs) nelle diverse condizioni di interazione con radici di fagiolo (Fag) e *T. atroviride* ceppo P1 (Trc) su piastre di water agar (WA 1,5%).

<sup>a</sup> Spot assenti nel controllo (ON) / presenti solo nel controllo (OFF)

<sup>b</sup> Spot la cui intensità è aumentata o è diminuita rispetto al controllo.

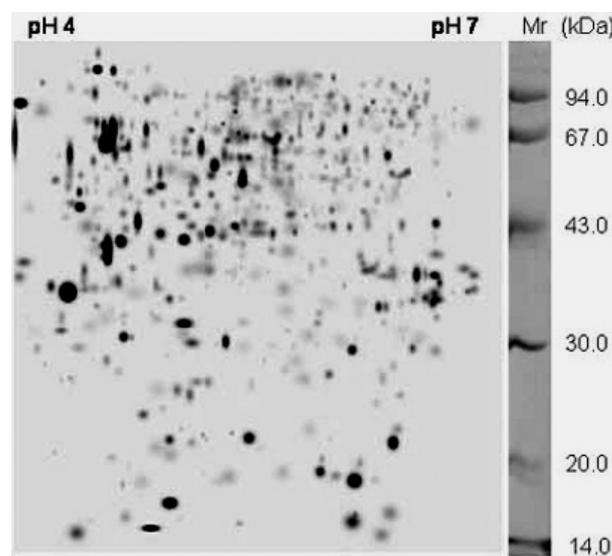
Condizione	SPOT totali	ON <sup>a</sup>	OFF <sup>a</sup>	Aumentati <sup>b</sup>	Ridotti <sup>b</sup>
<b>(Rs+Fag) vs. (Rs)</b>	193	37	69	39	48
(Rs+Fag+Trc) vs. (Rs)	234	89	32	43	70
(Rs+Fag+Trc) vs. (Rs+Fag)	200	81	12	51	56

### 3.7. Analisi delle proteine esocellulari secrete da *T. harzianum* ceppo T22 allevato in condizioni che stimolano le capacità antagonistiche

L'approccio sistematico utilizzato nei precedenti esperimenti è stato applicato anche all'ottenimento e alla successiva analisi delle mappe elettroforetiche bidimensionali delle proteine esocellulari secrete dal ceppo di biocontrollo T22 di *T. harzianum* allevato in diverse condizioni, allo scopo di simulare i processi di biocontrollo e stimolare le capacità di antagonismo del fungo. In particolare la crescita è stata realizzata in mezzo minimo (SM) addizionato della biomassa o delle pareti cellulari di diversi agenti fitopatogeni (*B. cinerea*, *R. solani* e *P. ultimum*). E' infatti ampiamente

riportato in letteratura l'utilizzo di biomassa, pareti cellulari o filtrati colturali di funghi patogeni come condizione che induce nell'antagonista la trascrizione di geni legati al biocontrollo (Baek *et al.*, 1999; Olmedo-Monfil *et al.*, 2002; Pozo *et al.*, 2004).

In figura 22 è riportata l'immagine standard (mappa proteomica) delle proteine esocellulari secrete da *T. harzianum* ceppo T22 cresciuto in presenza della biomassa o delle pareti cellulari dei diversi patogeni fogliari e terricoli. Questa immagine, ricavata con l'ausilio del software PD-Quest della Bio-Rad, contiene in sé tutte le informazioni relative agli spot prodotti dal fungo antagonista nelle interazioni a due componenti esaminate, oltre che nel controllo (*Trichoderma* allevato da solo).



**Figura 22.** Immagine standard 2-D (mappa proteomica) delle proteine esocellulari di *T. harzianum* ceppo T22 allevato in presenza di biomassa o pareti cellulari di diversi agenti fitopatogeni (*B. cinerea*, *R. solani* e *P. ultimum*). Elettroforesi condotte con IPG strip di 7 cm di lunghezza e intervallo di pH 4-7.

Dei circa 60 spot differenziali analizzati mediante Peptide Mass Fingerprint, solo 13 hanno mostrato evidenti omologie con proteine note; i risultati ottenuti sono riportati in tabella 22. Un ulteriore omologo di un trasportatore di membrana della famiglia ABC è stato riscontrato nel secretoma di *Trichoderma*, indotto dalla presenza del patogeno *R. solani*, così come numerosi enzimi degradativi delle pareti cellulari coinvolti nella sua attività di antagonismo. E' interessante sottolineare anche la presenza di omologhi di proteine di virulenza come NIP1 e AvrE, che potrebbero suggerire una sostanziale similarità nell'interazione a livello molecolare della pianta con microrganismi patogeni o saprofiti benefici come *Trichoderma* spp., basata su meccanismi del tipo gene-per-gene e Avr-R.

## Risultati

**Tabella 22.** Risultati dell'analisi *in silico* delle proteine esocellulari differenziali più interessanti prodotte da *T. harzianum* ceppo T22 allevato in presenza di biomassa o pareti cellulari di diversi funghi patogeni. Peso molecolare (kDa)/ pI<sup>ex</sup>/<sup>th</sup>: pesi molecolari e punti isoelettrici sperimentali (ottenuti dai gel) e teorici (ottenuti dall'analisi *in silico*) degli spot considerati.

Numero dello Spot	MW (kDa)/ pI <sup>exp</sup>	Organismo	Nome della proteina	Omologia di sequenza (%)	MW (kDa)/ pI <sup>th</sup>
7009	17/4.5	<i>Rhizosporium secalis</i>	Elicitor NIP1	81	8.8/8.0
3307	33/5.1	<i>Pseudomonas syringae</i>	AvrE protein	30	32.4/6.11
3302	40/4.5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Membro dei trasportatori di membrana della famiglia ABC	11	85/9.19
3502	35/5.4	<i>Neocallimastix frontalis</i>	β-1,4-glucanase	19	54.6/4.8
7401	35/4.5	<i>Candida boidinii</i>	Acidic Protease	13	45/4.7
4001	27/4.0	<i>Bionectria ochroleuca</i>	Serine protease	28	24.8/10.0
4006	28/5.0	<i>Ustilago maydis</i>	Pathogenesis Related protein	25	30/9.6
5503	33/5.7	<i>Bacillus spp</i>	b-xylanase	15	60/5.8
1836	47/4.8	<i>Rhizopus microsporus</i>	Chitinase	18	45.7/6.0
6201	30/5.5	<i>Fusarium solani f.sp. robiniae</i>	Chitosanase	19	31/5.5
2105	25/4.8	<i>Haemophilus somnus</i>	Chitin deacetylase	30	41/5.2
2505	64/4	<i>Neurospora crassa</i>	Alcohol dehydrogenases	26	69.2/9.32
2402	43/4.2	<i>Glomus intraradices</i>	Chitin synthase	14	23/5.1
3502	50/4.8	<i>Rhizopus microsporus</i>	Chitinase	18	45.7/6.35

### **3.8. Studio funzionale di espressione e parziale caratterizzazione di alcune proteine differenziali prodotte da *Trichoderma* nelle interazioni tri-componente esaminate**

I risultati ottenuti dalle indagini condotte mediante analisi proteomica sulle interazioni pianta-patogeno-agente di biocontrollo sono stati il punto di partenza per approfondire le conoscenze in merito ai fattori molecolari coinvolti in questo tipo di interazioni. Nello specifico, per alcune delle proteine differenzialmente accumulate nel proteoma di *Trichoderma* è stato analizzato il ruolo e valutato il coinvolgimento nei meccanismi di biocontrollo messi in atto dal fungo antagonista nell'ambito delle interazioni esaminate.

#### **3.8.1. Le ciclofilline**

L'analisi proteomica delle interazioni pianta-patogeno-antagonista effettuata in questo lavoro di tesi ha evidenziato un accumulo differenziale nel proteoma del fungo antagonista di diverse ciclofilline (Spot 6204 in Tab. 12 e spot 4204 in Tab. 18). Essendo una famiglia di proteine altamente conservata in tutti gli organismi, la loro presenza nel proteoma di *Trichoderma* non è sorprendente, anche se la loro produzione aumenta quando *Trichoderma* interagisce con la pianta, con o senza la presenza del patogeno (Fig. 17 e 20).

##### *3.8.1.1. Analisi di librerie EST di *Trichoderma* spp.*

Un'ulteriore conferma del fatto che le ciclofilline potrebbero essere effettivamente coinvolte nei processi di interazione che il fungo antagonista instaura con la pianta e/o un fungo patogeno, si è avuta effettuando un'analisi di librerie contenenti sequenze EST ottenute allevando diverse specie ed isolati di *Trichoderma* in condizioni che simulavano il biocontrollo. Le condizioni di crescita e i protocolli per l'ottenimento delle librerie sono riportate sul sito internet del progetto TrichoEST (<http://www.trichoderma.org>). La ricerca di sequenze uniche o contigs, effettuata mediante il programma BLASTX, ha evidenziato la presenza di numerose sequenze codificanti per ciclofilline (Tab. 23).

**Tabella 23.** Cloni EST (sequenze uniche o contigs) presenti nelle librerie di *Trichoderma* spp. risultati simili a sequenze geniche codificanti per ciclofilline.

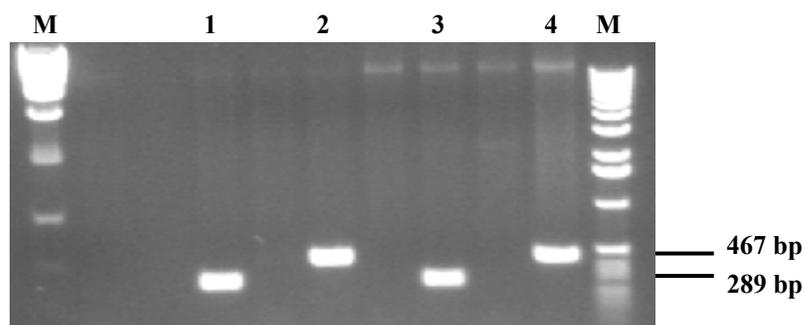
<b>Trichoderma</b>	<b>Contigs [EST count]</b>	<b>Sequenze uniche</b>
<i>T. harzianum</i> CECT 2413 (T34)	<b>T34C418 [20]</b>	<b>L02T34P050R04603</b> <b>L05T34P051R04714</b>
<i>T. atroviride</i> 11 (T11)	N/A	N/A
<i>T. asperellum</i> 53 (T53)	<b>T53C120 [2]</b> <b>T53C103 [11]</b>	<b>L14T53P111R00566</b> <b>L14T53P130R00865</b> <b>L14T53P133R01231</b> <b>L14T53P139R01779</b>
<i>T. longibrachiatum</i> 52 (T52)	<b>T52C8 [3]</b> T52C96 [2]	<b>L19T52P001R00133</b>
<i>T. virens</i> 59 (T59)	<b>T59C170 [5]</b>	<b>L20T59P001R00103</b> <b>L20T59P002R00481</b>
<i>T. viride</i> 78 (T78)	<b>T78C110 [2]</b> <b>T78C129 [3]</b>	<b>L21T78P018R01728</b>
<i>T. aggressivum</i> TH2 (TH2)	N/A	<b>L50TH2P002R00170</b> <b>L50TH2P010R00921</b> <b>L50TH2P018R01697</b> <b>L50TH2P018R01717</b>
<i>T. atroviride</i> P1 (TP1)	<b>TP1C1 [13]</b> <b>TP1C244 [11]</b> <b>TP1C13 [8]</b> <b>TP1C65 [2]</b>	<b>L51TP1P001R00009</b> <b>L51TP1P003R00281</b> <b>L51TP1P006R00505</b> <b>L51TP1P006R00566</b> <b>L51TP1P016R01512</b> <b>L51TP1P018R01691</b> <b>L53TP1P021R02007</b> <b>L53TP1P026R02441</b> <b>L53TP1P026R0245</b>
<i>T. harzianum</i> 9385 (T3K)	<b>T3KC19 [10]</b> <b>T3KC85 [2]</b>	<b>L52T3KP004R00373</b>
<i>T. stromaticum</i> (TST)	<b>TSTC128 [8]</b> TSTC87 [3]	<b>L56TSTP012R01106</b>
<i>T. harzianum</i> A6 (TA6)	N/A	N/A
<i>T. harzianum</i> T22 (T22)	N/A	N/A

Delle oltre 9.300 sequenze EST analizzate (66% del totale;  $e < 10^{-5}$ ), 25 sequenze uniche e 20 contigs sono stati identificati come ciclofilline. Inoltre, i risultati ottenuti mostrano chiaramente che il maggior numero di sequenze simili a ciclofilline (9 sequenze uniche e 4 contigs) è stato riscontrato nelle librerie del ceppo P1 di *T. atroviride*, lo stesso per il quale

era stato registrato un accumulo differenziale di tali proteine nelle interazioni multi-componente esaminate mediante l'analisi proteomica.

*3.8.1.2. Analisi PCR, clonaggio e sequenziamento di frammenti genici codificanti ciclofilline in T. atroviride e T. harzianum*

Per analizzare la presenza di geni codificanti per ciclofilline nel genoma di *T. atroviride* ceppo P1 e *T. harzianum* ceppo T22 sono state disegnate coppie di primer su regioni conservate delle sequenze note di ciclofilline. Le reazioni di PCR effettuate su DNA genomico dei due ceppi hanno dato luogo a due prodotti di amplificazione delle dimensioni attese di 467 e 289 bp, a seconda della coppia di primer utilizzata (Fig. 23).



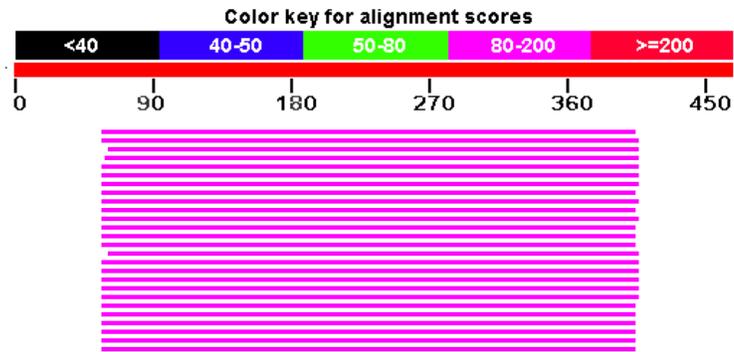
**Figura 23.** Analisi PCR del ceppo P1 di *T. atroviride* (linee 1 e 2) e del ceppo T22 di *T. harzianum* (linee 3 e 4) utilizzando come primer la coppia 1244FOR-00170REV (linee 1 e 3) o la coppia 1244FOR-1244REV (linee 2 e 4). M: marcatore di peso molecolare ( $\lambda$  Hind III a sinistra, 100 bp a destra; Sigma).

I prodotti di PCR ottenuti sono stati successivamente clonati nel vettore pSC-A (Stratagene). L'analisi di restrizione del DNA plasmidico ottenuto da 24 colonie (6 per ogni costrutto) ha evidenziato 4 frammenti delle dimensioni attese. L'analisi delle sequenze ottenute ha accertato che per entrambi i microrganismi la sequenza di 289 bp risultava essere contenuta nella sequenza di 467 bp (dati non mostrati), dal momento che il primer reverse utilizzato nel primo caso (00170REV) era stato disegnato a monte dell'altro. Pertanto si è scelto di proseguire nelle successive analisi con la sequenza ottenuta dal clone di 467 bp del ceppo P1 (Fig. 24), la quale è risultata essere altamente omologa alle

sequenze di geni codificanti per altre ciclofilline presenti in banca dati (Fig. 25). Tale sequenza è stata indicata con la sigla 4P-3.

GGTCGCATCAACTTCAACCTGTACGACGACGTTGTCCCCAAGACCGCCGAGAACTTCCGTGCTCT  
 CTGCACCGGCGAGAAGGGCTTCGGCTACCAGGGCTCATCTTCCACCGTATCATCCCCAACTTCA  
 TGCTCCAGGGTGGTGACTTCAACCGTGGTAACGTATGGCTTCTTCGCCCCAAGAAACAAATTGTT  
 AAAAGACAGTTGACTAACACATCTCCAGGGTACCGGCGGTAAGTCCATCTACGGTGAGAAGTTC  
 GCCGATGAGAACTTCCAGCTGAAGCACGACCGCCCCGGTCTGCTGTCCATGGCCAACGCTGGCC  
 CCAACACGTAAGTCCACTTTTATCAAGCAATTTGATGCGACATGATTGGCTAATTCACGATCCAA  
 ATAGCAACGGCTCCAGTTCTTCATCACCACCGTTGTACCTCTTGGTTGAACGGCCGCCACGTC  
GTCTTCGGCGAGGT

**Figura 24.** Sequenza 4P-3 del clone di *T. atroviride* P1 lunga 467 bp. Sono sottolineati i siti di appaiamento dei primer utilizzati (1244FOR-1244REV).



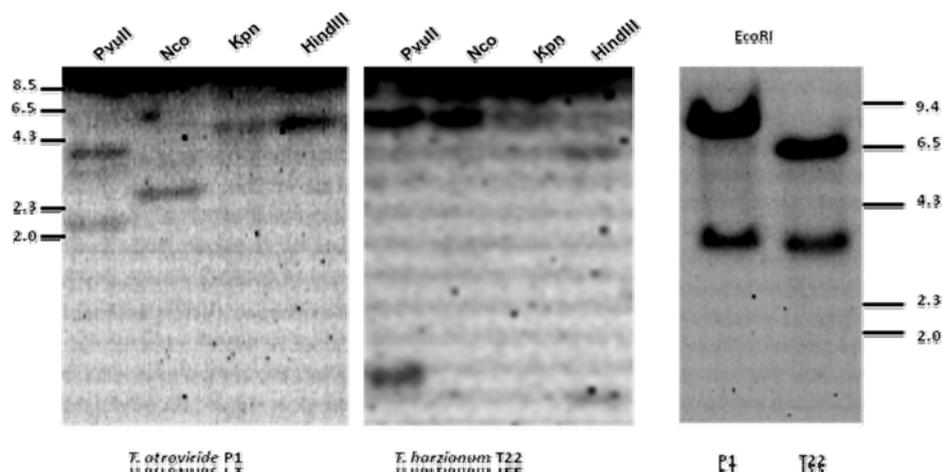
Proteina	Organismo	Punteggio (bits)	E-value
ref XP_001607048.1  similar to putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase isoform 2	<i>Nasonia vitripennis</i>	118	1e-25
ref XP_001644458.1  hypothetical protein Kpol_520p21	<i>Vanderwaltozyma polyspora DSM 70294</i>	118	1e-25
ref XP_001487358.1  hypothetical protein PGUG_00735	<i>Pichia guilliermondii ATCC 6260</i>	118	1e-25
ref XP_451736.1  unnamed protein product	<i>Kluyveromyces lactis</i>	117	2e-25
ref XP_790143.2  PREDICTED: similar to cyclophilin	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	116	4e-25
gb AAB07894.1  cyclophilin A	<i>Trypanosoma congolense</i>	116	5e-25
sp P14088 PPIA_ECHGRPeptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (Rotamase) (Cyclophilin)	<i>Echinococcus granulosus</i>	115	1e-24
gb AAI53776.1 Unknown	<i>Xenopus laevis</i>	114	2e-24
gb ABM55516.1 putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Maconellicoccus hirsutus</i>	114	3e-24
gb AAN31483.1  peptidylprolyl isomerase	<i>Phytophthora infestans</i>	113	4e-24
gb ABD98771.1 putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Graphocephala</i>	112	6e-

gb AAP44537.1  cyclophilin-like protein	<i>atropunctata</i> <i>Triticum aestivum</i>	111	24 1e- 23
---	---	-----	-----------------

**Figura 25.** Analisi BLASTX della sequenza 4P-3 di *T. atroviride* P1.

### 3.8.1.3. Analisi Southern

La sequenza 4P-3 marcata con digossigenina è stata impiegata come sonda per effettuare un'analisi Southern nel genoma di *T. atroviride* P1 e *T. harzianum* ceppo T22. Il DNA genomico di entrambi i ceppi è stato digerito con diversi enzimi di restrizione che presentavano singoli siti di taglio all'interno della sequenza 4P-3 (*Pvu* II, *Nco*, *Kpn* I), ovvero che non tagliavano all'interno di essa (*Eco*RI, *Hind* III). Come ci si aspettava, essendo le ciclofilline una famiglia di proteine ubiquitarie altamente conservata, anche *Trichoderma* ha mostrato di possedere numerose copie di geni codificanti per ciclofilline (come si evince dalla presenza di più bande di ibridazione derivanti dai diversi siti di taglio delle endonucleasi, fig. 26). Inoltre, le condizioni di alta stringenza utilizzate evidenziano una notevole omologia nelle sequenze di geni codificanti ciclofilline di entrambi i ceppi, nonostante la sequenza utilizzata come sonda provenisse dal genoma del ceppo P1 di *T. atroviride*.

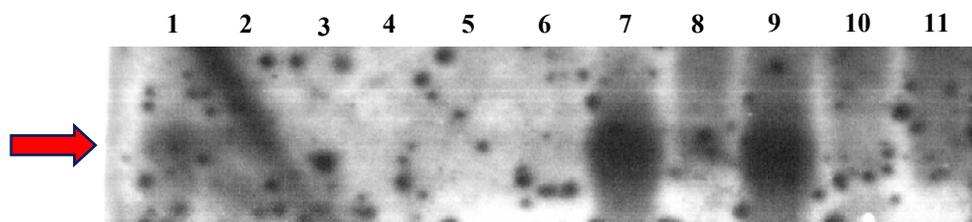


**Figura 26.** Analisi Southern di *T. atroviride* P1 e *T. harzianum* T22. La sequenza 4P-3 marcata con digossigenina è stata utilizzata come sonda su DNA genomico digerito con vari enzimi di restrizione: *Pvu* II, *Nco*, *Kpn* I, *Hind* III, che presentano un singolo sito di taglio interno alla sequenza 4P-3, ed *Eco*RI, che non presenta siti di taglio all'interno della

sequenza. Sono riportati ai lati dei gel i valori di peso molecolare del marcatore, espressi in kb.

#### 3.8.1.4. Analisi northern

Per valutare l'espressione dei geni codificanti per ciclofilline, è stata condotta un'analisi northern su RNA totale estratto dal micelio di *T. atroviride* ceppo P1. Per ottenere la biomassa su cui effettuare l'estrazione dell'RNA, il fungo è stato allevato in diverse condizioni, tra cui stress termico, carenza di nutrienti, interazione con pianta e/o patogeni, etc. I risultati dell'analisi northern hanno rivelato che in *Trichoderma* l'espressione delle ciclofilline è indotta da vari fattori, tra cui presenza di glicerolo, del patogeno *B. cinerea*, del patogeno e della pianta insieme, ed anche, ma in misura inferiore, dalla presenza della sola pianta (Fig. 27).



**Figura 27.** Analisi northern su RNA di *T. atroviride* P1 usando come sonda il frammento genico 4P-3. Gli RNA sono stati ottenuti allevando *Trichoderma* nelle seguenti condizioni: 1= glicerolo 2%; 2 = glucosio 0,5%; 3 = filtrato culturale (FC) di P1; 4 = FC di *R. solani*; 5 = shock termico; 6 = interazione in piastra con micelio di *R. solani*; 7 = interazione in piastra con micelio di *B. cinerea*; 8 = interazione in piastra con micelio di *R. solani* e radici di fagiolo; 9 = interazione in piastra con micelio di *B. cinerea* e foglie di fagiolo; 10 = interazione in piastra con foglie di fagiolo; 11 = interazione in piastra con radici di fagiolo.

#### 3.8.2. Le idrofobine

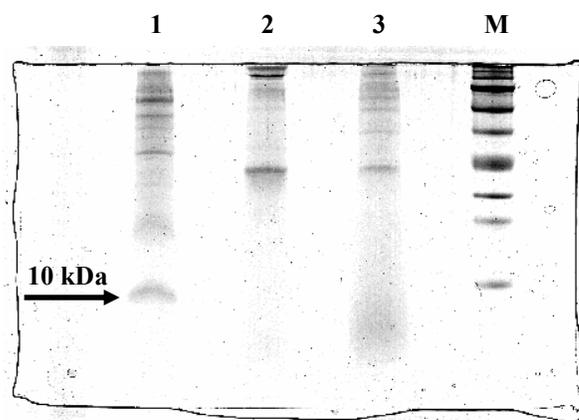
Nell'ambito delle proteine differenziali accumulate nel proteoma del fungo antagonista *T. atroviride* ceppo P1 un'alta similitudine è stata riscontrata tra lo spot 6301 e un'idrofobina fungina di *Pleurotus ostreatus* (Tab. 18). Negli esperimenti condotti in questo lavoro di tesi la produzione di questa proteina è aumentata quando *Trichoderma* è stato lasciato interagire sia in presenza della sola pianta che della pianta e del patogeno terricolo *R. solani* (Fig. 20),

indicando un potenziale coinvolgimento della stessa nelle interazioni che il fungo benefico stabilisce con la pianta. Analogamente l'analisi delle proteine esocellulari di *T. harzianum* ceppo T22 ha evidenziato l'accumulo di omologhi di proteine di avirulenza (Tab. 22), il che non sorprende considerando la natura avirulenta di questi funghi. In particolare un omologo dell'elicatore NIP1 di *Rhizosporium secalis* è risultato simile allo spot 7009 che *Trichoderma* ha secreto durante l'interazione con *R. solani*, il quale presenta un pattern conservato di cisteine tipico delle idrofobine (Rohe *et al.*, 1995).

Dal momento che le idrofobine sembrano coinvolte a vario titolo nell'interazione dei funghi, siano essi benefici o patogeni, con la pianta e/o altri microrganismi, è stato avviato uno studio funzionale dei geni codificanti per questo tipo di proteine nel genoma di diverse specie di *Trichoderma* allo scopo di determinarne ruoli e coinvolgimenti nelle interazioni multi-componente.

### 3.8.2.1. Isolamento di una idrofobina di *Trichoderma* e clonaggio del relativo gene

L'analisi dei filtrati colturali di diverse specie di *Trichoderma* ha evidenziato chiaramente, nel caso del ceppo T22 di *T. harzianum*, la presenza di una proteina con caratteristiche simili al prodotto del gene di avirulenza AVR4 di *Cladosporium fulvum*, ovvero una dimensione di circa 10 kDa e la capacità di legare specificamente la chitina (Fig. 28).



**Figura 28.** SDS-PAGE di frazioni proteiche che si legano alla chitina, provenienti da filtrati colturali di: 1) *T. harzianum* ceppo T22; 2) *T. atroviride* ceppo P1; 3) *T. atroviride* ceppo Fyto822. M: marker.



sequenze regolatrici ADR1 (GGGAGG; AGGGGT) per il gene dell'alcool deidrogenasi, e la sequenza consenso STRE (TGAGGGGT) di geni attivati in risposta a stress (<http://motif.genome.ad.jp>). La regione codificante, senza il peptide segnale, è costituita da 213 bp che codificano per una proteina di 71 amminoacidi, con punto isoelettrico di 7,64 e peso molecolare di 7,22 kDa (Fig. 30).

AVCPTGLFSNPLCCSTNVLDLVGVDCVTPTAAVPDGV  
FFQAHCASKGKQPLCCVAPVAKQ GVLCQKPIGTQ

**Figura 30.** Sequenza aminoacidica della proteina HYTRA1 estratta dal filtrato colturale di *T. harzianum* ceppo T22. Gli 8 residui di cisterna che formano 4 ponti disolfuro, tipici della struttura delle idrofobine, sono sottolineati.

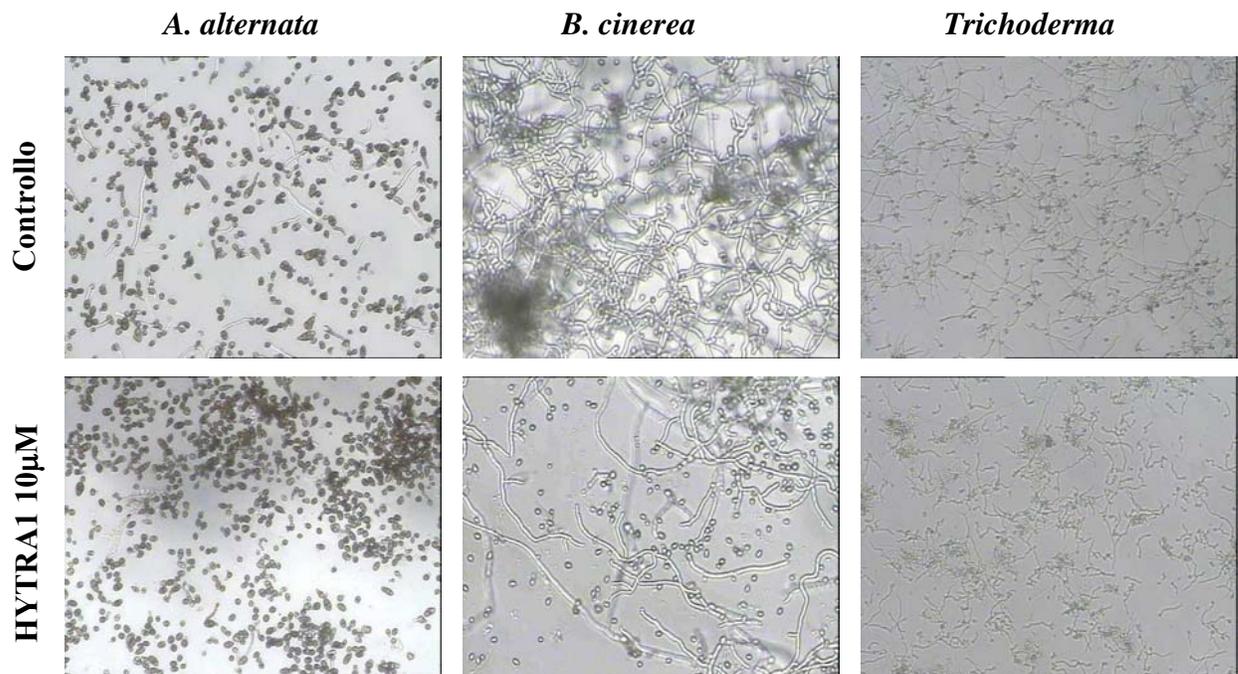
La sequenza aminoacidica di HYTRA1 presenta la tipica conformazione delle idrofobine, ovvero 8 residui di cisteina nelle posizioni conservate, tale da consentire la formazione di 4 ponti disolfuro (Xn-C-X5-10-C-C-X11-44-C-X8-23-C-X5-9-C-C-X6-18-C-Xm).

L'elaborazione di un opportuno protocollo di estrazione di HYTRA1 dal filtrato colturale di *T. harzianum* ceppo T22 ha consentito di ottenere grandi quantità della proteina in tempi relativamente brevi (resa circa 3 mg/100ml substrato). L'idrofobina è stata purificata dal filtrato colturale sfruttando la sua naturale idrofobicità. Infatti, l'isolamento di HYTRA1 in forma relativamente pura ha richiesto l'insufflaggio di aria nel filtrato colturale, da cui era stato allontanato il micelio, e la raccolta della schiuma formatasi. Questa schiuma si è creata come conseguenza dell'aggregazione di HYTRA1 sulla superficie delle bolle di aria (Richards, 1993).

La proteina nativa è stata utilizzata per effettuare saggi di attività *in vitro* ed *in vivo* per valutare la capacità di inibizione dello sviluppo di diversi funghi fitopatogeni ed il suo effetto nell'interazione con la pianta.

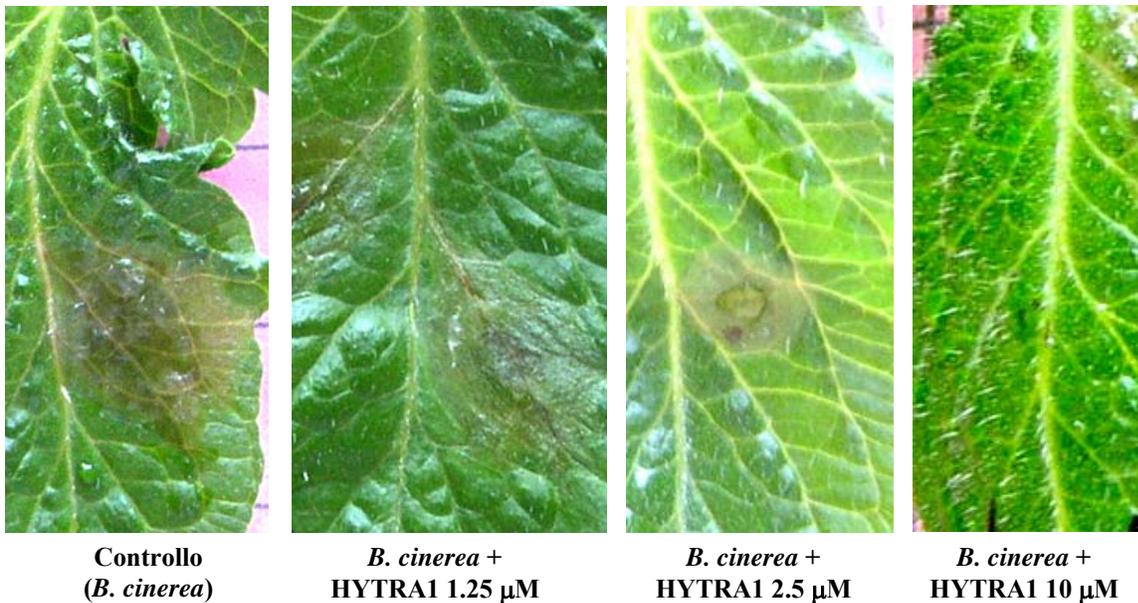
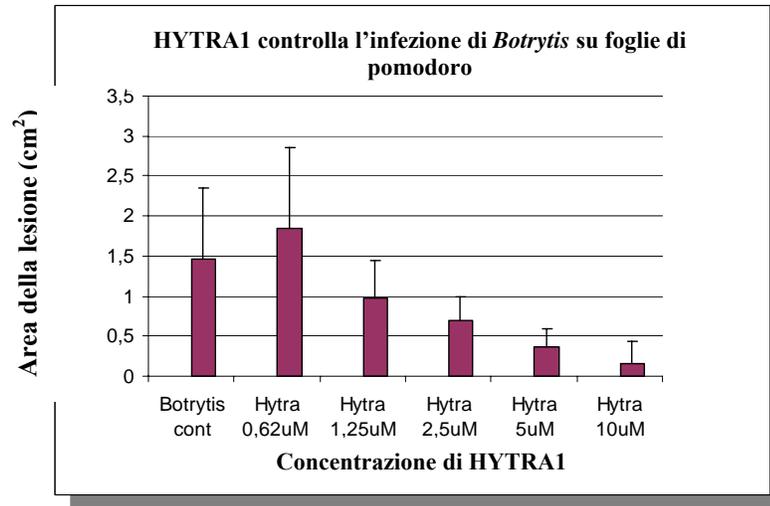
### 3.8.2.2. Saggi di attività di HYTRA1 su funghi patogeni

E' stata valutata la germinazione delle spore di *Alternaria alternata* e *B. cinerea* in presenza di diverse concentrazioni della proteina nativa HYTRA1. Dopo 72h dall'inizio del saggio il numero di spore che aveva iniziato il processo di germinazione è apparso, in particolare nel caso di *B. cinerea*, sensibilmente ridotto quando la proteina era applicata alla concentrazione di 10  $\mu$ M (Fig. 31), laddove quello delle spore di *Trichoderma* non sembra essersi modificato rispetto al controllo.



**Figura 31.** Germinazione delle spore di *A. alternata*, *B. cinerea* e *Trichoderma* in assenza (controllo, sopra) e in presenza (sotto) di HYTRA1 [10  $\mu$ M]. Immagini al microscopio ottico (ingrandimento 40X).

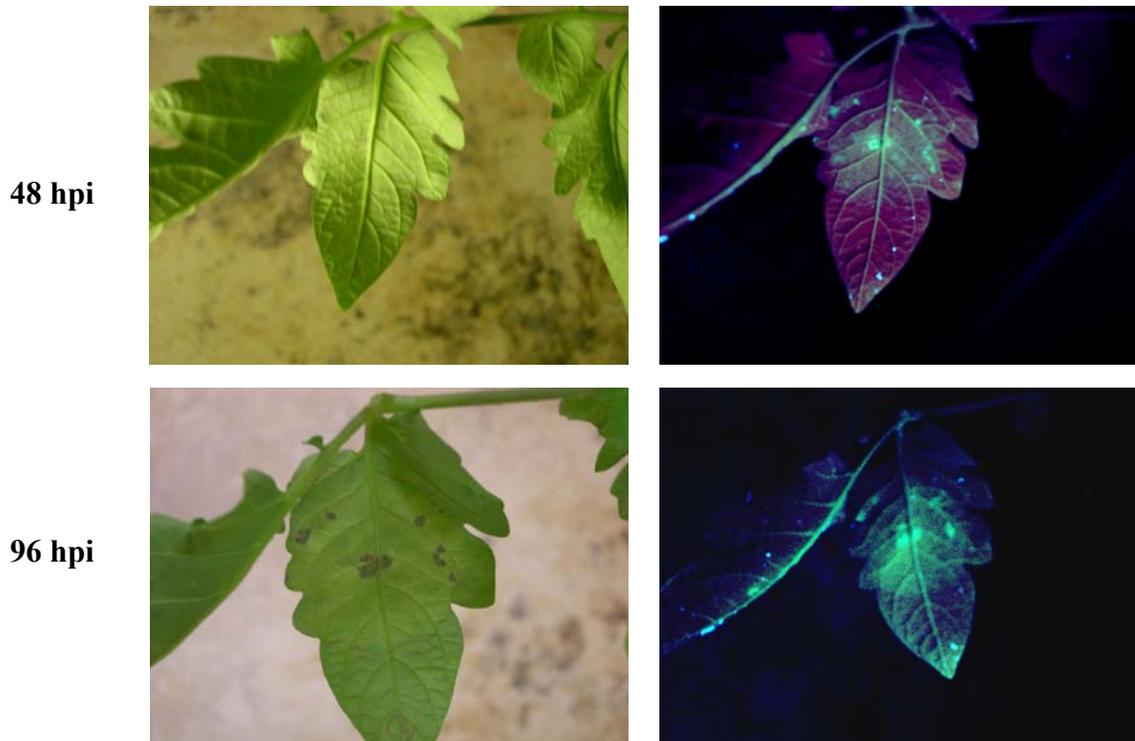
Sono stati condotti anche saggi di attività *in vivo* su piante di pomodoro inoculate artificialmente con una soluzione contenente spore di *B. cinerea* e la proteina nativa HYTRA1. La presenza dell'idrofobina ha determinato una sensibile riduzione della comparsa dei sintomi della patologia, particolarmente evidente a concentrazioni superiori a 2,5  $\mu$ M (Fig. 32).



**Figura 32.** Controllo dell'infezione di *B. cinerea* su piante di pomodoro inoculate con una soluzione contenente le spore del patogeno e l'idrofobina HYTRA1 a diverse concentrazioni. Sopra: grafico relativo alla riduzione dell'area delle lesioni fogliari provocate dal patogeno in presenza di concentrazioni crescenti dell'idrofobina. Sotto: particolare delle foglie di pomodoro inoculate con *B. cinerea* da sola (controllo), o del patogeno + HYTRA1 a diverse concentrazioni (1.25, 2.5 e 10 µM).

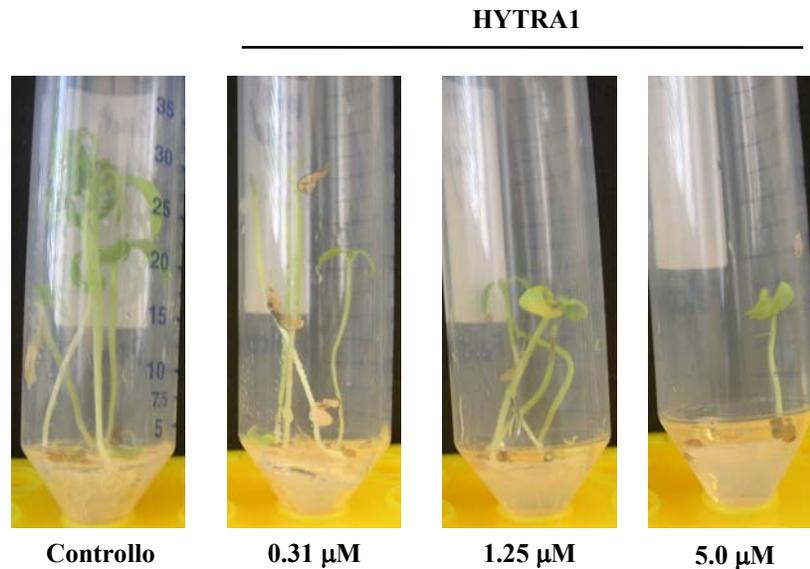
3.8.2.3. *Interazione HYTRA1 - pianta*

L'infiltrazione della proteina nativa HYTRA1 in foglie di pomodoro ha determinato la comparsa di sintomi chiaramente ricollegabili alla risposta ipersensibile (HR). Aree necrotiche fogliari sono state visibili 96 h dopo l'infiltrazione della proteina, ma quando irradiate con luce UV le zone interessate dalla HR si distinguevano già dopo 48 h (Fig. 33).



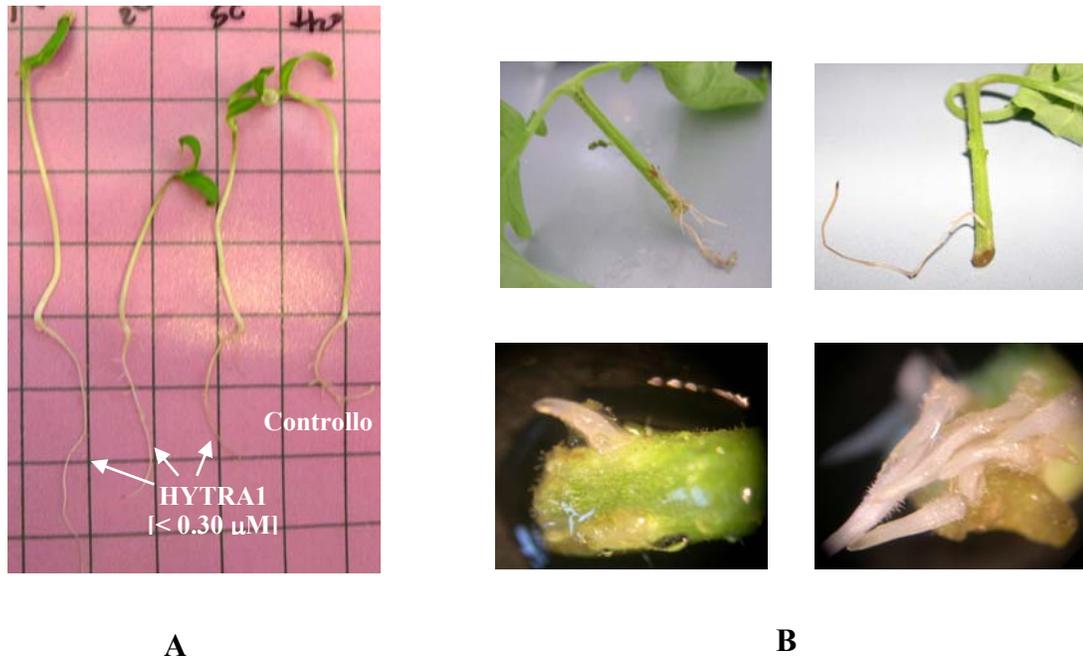
**Figura 33.** Comparsa dei sintomi di una risposta di ipersensibilità (HR) su foglie di pomodoro infiltrate con la proteina nativa HYTRA1 [5  $\mu$ M]. Immagini scattate sotto luce visibile (a sinistra) o ultravioletta (a destra) dopo 48 e 96 h dall'inoculazione.

L'interazione di HYTRA1 con la pianta è stata valutata anche in termini di effetto sulla crescita delle piante *in vitro*. Piantine di pomodoro fatte germinare in un substrato addizionato dell'idrofobina hanno mostrato una riduzione della crescita in termini di altezza delle piantine, rispetto al controllo, quando la concentrazione della proteina nel mezzo era superiore a 0.31  $\mu$ M (Fig. 34).



**Figura 34.** Effetto della presenza di HYTRA1 a varie concentrazioni sulla crescita *in vitro* di piantine di pomodoro cresciute in MS + saccarosio 1%.

Al contrario, quando applicata a basse concentrazioni ( $< 0.30 \mu\text{M}$ ), l'idrofobina HYTRA1 sembra avere un effetto di promozione della crescita e di sviluppo delle radici (Fig. 35). Ciò è stato riscontrato sia quando le piantine di pomodoro erano state allevate in substrato addizionato dell'idrofobina a concentrazioni inferiori a  $0.3 \mu\text{M}$  (Fig. 35-A), sia nel caso di talee di pomodoro immerse in una soluzione contenente HYTRA1 (Fig. 35-B). In questo secondo caso, inoltre, si è assistito alla comparsa di radichette in corrispondenza della porzione di fusto immersa nella soluzione di HYTRA1, indicando che la presenza dell'idrofobina può stimolare efficacemente anche il processo di rizogenesi in pianta.



**Figura 35.** Effetto della presenza di HYTRA1 a varie concentrazioni sulla crescita *in vitro* di piantine di pomodoro. **A:** Allungamento delle radici di piantine di pomodoro cresciute *in vitro* in substrato contenente HYTRA1 a concentrazioni  $< 0.30 \mu\text{M}$ . **B:** Stimolazione della formazione di radici in talee di pomodoro immersi in una soluzione contenete HYTRA1 alla concentrazione di  $0.075 \mu\text{M}$ .

## 4. DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi è stato intrapreso uno studio proteomico dei principali fattori molecolari coinvolti nelle interazioni complesse che si instaurano tra il micoparassita ed agente di biocontrollo *Trichoderma*, la pianta e diversi funghi patogeni. Sono state anche analizzate le variazioni del proteoma del fungo antagonista cresciuto in condizioni di non interazione (presenza di diverse fonti di carbonio) e di induzione dei meccanismi di antagonismo (interazione con funghi patogeni).

L'utilizzo di membrane di cellophane nelle interazioni multi-componente effettuate su piastre di water agar (WA) ha consentito sia il passaggio di molecole e quindi lo svolgimento di un'interazione chimica *in situ*, sia l'estrazione separata ed il recupero selettivo dei singoli proteomi. L'interposizione di tali membrane tra le spore fungine e la superficie dei semi non ha alterato l'effetto di aumento della germinazione e delle rese di produzione dovuto al trattamento con *Trichoderma* (Benítez *et al.*, 1998). Inoltre, Kullnig *et al.* (2000) hanno dimostrato in saggi di confronto diretto su piastra tra *T. atroviride* ceppo P1 e *R. solani* che le membrane di cellophane consentono la diffusione di proteine ad alto peso molecolare (fino a circa 100 kDa), laddove le membrane da dialisi (cut-off 12 kDa) ostacolavano il passaggio delle macromolecole.

I risultati ottenuti dal confronto tra diversi metodi di estrazione delle proteine hanno accertato che la precipitazione a freddo con acido tricloroacetico (TCA) e acetone rappresentava la migliore alternativa sia in termini di quantità che di qualità degli estratti, riuscendo a minimizzare la degradazione delle proteine e la presenza di composti che interferivano con la separazione elettroforetica come polisaccaridi, sali, polifenoli, etc. (Görg *et al.*, 2004).

Cambiamenti del profilo proteico del fungo antagonista *T. harzianum* ceppo T22 sono stati osservati quando questo è allevato in presenza di differenti fonti di carbonio, utilizzate come sorgenti di energia. È stato dimostrato che l'aggiunta di zuccheri semplici come il glucosio aumenta la crescita iniziale del fungo antagonista e reprime la sintesi di enzimi che degradano la parete cellulare (CWDE) e di molte altre idrolasi (Carsolio *et al.*, 1994; Donzelli e Harman, 2001; Peterbauer *et al.*, 1996; Tronsmo e Harman, 1992).

I risultati ottenuti dimostrano che in *Trichoderma* l'aggiunta di glucosio ad alte concentrazioni (4% w/v) induce la produzione di un maggior numero di proteine *ex*

*novo* rispetto al controllo (crescita in glicerolo 2%; Tab. 7). Il numero degli spot incrementati è stato invece superiore in presenza di saccarosio (1% w/v).

Sandhya e collaboratori (2004) hanno dimostrato che la produzione di chitinasi in *T. harzianum* TUBF 966 aumenta quando glucosio e saccarosio sono addizionati al mezzo di coltura contenente chitina colloidale. Si può supporre, quindi, che anche in un mezzo minimo come quello utilizzato in questi esperimenti (Salt Medium, SM) l'aggiunta di fonti di carbonio addizionali induca la produzione di un maggior numero di proteine. Inoltre, dal momento che in condizioni di crescita saprofitica *Trichoderma* è in grado di utilizzare le sostanze secrete dalle radici vegetali (contenenti per lo più disaccaridi e zuccheri complessi), è plausibile che si sia verificata un'attivazione preferenziale del pathway metabolico di assimilazione del saccarosio rispetto a quello del glucosio nelle condizioni da noi saggiate.

Per valutare le proteine coinvolte nella risposta antagonistica, è stata condotta un'analisi proteomica degli estratti proteici di *T. harzianum* cresciuto in mezzo liquido in condizioni di induzione. A questo scopo sono stati utilizzati filtrati colturali e biomassa addizionata di pareti cellulari di patogeni fogliari e terricoli (*P. ultimum*, *R. solani* e *B. cinerea*). La presenza nei filtrati colturali di CWDE, come pure di molecole che agiscono nel micelio o nelle pareti cellulari dei patogeni come fattori di riconoscimento, hanno indotto nel proteoma del fungo antagonista sensibili cambiamenti, così come descritto a livello genomico nelle interazioni patogeno - antagonista (Zeilinger *et al.*, 1999; Woo *et al.*, 2003).

L'interazione in mezzo liquido con i funghi patogeni ha indotto la produzione di numerose proteine differenziali in *T. harzianum*; difatti sono incrementati sia il numero totale di spot sia il numero di proteine prodotte *ex novo* rispetto al controllo, soprattutto in presenza del patogeno radicale *P. ultimum* (Tab. 8). La presenza di patogeni comporta l'attivazione di numerosi geni di *Trichoderma* spp. codificanti per CWDE, particolarmente chitinasi e glucanasi (Zeilinger *et al.*, 1999; Harman *et al.*, 2004a; Elad e Kapat, 1999; Lorito, 1998).

L'analisi dei gel bidimensionali derivati dall'interazione di *T. harzianum* ceppo T22 con la biomassa di *P. ultimum* e *R. solani* ha evidenziato un incremento nella produzione di proteine con una massa molecolare compresa tra 30 e 94 kDa e punto isoelettrico tra 4 e 7. Evidenze sperimentali hanno dimostrato che nei gel 2-D delle proteine prodotte da *Trichoderma* in seguito all'interazione con le pareti cellulari di *R. solani* si evidenziano

proteine differenziali con peso molecolare e punto isoelettrico analoghi a quelli da noi riscontrati, e che presentano omologia con proteine indotte da stress termico (Heat shock proteins) e CWDE (Grinyer *et al.*, 2005).

L'interazione a tre componenti pianta-patogeno-antagonista è stata valutata con un approccio che simula l'antagonismo *in vivo*, ovvero è stato riprodotto su un mezzo solido il contatto tra un agente di biocontrollo, una pianta e/o un fungo patogeno. Questo sistema permette di caratterizzare i livelli di accumulo delle proteine coinvolte nell'interazione complessa tri-componente e di studiare le specie proteiche che cambiano qualitativamente e quantitativamente.

Negli esperimenti che hanno visto coinvolti *T. harzianum* ceppo T22, piantine di pomodoro e diversi agenti fitopatogeni, il numero di spot differenziali è aumentato soprattutto quando *Trichoderma* è cresciuto in presenza dei patogeni terricoli *R. solani* e *P. ultimum*, piuttosto che in presenza del patogeno fogliare *B. cinerea* (Tab. 9).

Nell'ambito delle proteine di *Trichoderma* su cui è stata effettuata un'analisi *in silico*, sono stati identificati alcuni fattori potenzialmente coinvolti nella risposta del fungo allo stress, tra cui omologhi di una proteina di *C. elegans* che presenta un dominio conservato di cloacina (spot 1503) e di una septina di *A. bisporus* (spot 2202) coinvolta tra l'altro nella sintesi della chitina.

Una alta similarità con un precursore di una 1,4- $\beta$ -cellobiosidasi di *C. purpurea* è stata ottenuta per la proteina corrispondente allo spot 0505. Questa proteina possiede un dominio glicosil idrolasico presente negli enzimi cellulolitici dei funghi; questi enzimi comprendono cellobiosidasi I (Cel7A) ed endoglucanasi I (Cel7B) di *T. reesei* (Schmoll e Kubicek, 2003). È interessante notare che questa proteina si è accumulata solo in presenza del patogeno *P. ultimum* tra quelli saggiati, e quindi potrebbe essere coinvolta specificamente nell'interazione di *Trichoderma* con questo patogeno. Il principale componente delle pareti cellulari degli Oomiceti, di cui fa parte appunto il genere *Pythium*, è la cellulosa (Bartnicki-Garcia, 1968). Migheli *et al.* (1994) hanno dimostrato che la sovra-espressione di enzimi cellulolitici in ceppi trasformanti di *T. longibrachiatum* riduce significativamente l'incidenza della malattia provocata da *P. ultimum* su cetriolo. Questi risultati confermano l'importanza e il coinvolgimento dell'attività cellulolitica di *Trichoderma* nel biocontrollo di *P. ultimum*.

Durante l'interazione di *T. atroviride* ceppo P1 con tessuti di fagiolo e i funghi patogeni *B. cinerea* e *R. solani*, sono stati osservati profondi cambiamenti nel proteoma

dell'antagonista se confrontato con la condizione a due partner antagonista-pianta. In particolare, la presenza del fungo patogeno (sia *Botrytis* che *Rhizoctonia*) ha modificato pesantemente il pattern di espressione delle proteine dell'antagonista durante l'interazione con la pianta. Molti spot assenti nell'interazione tri-componente (93 spot nel caso di *Botrytis* e 116 in quello di *Rhizoctonia*) erano invece presenti nella condizione *Trichoderma*-pianta (Tab. 11 e 17). Probabilmente l'attività dei composti secreti da ciascuno dei due patogeni può avere interferito con l'espressione dei geni di *Trichoderma* usati per interagire con la pianta. In alternativa, l'aumento della produzione di proteine esocellulari (CWDE, antibiotici, etc.) che segue l'attivazione dei meccanismi di antagonismo/micoparassitismo potrebbe essere associata ad una riduzione del numero delle specie proteiche intracellulari.

Nel proteoma del fagiolo l'interazione con ciascun patogeno ha prodotto un numero maggiore di proteine rispetto all'interazione con l'antagonista da solo o alla combinazione di entrambi i funghi (Tab. 13 e 19). Come era prevedibile, *Trichoderma* ha indotto un differente set di proteine vegetali rispetto al patogeno, e la presenza del fungo benefico ha chiaramente modificato il pattern di espressione dei geni della pianta in risposta all'attacco del patogeno, il che può essere collegato ad un aumentato controllo del patogeno. Infatti, alcuni spot analizzati mediante PMF corrispondono a PR-proteins ed erano meno sovra-espressi quando sia *Trichoderma* che il patogeno interagivano con la pianta, rispetto al patogeno da solo. Sia *B. cinerea* sia *R. solani* hanno prodotto il maggior numero di spot differenziali nuovi ed incrementati rispetto al controllo (la pianta da sola), confermando così che la presenza dell'antagonista modifica in maniera determinante il proteoma della pianta attaccata da un patogeno. Questi risultati sottolineano l'importanza di condurre analisi comparative delle interazioni multiple coinvolte nei processi di biocontrollo e di patogenesi.

Gli spot differenziali analizzati mediante PMF sono stati selezionati confrontando i cambiamenti dei proteomi di ciascun componente delle interazioni considerato da solo, o in presenza di uno o entrambi gli altri partner. Sono stati presi in considerazione quegli spot che hanno mostrato le differenze qualitative o quantitative più evidenti e riproducibili. Oltre al semplice confronto delle sequenze presenti nelle banca dati NCBIInr e TrichoEST, è stato anche verificato se i frammenti peptidici ottenuti dall'analisi di spettrometria di massa si sovrapponevano alle sequenze di domini conservati presenti nelle proteine note. Questo, unitamente alle omologie di peso

molecolare, punto isoelettrico, specie, ecc.. ha permesso di ottenere un risultato utile dall'analisi *in silico* (Wilkins e Williams, 1997).

Sono state riscontrate numerose proteine interessanti tra quelle differenzialmente espresse nel proteoma di *T. atroviride* ceppo P1 durante l'interazione con le foglie di fagiolo ed il patogeno *B. cinerea* (Tab. 12), o con le radici di fagiolo ed il patogeno *R. solani* (Tab. 18). E' stato identificato l'omologo di una Heat Shock Protein (spot 203), la cui intensità è aumentata in presenza sia della pianta sia del patogeno. Questa proteina presenta un dominio conservato DnaJ tipicamente legato agli stress ambientali (Lindquist, 1986; Morimoto *et al.*, 1994) e probabilmente associato alle risposte di difesa di *Trichoderma*. Lo spot 8101, la cui intensità è aumentata soprattutto in presenza della pianta (con o senza il patogeno), è risultato omologo di un enzima, una chitina sintasi, coinvolto nella sintesi dei componenti della parete cellulare successiva a stress di varia natura. Questa proteina può essere dunque un fattore che *Trichoderma* produce in situazioni di stress particolarmente elevate, dal momento che l'espressione di geni codificanti per glucano e chitina sintasi può essere richiesta per riparare i danni alla parete cellulare provocati dagli enzimi di un patogeno o della pianta (Valdivia *et al.*, 2003). Analogamente lo spot 5208, che corrisponde alla proteina Hex1 di *T. reesei* mostrando valori analoghi di peso molecolare e punto isoelettrico (Lim *et al.*, 2001), ha raddoppiato la sua intensità in presenza del patogeno (interazione a tre vs. interazione a due componenti). Hex1 è una delle proteine più abbondanti nelle pareti cellulari fungine, principalmente concentrata nel corpo di Woronin, ed è associata alla riparazione delle ife danneggiate (Jedd e Chua 2000).

Nel proteoma dell'antagonista durante l'analisi delle interazioni a tre componenti, sia con *B. cinerea* che con *R. solani*, sono state riscontrate omologie anche con diversi membri della famiglia delle ciclofilline. Le ciclofilline possiedono un'attività enzimatica di tipo isomerasico (PPIase) che è stato dimostrato avere un ruolo nella formazione conformazionale delle proteine (Marks, 1996) come pure nella trasduzione del segnale, nella regolazione del ciclo cellulare, nel differenziamento e mantenimento della stabilità dei complessi multi-proteina, etc. (Arévalo-Rodriguez *et al.*, 2000; Gotherl e Marahiel, 1999). Una proteina con un'ipotetica attività PPIase era stata precedentemente identificata mediante LC-MS/MS nel proteoma di *T. harzianum* allevato in coltura liquida (Grinyer *et al.*, 2004b). Queste proteine potrebbero essere impiegate da *Trichoderma* in una vasta gamma di processi, compreso l'interazione con

la pianta dal momento che l'intensità relativa degli spot identificati è notevolmente aumentata in presenza delle foglie o delle radici della pianta.

Gli spot 6502 e 7501 sono stati entrambi identificati come pompe di membrana della famiglia dei trasportatori ABC, e potrebbero essere ricollegabili alla ben nota capacità di *Trichoderma* di resistere alle sostanze tossiche naturali, ai composti antimicrobici, ai pesticidi di sintesi e agli inquinanti ambientali (Harman *et al.*, 2004a, b).

Recentemente, alcuni geni codificanti per trasportatori ABC sono stati clonati da *T. atroviride* ceppo P1 (Lanzuise *et al.*, 2002), e la loro espressione è risultata particolarmente stimolata dai filtrati culturali di diversi patogeni (*B. cinerea*, *R. solani*, *P. ultimum*; Woo *et al.*, 2006). Inoltre, i promotori di questi geni possiedono numerosi siti di riconoscimento per fattori di regolazione corrispondenti a quelli di una endochitinasi coinvolta nell'attività di biocontrollo (Lorito *et al.*, 1996b). Questi risultati, assieme alla considerazione che l'intensità relativa dello spot 7501 è aumentata in presenza della pianta e di *R. solani*, suggeriscono che diversi trasportatori ABC possono sostenere l'antagonismo di *Trichoderma* e la sua capacità di colonizzare le radici delle piante. Lo spot 3214 ha dato una buona omologia con una proteina che conferisce resistenza alla tossina fungina brefeldina A, la quale interferisce con i processi di secrezione e trasporto (Fujiwara *et al.*, 1988); pertanto la proteina corrispondente a questo spot potrebbe essere coinvolta nei processi di detossificazione cellulare. Recentemente Liu e Yang (2005) hanno dimostrato, mediante un approccio basato sull'analisi delle sequenze EST, la presenza in *T. harzianum* dell'RNA di un'altra proteina di resistenza alla brefeldina A (numero di accessione P41820). Questi dati supportano l'ipotesi che *Trichoderma* possiede una varietà di meccanismi per proteggersi dalle tossine microbiche e vegetali, e che "selezioni" di volta in volta quella più idonea al confronto con un certo microrganismo o una tale pianta.

Una idrofobina fungina ha mostrato la migliore omologia con lo spot 6301. Queste proteine aiutano i funghi a penetrare attraverso le barriere e possono avere funzione strutturale (Linder *et al.*, 2005; Wösten, 2001), oltre ad intervenire nell'adesione dei funghi patogeni alla superficie della pianta ospite (Kershaw e Talbot, 1998). Diversi geni codificanti per idrofobine sono stati trovati nel genoma di *Trichoderma*, ma il loro ruolo non è ancora del tutto chiaro (Linder *et al.*, 2005). Recentemente Viterbo e Chet (2006) hanno dimostrato il coinvolgimento di una nuova idrofobina di *T. asperellum* (TasHyd1) nella colonizzazione delle radici di cetriolo in coltura idroponica, ed

analogamente Benítez et al. (2004) suggeriscono che le idrofobine sono sovra-espresse durante la colonizzazione delle radici di pomodoro da parte di *Trichoderma* spp.

Le proteine differenziali trovate nel proteoma del patogeno *B. cinerea* comprendono la cutinasi prodotta dal gene *cutA*, importante per il processo di infezione (van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1997), diverse isoforme della ciclofillina 1, che agirebbe come fattore di virulenza nella penetrazione del patogeno o nella crescita in pianta (Viaud *et al.*, 2003), ed una superossido dismutasi (SOD) che può agevolare la patogenicità rimuovendo le specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte dalla pianta (Gil-ad *et al.*, 2000). La sovra-espressione della SOD in *B. cinerea* può essere collegata all'induzione dei meccanismi di resistenza in pianta da parte di *Trichoderma*, dal momento che l'intensità dello spot relativo è notevolmente aumentata quando l'antagonista era aggiunto all'interazione *B. cinerea*-fagiolo.

Una grande varietà di proteine differenziali è stata identificata nel proteoma del fagiolo durante l'interazione con i patogeni, l'antagonista ed entrambi i funghi (Tab. 14 e 20). L'analisi *in silico* dei dati relativi alle interazioni *Botrytis*-foglie di fagiolo e *Trichoderma*-foglie di fagiolo ha rivelato la presenza di molti omologhi di PR-proteins. Sono stati trovati domini conservati come ripetizioni ricche di leucina (LRR), siti di legame dei nucleotidi (NBS) e domini SGS, così come sequenze conservate delle famiglie di proteine PR Barwin e Bet v I. Ad esempio, una proteina della famiglia PR-4 contenente un dominio Barwin (spot 6306) e una proteina simile alla taumatina (spot 6302) coinvolta nella risposta di difesa del riso a *M. grisea* (Kim *et al.*, 2004) si sono accumulate in maniera differenziale nel proteoma della pianta in presenza di *Trichoderma* da solo o in combinazione con *B. cinerea*. Alcuni spot differenziali presenti nel proteoma delle foglie di fagiolo, le cui radici hanno interagito con *T. atroviride* e *R. solani*, hanno mostrato un alto livello di similitudine con proteine di resistenza o coinvolte nel riconoscimento del patogeno. Sono state difatti riscontrate diverse omologie con PR-proteins o con proteine coinvolte nell'attivazione dei meccanismi di difesa, incluso una proteina del tipo NBS-LRR (spot 6101) che può riconoscere i prodotti del patogeno e indurre le risposte di difesa come l'apoptosi e la risposta ipersensibile (Moffett *et al.*, 2002). Queste proteine si sono accumulate nel proteoma della pianta particolarmente in presenza di *R. solani*, cosa non sorprendente considerando l'attivazione dei meccanismi di difesa della pianta dopo l'attacco di un patogeno. In molti casi, poi, gli spot che corrispondevano ai fattori di difesa hanno

mostrato una riduzione dell'intensità quando *Trichoderma* era presente rispetto alla condizione di interazione pianta-patogeno, il che è in accordo con le differenze riscontrate in termini di variazioni del numero di spot differenziali (vedi sopra). Questi risultati indicano che specifici geni di resistenza possono regolare l'interazione pianta-*Trichoderma-R. solani* e che la presenza dell'antagonista può ridurre quantitativamente o qualitativamente il pattern proteico della pianta prodotto in risposta al patogeno. Ad ogni modo, l'aggiunta di *Trichoderma* all'interazione, sia da solo che in combinazione con *B. cinerea*, ha indotto l'aumento della produzione di almeno due PR-proteins (spot 6302 e 6306), suggerendo l'attivazione di una specifica risposta di difesa della pianta all'agente di biocontrollo (Yedidia *et al.*, 2000, 2003). A tale proposito, il semplice confronto tra le condizioni pianta-*Trichoderma* vs. pianta da sola (controllo) ha indicato ben 191 spot differenziali, di cui 39 prodotti *ex novo*, 87 assenti, 27 con intensità aumentata e 38 ridotta (Tab. 13).

L'analisi delle proteine esocellulari prodotte da *T. harzianum* durante l'interazione con *R. solani* ha indicato la produzione di fattori omologhi a prodotti dei geni di avirulenza come AvrE e NIP1 (Tab. 22), che si aggiungono alle omologie con il fattore di avirulenza Avr4 di *C. fulvum* riscontrate mediante analisi Southern in diverse specie di *Trichoderma* (Harman *et al.*, 2004a). Queste evidenze sperimentali, insieme all'assenza di analogie simili riscontrabili nel genoma di *T. reesei* (l'unica specie di *Trichoderma*, peraltro non dotata di attività di biocontrollo, ad avere il genoma completamente sequenziato), suggeriscono un sostanziale coinvolgimento di fattori di avirulenza a supporto della capacità di questi funghi di instaurare interazioni saprofitiche e non virulente con le piante ospiti. A tale proposito, l'omologia riscontrata tra lo spot 7009 con la proteina NIP1 contenente una sequenza di cisteine tipica delle idrofobine (Rohe *et al.*, 1995), e quella tra lo spot 6301 ed una idrofobina di *P. ostreatus*, ha posto l'accento sul potenziale coinvolgimento di questi fattori molecolari nelle interazioni che questo fungo benefico instaura con le piante e gli altri microrganismi.

L'isolamento e la successiva caratterizzazione di una proteina dal filtrato culturale di *T. harzianum* ceppo T22 che presentava caratteristiche, quali il peso molecolare e la capacità di legare la chitina, simili ad Avr4 hanno permesso di individuare una nuova idrofobina denominata HYTRA1. I saggi di attività condotti con la proteina pura ne hanno messo in evidenza una certa attività antifungina *in vitro* ed *in vivo*, ma l'aspetto senza dubbio più interessante riguarda il ruolo di questa idrofobina nei processi di

interazione *Trichoderma*-pianta. Il coinvolgimento delle idrofobine nella colonizzazione delle radici da parte di *Trichoderma* spp. è stato già riportato in alcuni lavori (Benítez *et al.*, 2004; Viterbo e Chet, 2006). Recentemente Djonović *et al.* (2006, 2007) hanno individuato una nuova idrofobina secreta da *T. virens* (Sm1) in grado di attivare i meccanismi di difesa di diverse piante inducendo una resistenza di tipo sistemico.

Un altro evento comunemente associato alla risposta della pianta all'attacco di un patogeno è l'accumulo e l'ossidazione di composti fenolici, come le fitoalessine e la lignina, dotati di auto-fluorescenza (Heath, 2000; Nicholson e Hammersmidt, 1992). Alcune proteine fitotossiche come la cerato-platanina e la Sm1 hanno indotto una fluorescenza quando infiltrate, rispettivamente, in foglie di tabacco e in cotiledoni di cotone (Pazzagli *et al.*, 1999; Djonović *et al.*, 2006). In maniera analoga HYTRA1 ha mostrato la capacità di indurre in pianta una risposta ipersensibile (HR), determinata dalla comparsa di aree necrotiche fogliari e dall'accumulo di composti fluorescenti nelle aree interessate, mentre il suo effetto sulla crescita e lo sviluppo della pianta è variato a seconda della concentrazione di impiego. In particolare, applicando HYTRA1 a concentrazioni inferiori a 0.30  $\mu\text{M}$ , si è registrato un allungamento delle radici nonché una stimolazione della rizogenesi in pianta. Risultati preliminari non inseriti in questo lavoro hanno anche evidenziato il coinvolgimento di questa idrofobina nell'induzione dei meccanismi di resistenza localizzata (ISR) in pianta. Sono attualmente in corso gli esperimenti per ottenere la distruzione mirata del gene che consentirà di stabilire con certezza il ruolo di HYTRA1 nell'interazione con la pianta e con i funghi fitopatogeni.

Se quindi, come è plausibile ipotizzare, HYTRA1 può essere considerato un nuovo effettore proteico in grado sia di attivare le risposte di difesa della pianta sia di stimolarne la crescita e lo sviluppo, esso rappresenterebbe un fattore chiave nel dialogo che intercorre a livello molecolare tra *Trichoderma* e la pianta.

Nell'ambito delle proteine differenzialmente accumulate nel proteoma di *Trichoderma* per le quali si è cercato di effettuare uno studio funzionale di espressione e una parziale caratterizzazione, risultati interessanti sono stati ottenuti dallo studio delle ciclofilline. Come già descritto precedentemente, queste isomerasi sono una famiglia di proteine altamente conservata e sono presenti in tutti gli organismi dove svolgono molteplici ruoli, dal protein folding al mantenimento del ciclo cellulare, dal controllo della trascrizione alla regolazione del segnale del calcio (Arévalo-Rodríguez *et al.*, 2000; Gothel e Marahiel, 1999). E' interessante notare, però, che mentre in *Saccharomyces*

*cerevisiae* nessuna delle 8 ciclofilline si è dimostrata indispensabile per la sopravvivenza dell'organismo (Dolinski *et al.*, 1997), nel fungo patogeno *Cryptococcus neoformans* la distruzione dei geni *CPA1* e *CPA2* codificanti per ciclofilline ha determinato un'inibizione della crescita e della virulenza (Wang *et al.*, 2001). Analogo ruolo di fattori di virulenza è stato attribuito alle ciclofilline CYP1 di *M. grisea* e BCP1 di *B. cinerea*, coinvolte la prima nella formazione dell'appressorio e la seconda nella penetrazione o nella crescita in pianta del patogeno (Viaud *et al.*, 2002, 2003).

La presenza di sequenze EST codificanti per ciclofilline nelle librerie di *Trichoderma* spp. sostiene l'ipotesi di un loro coinvolgimento nei meccanismi di biocontrollo del fungo antagonista o quantomeno un loro ruolo nei processi di interazione con la pianta e/o il fungo patogeno, dal momento che le librerie sono state ottenute allevando *Trichoderma* in condizioni di micoparassitismo simulato. A tale riflessione si è giunti anche confrontando i risultati ottenuti mediante analisi proteomica, grazie ai quali è stato possibile individuare un accumulo differenziale nel proteoma di *Trichoderma* di proteine simili a ciclofilline durante le interazioni su substrato agarizzato con piante e patogeni fogliari/terricoli.

L'analisi Southern ha rivelato la presenza di numerose copie di geni che codificano per ciclofilline nel genoma di *T. atroviride* ceppo P1; tale risultato non appare dissimile da quello riscontrato in altri funghi (Pemberton, 2006) e considerando la molteplicità di ruoli in cui sembrano essere coinvolte negli organismi viventi (Wang e Heitman, 2005). Lo studio di espressione della sequenza codificante per una regione conservata del gene codificante per una ciclofillina di *T. atroviride* ceppo P1 ha inoltre confermato che la trascrizione di questa proteina viene indotta durante l'interazione tri-componente, particolarmente in presenza del patogeno fogliare *B. cinerea* e delle foglie di fagiolo. Questi risultati in parte confermano quanto già evidenziato mediante analisi proteomica, dove era già evidente che le intensità dei singoli spot omologhi a ciclofilline aumentavano nelle interazioni a due componenti *Trichoderma* – pianta rispetto al controllo. In aggiunta a questo, si può ipotizzare un coinvolgimento di queste proteine anche nei meccanismi di interazione con il patogeno.

## 5. CONCLUSIONI

La notevole importanza economica del controllo delle fitopatie per la produzione agricola, e la necessità di comprendere a fondo i meccanismi utilizzati dai patogeni vegetali allo scopo di contrastarne l'azione, hanno stimolato molte ricerche aventi l'obiettivo di analizzare le basi molecolari della specificità nelle interazioni pianta-patogeno, le risposte di difesa messe in atto dalle piante in seguito all'attacco di un patogeno e il ruolo dei microrganismi benefici nel controllo dei patogeni vegetali (Montesinos *et al.*, 2002; Whipps, 1997).

Le interazioni tri-componente che coinvolgono pianta, patogeno fungino e microrganismo antagonista (in particolare l'agente di biocontrollo *Trichoderma*) hanno ricevuto però scarsa attenzione rispetto ai sistemi relativamente più semplici che coinvolgono due partner, come ad esempio i sistemi pianta-patogeno, pianta-antagonista o antagonista-patogeno (Baker *et al.*, 1997; Dangl e Jones, 2001; Hammond-Kosack e Parker, 2003; Harman *et al.*, 2004a; Suzuki *et al.*, 2004). Ciò corrisponde, purtroppo, ad una conoscenza molto ridotta sui processi di resistenza/patogenicità mediati da microrganismi benefici e patogeni. Ci sono ovviamente numerose difficoltà nello studio di tali interazioni complesse, anche quando esse sono riprodotte in laboratorio in condizioni controllate, sebbene queste forniscono una rappresentazione più realistica delle interazioni che avvengono comunemente in natura nel suolo o sulla pianta.

Recenti studi hanno fornito un quadro interpretativo nuovo del modo in cui i funghi antagonisti del genere *Trichoderma* interagiscono non solo con gli altri membri della comunità microbica che popolano la rizosfera, ma anche con la pianta e con le varie componenti del suolo (Harman *et al.*, 2004a; Woo *et al.*, 2006). Questi risultati offrono nuove possibili applicazioni, sia in agricoltura che in campo biotecnologico, delle capacità che questi agenti di biocontrollo hanno di modificare il metabolismo della pianta e la sua resistenza a stress biotici e abiotici (Yedidia *et al.*, 2001). Ad esempio, questi microrganismi possono essere utilmente impiegati per promuovere la crescita e lo sviluppo delle piante, ovvero per aumentare la naturale capacità di alcune piante di degradare composti tossici nei suoli e nelle acque (Harman *et al.*, 2004b).

Diversi autori hanno dimostrato con svariati approcci che si stabilisce un vero e proprio scambio di segnali a livello molecolare tra *Trichoderma*, pianta e patogeno: alcune delle molecole coinvolte sembrano agire come degli ormoni e stimolare la crescita e lo

sviluppo delle piante, mentre altre fungono da elicitatori dei meccanismi di resistenza attivando i geni coinvolti a vari livelli nella difesa dai patogeni (Harman *et al.*, 2004a). L'attività di questi funghi antagonisti nel suolo può quindi influenzare in maniera determinante l'esito delle interazioni pianta-patogeno, alterando il metabolismo della pianta sottoposta a stress di varia natura o rendendo incompatibile una reazione pianta-patogeno altrimenti compatibile.

La proteomica rappresenta uno strumento importante per ottenere informazioni sia specifiche sia di carattere generale sui "proteomi d'interazione" prodotti da piante e microrganismi; la tecnica dell'elettroforesi bidimensionale permette di ottenere, grazie anche all'impiego dei gradienti di pH immobilizzati su strisce di poliacrilammide (IPG strips), mappe riproducibili del proteoma dell'organismo in esame e consentire una rapida identificazione delle proteine correlate ad uno specifico processo biologico o stato fisiologico (Görg *et al.*, 2004).

Nei nostri esperimenti sono state ottenute centinaia di proteine su gel bidimensionali (2-D), prodotte sia da microrganismi (*Trichoderma*, patogeni) sia da piante (pomodoro, fagiolo). L'analisi dei gel ha permesso di ottenere interessanti risultati per le differenti interazioni analizzate, sia in termini qualitativi che quantitativi. Il software PD-QUEST (BIO-RAD) ha inoltre permesso di creare differenti set di analisi che rappresentano gruppi di spot statisticamente significativi. In questo modo sono stati organizzati e successivamente analizzati gli spot differenziali ritenuti più interessanti nelle diverse condizioni sperimentali. I risultati delle ricerche effettuate in banca dati hanno consentito di identificare proteine coinvolte nelle rispettive interazioni ed identificare geni e prodotti genici potenzialmente utili per applicazioni agricole ed industriali.

Ad ogni modo, la complessità del sistema, che richiede l'intervento e l'azione di più di un organismo contemporaneamente, rende necessario un approccio più integrato per analizzare a fondo i meccanismi molecolari che coinvolgono agenti di biocontrollo come *Trichoderma* spp. Infatti, le applicazioni che sfruttano *Trichoderma* come agente biologico (bio-fungicida, bio-stimolante, bio-protettore, etc.) ed i suoi sottoprodotti, da soli o in combinazione con le tecnologie esistenti ed i prodotti fitosanitaricommerciali, stanno aumentando di pari passo con l'aumentare delle conoscenze sui meccanismi molecolari coinvolti in queste interazioni tri-componente.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Abramovitch RB and Gregory BM (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:356–364.

Abramovitch RB, Kim YJ, Chen S, Dickman MB, Martin GB (2003). *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J*, 22:60-69.

Aebersold R, Leavitt J, Saavedra R, Hood LE and Kent SBH (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 6970-6974.

Agrawal AA, Tuzun S, Bent E (eds) (1999) *Inducible plant defenses against pathogens and herbivores. Biochemistry, ecology and agriculture.* American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota

Agrios, G. N. (1998). *Plant Pathology* 4<sup>o</sup> ed., Academic Press.

Ait-Lahsen H, Soler A, Rey M, de la Cruz J, Monte E. and Llobell A (2001). An antifungal exo- $\alpha$ -1,3-glucanase (AGN 13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ Microbiol.*, 67: 5833-5839.

Alexander, M. (1971). *Microbial ecology.* John Wiley and Sons, New York.

Andrews JH and Harris RF (2000). The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:145–180.

Anzai H, Yoneyama K, Yamaguchi I (1989). Transgenic tobacco resistant to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin. *Molecular and General Genetics* 219, 492-494.

Arévalo-Rodríguez M, Cardenas ME, Wu X, Hanes SD, Heitman J (2000). Cyclophilin A and Ess1 interact with and regulate silencing by the Sin3-Rpd3 histone deacetylase. *EMBO J.* 19, 3739–3749.

Baker B, Zambryski P, Staskawicz B and Dinesh S (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, 276: 726-733.

Bartnicki-Garcia S (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu Rev Microbiol.*; 22:87-108.

Bashan Y and Holguin G (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1225–1228.

Benítez T, Delgado-Jarana J, Rincón AM, Rey M, Limón MC (1998). Biofungicides: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. In: Pandalai SG (eds) *Recent research developments in microbiology*, vol. 2. Research Signpost, Trivandrum, pp 129-150.

Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* 7:249-260.

Benito EP, Prins T, van Kan JAL (1996). *Plant Molecular Biology*, 32 : 947-957.

Bisset JF (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. Infrageneric classification *Can. J. Bot.*, 69: 2357-2372.

Bolar JP, Aldwinkle HS, Harman GE, Norelli JL, Brown SK (1997). Endochitinase transgenic McIntosh apple lines have increased resistance to scab. *Phytopathology*, 87 (Supplement), S10.

Bolton H, Fredrikson JK and Elliot LE. (1992). Microbial ecology of the rhizosphere. In: F. B. Metting, Jr. (ed.), *Soil microbial ecology*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. p. 27–63.

Bowen GD and Rovira AD. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* 66:1–102.

Brogliè K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ, Brogliè R (1991). Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*, 254: 1194-1197.

Carsolio C, Guitierrez A, Jiminez B, Van Montagu M and Herrera-Estrella A (1994). Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10903–10907.

Chet I (1987). *Trichoderma*-Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soil-born pathogenetic fungi. In: *Innovative approaches to plant disease control* (Chet I. Ed. ) John Wiley and Sons, pp. 137-160.

Corke ATK (1974). The prospect for biotherapy in trees infected by silver leaf. *Journal of Horticulture Science*, 49: 391-394.

Curl EA and Truelove B (1986). *The rhizosphere*. Springer-Verlag, New York, N.Y.

Dangl JL and Jones JDG (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833.

Danyl JL, Dietrich RA, Richberg MH (1996). Death don't have no mercy: cell death programs in plant. *Plant Cell*, 8: 1793-1807.

Davis RF, Backman PA, Rodriguez-Kabana R and Kokallis-Burell N (1992). Biological control of apple fruit disease by *Chaetomium globosum* formulation containing cellulose. *Biological Control*, 2: 118-123.

de la Cruz J and Llobell A (1999). Purification and properties of a basic endo- $\beta$ -1,6-glucanase (BGN 16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. *Eur J. Biochem.*, 265: 145-151.

de la Cruz J, Hidalgo-Gallego A, Lora JM, Benítez T, Pintor-Toro JA and Llobell A (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur J. Biochem*, 206: 859-867.

de la Cruz J, Pintor-Toro JA, Benítez T and Llobell A (1995a). Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,6-Glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *J. Bacteriol*, 177: 1864-1871.

de la Cruz J, Pintor-Toro JA, Benítez T, Llobell A and Romero L (1995b). A novel endo- $\beta$ -1,3-glucanase, BGN 13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol*, 177:6937-6945.

De la Fuente-Martinez JM, Mosqueda-Cano G, Alvarez-Morales A, Herrera-Estrella L (1992). Expression of a bacterial phaseolotoxin-resistant ornithyl transcarbamylase in transgenic tobacco confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Biotechnology* 10, 905-909.

De Meyer G, Bigirimana J, Elad Y, Hofte M. (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 279–286.

de Wit PJGM (1992). Molecular characterization of gene – for – gene systems in plant – fungus interaction and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annual Reviews of Phytopatology*, 30: 391-418.

Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich I, Genin S and Marco Y (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *PNAS*, 100 (13): 8024-8029.

Djonović S, Pozo MJ, Dangott LJ, Howell CR and Kenerley CM (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *MPMI*, 19(8): 838–853.

Djonovic S, Vargas WA, Kolomiets MV, Horndeski M, Wiest A, Kenerley CM (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiol.* 145(3):875-89.

Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, van de Broek A, Vanderleyden J (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, 212, 155–164.

Dolinski K, Muir S, Cardenas M, Heitman J (1997). All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:13093-13098.

Donzelli BGG and Harman GE (2001). Interaction of ammonium, glucose, and chitin regulates the expression of cell wall-degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain p1. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12): 5643–5647.

Duijff BJ, Meijer JW, Bakker PAHM and Schippers B (1991). Suppression of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* in soil; mode of-action. In: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Progress and Problems*, ed. Keel, C., Koller B., and Defago G. 1991, pp. 152-157.

Elad Y (1995). Mycoparasitism. In: Kohmoto, K., Singh, U.S., Singh, R.P. (Eds.), *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases: Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Basis, Eukaryotes, Vol. II*. Pergamon, Elsevier, Oxford, UK, pp. 289-307.

Elad Y (2003). Biocontrol of foliar pathogens: mechanisms and application. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 68(4 Pt A):17-24.

Elad Y and Kapat A (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 105: 177-189.

Elad Y, Chet I and Hanis I (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* – scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*, 73: 85-88.

Elad Y *et al.* (1999). In *Modern Fungicides and Antifungal Compounds* (ed. Lyr, H.), pp. 459-467.

Eparvier A and Alabouvette C (1994). Use of ELISA and GUS-transformed strains to study competition between pathogenic and non pathogenic *Fusarium oxysporum* for root colonization. *Biological Science and Technology*, 4: 35-47.

Flor H (1971). Current status of the gene- for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol*, 9: 275-296.

Fogliano V, Ballio A, Gallo M, Woo SL, Scala F and Lorito M (2002). *Pseudomonas* lipodepsipeptides and fungal cell wall-degrading enzymes act synergistically in biological control. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 15:323-333.

Fravel DR (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol*. 43:337–59.

Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 263:18545-18552.

García-Garrido JM, Ocampo JA: Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J Exp Bot* 2002, 53:1377-1386.

Geremia RA, Goldman GH, Jacobs D, Ardiles W, Vila SB, van Montagu M and Herrera-Estrella A (1993). Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.*, 8: 603-613.

Gil-ad NL, Bar-Nun N, Noy T, Mayer AM (2000). Enzymes of *Botrytis cinerea* capable of breaking down hydrogen peroxide. *FEMS Microbiol. Lett.*, 190:121-126.

Görg A, Weiss W, Dunn MJ (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4:3665–3685.

Gothel SF, Marahiel MA (1999). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55, 423–436.

Grinyer J, McKay M, Herbert B, Nevalainen H (2004a). Fungal proteomics: mapping the mitochondrial proteins of a *Trichoderma harzianum* strain applied for biological control. *Curr Genet* 45(3):170-175.

Grinyer J, McKay M, Nevalainen H, Herbert BR (2004b). Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* 45:163-169.

Grinyer J, Hunt S, McKay M, Herbert BR, Nevalainen H (2005). Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet* 47(6):381-388.

Guenoune D *et al.* (2001). The defense response elicited by *Rhizoctonia solani* is suppressed by colonization of the AM-fungus *Glomus intraradices*. *Plant Sci.*, 160: 925-932.

Guido J, Gornhrdt B, Mundy J, Pinsdorf E, Leath R, Schell J, Mass C (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal diseases caused by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.*, 8: 97-119.

Guimil S, Chang HS, Zhu T, Sesma A, Osbourn A, Roux C, Ioannidis V, Oakeley EJ, Docquier M, Descombes P et al. (2005). Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:8066-8070.

Ha GH, Lee SU, Kang DG, Ha NY, Kim SH, Kim J, Bae JM, Kim JW, Lee CW (2002). Proteome analysis of human stomach tissue: separation of soluble proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and identification by mass spectrometry. *Electrophoresis* 23(15):2513-2524.

Haas D, Keel C (2003). Regulation of antibiotic production in root colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 41, 117–153.

Hammond-Kosack KE and Jones JDG (1996). Resistance gene-dependent plant defense response. *Plant Cell*, 8: 1773-1791.

Hammond-Kosack KE and Parker JE (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol.* Apr; 14(2): 177-93.

Harman GE (2000). Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions based on research with *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84: 377-393.

Harman GE and Bjorkman T (1998). Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: Kubicek CP and Harman GE (eds.), *Trichoderma and Gliocladium* Vol. II. London: Taylor and Francis, London, pp. 1-393.

Harman GE and Kubicek CP (1998). *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. II. Taylor and Francis, London.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I and Lorito M (2004a). *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2, 43-56.

Harman GE, Lorito M, Lynch JM (2004b). Uses of *Trichoderma* spp. to alleviate or remediate soil and water pollution. *Adv Appl Microbiol* 56:313-30.

Harms CT (1992). Engineering genetic disease resistance into crops: biotechnological approaches to crop protection. *Crop protection*, 11: 291-306.

Harrison MJ (2005). Signalling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol*, 59:19-42.

Heath MC (1981). A generalized concept of host-parasite specificity. *Phytopathology*, 71:1121-1123.

Heath MC (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* 44:321-334.

Howell CR (2003). Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concept. *Plant Dis.*, 87: 4-10.

Howell CR, Hanson LE, Stipanovic RD and Puckhaber LS (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90: 248-252.

Jacobs DI, van Rijssen MS, van der Heijden R, Verpoorte R (2001). Sequential solubilization of proteins precipitated with trichloroacetic acid in acetone from cultured *Catharanthus roseus* cell yields 52% more spots after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, 1, 1345-1350.

Jamir Y, Guo M, Oh HS, Petnicki-Ocwieja T, Chen S, Tang X, Dickman MB, Collmer A, Alfano JR (2004). Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J*, 37:554-565.

Jedd G and Chua NH (2000). A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nat Cell Biol* 2:226-231.

Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP and Valent B (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO Journal*, 19: 4004-4014.

Jones AL (2001). Programmed cell death in development of disease. *Plant Physiology* 125, 94-97.

Jones DA, Ryder MH, Clare BG, Farrand SK, Kerr A (1988). Construction of a *Tra* deletion mutant of pAgK84 to safeguard the biological control of crown gall. *Molecular and General Genetics* 212, 207-214.

Kapteyn JC, Ram AFG, Groos EM, Kollar R, Montijn RC, Van den Ende H, Llobell A, Cabib E and Klis FM (1996). Altered extent of cross-linking of  $\beta$ -1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall  $\beta$ -1,3-glucan content. *J. Bacteriol*, 79: 6279-6284.

Kershaw MJ and Talbot NJ (1998). Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet Biol* 23:18-33.

Kim ST, Kim SG, Hwang DH, Kang SY, Kim HJ, Lee BH, Lee JJ, Kang KY (2004). Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proteomics* 4:3569–3578.

Kim YJ, Lin NC, Martin GB (2002). Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell*, 109:589-598.

Kubicek CP, Mach RL, Peterbauer CK and Lorito M (2001). *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *J. Plant Pathol.*, 83: 11-23.

Kullnig C, Mach RL, Lorito M, Kubicek CP (2000). Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma* ech42 gene expression before mycoparasitic contact. *Appl Environ Microbiol* 66(5):2232–2234.

Lanzuse S, Ruocco M, Scala V, Woo SL, Scala F, Vinale F, Del Sorbo G and Lorito M (2002). Cloning of ABC transporter-encoding genes in *Trichoderma* spp. to determine their involvement in biocontrol. *Journal of Plant Pathology*, 84: 184.

Lee KLL, Erickson BK, Klucas RV (1995). *Plant Physiol*, 109(1):261-267.

Leigh GJ (2002). *Nitrogen fixation at the millennium*. London: Elsevier Science.

Lim D, Hains P, Walsh B, Bergquist P, Nevalainen H (2001). Proteins associated with the cell envelope of *Trichoderma reesei*: A proteomic approach. *Proteomics* 1:899–910.

Linder MB, Szilvay GR, Nakari-Setälä T, Penttilä ME (2005). Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev* 29:877–896.

Linderman RG (1988). Mycorrhizal interaction with the rizosphere microflora: the mycorrhizzosphere effects. *Phytopatology*, 78: 366-371.

Lindow SE and Brandl MT (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1875–1883.

Lindquist S (1986). The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151–1191.

Liu P-G and Yang Q (2005). Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. *Res Microbiol* 156:416–423.

Lorito M (1997). Chitin in agriculture and its application. *Carbohydrates in Europe*, 19: 15-23.

Lorito M (1998). Chitinolytic enzymes and their genes. In *Trichoderma* and *Gliocladium*. Harman GE and Kubicek CP, Vol.II: 73-99, Taylor and Francis, London.

Lorito M and Scala F (1999). Microbial genes expressed in transgenic plants to improve disease resistance. *Journal of Plant Pathology*, 81: 73-88.

Lorito M and Woo SL (1998). Advances in understanding the antifungal mechanisms of *Trichoderma* and new applications for biological control. In: *Molecular Approaches in Biological Control* (Duffy B, Rosemberg U and Defagò G. eds.), IOBC/OILB European Foundation of Plant Pathology, 21(9): 73-80.

Lorito M, Harman GE, Hayes CK, Broadway RM, Tronsmo A, Woo SL and Di Pietro A (1993). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, 83: 302-307.

Lorito M, Peterbauer C, Hayes CK and Harman GE (1994). Synergistic interaction between fungal cell wall-degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology*, 140: 623-629.

Lorito M, Woo SL, D'Ambrosio M, Harman GE, Hayes CK, Kubicek CP, Scala F (1996a). Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3: 206-213.

Lorito M, Mach R, Sposato P, Strauss J, Peterbauer CK, and Kubicek CP (1996b). Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 14868-14872.

Lorito M, Woo SL, Garcia Fernandez I, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun, S and Scala F (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a novel source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceeding of the National Accademy of Sciences USA*, 95: 7860-7865.

Lorito M, Woo S, Scala F (2004). Le biotecnologie utili alla difesa sostenibile delle piante: i funghi. *Agroindustria*, 3 (2), 181-195.

Lucas-Garcia JA, Probanza A, Ramos B, Colón-Flores JJ, Gutierrez-Mañero FJ. (2004). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) on the biological nitrogen fixation, nodulation and growth of *Lupinus albus* I. cv. Multolupa. *Engineering Life Sciences* 4, 71-77.

Luderer R and Joosten MHAJ (2001). Avirulence proteins of plant pathogens: determinants of victory and defeat. *Molecular Plant Pathology*, 2: 355-364.

Mach RL, Peterbauer CK, Payer K, Jaksits S, Woo SL, Zeilinger S, Kullnig CM, Lorito M, Kubicek CP (1999). Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma*

*atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Appl Environ Microbiol.*, 65(5):1858-63.

Mandeel Q and Baker R (1991). Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt on cucumber with strains of non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 81: 462-469.

Marks AR (1996). Cellular functions of immunophilins. *Physiol. Rev.*, 76: 631–649.

McClure NC, Ahmadi A-R, Clare BG (1998). Construction of a range of derivatives of the biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84: a study of factors involved in biological control of crown gall disease. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3977-3982.

Migheli Q, Friard O, Ramon-Vidal D and Gonzales-Candelas L (1994). Hypercellulolytic transformants of *Trichoderma longibrachiatum* are active in reducing *Pythium* damping-off on cucumber. In: *Advances in Molecular Genetics of plant-Microbe Interactions*, Daniels MJ (ed.), Vol. 3 Kluwer, Dordrecht, pp. 395-398.

Miller RM and Jastrow JD (1990). Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. *Soil Biology and Biochemistry*, 22: 579-584.

Miller RM and Jastrow JD (2000). Mycorrhizal fungi influence soil structure. In: *Arbuscular mycorrhizas: physiology and functions*. Kapulnik Y, Douds Jr DD (eds.) Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 3–18.

Moffett P, Farnham G, Peart JR, Baulcombe DC (2002). Interaction between domains of a plant NBS–LRR protein in disease resistance-related cell death. *EMBO J* 21:4511-4519.

Monte E (2001). Understanding *Trichoderma*: Between biotechnology and microbial ecology. *Int. Microbiol.* 4:1-4.

Montesinos E (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int Microbiol* 6: 245–252.

Montesinos E and Bonaterra A (1996). Dose-response models in biological control of plant pathogens. An empirical verification. *Phytopathol* 86:464–472.

Montesinos E, Bonaterra A, Badosa E, Francés J, Alemany J, Llorente I, Moragrega C (2002). Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods. of plant disease control. *Int Microbiol* 5: 169–175.

Morimoto RI, Tissierers A, Georgopoulos C (1994). The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. In: *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (eds), Cold Spring Harbor, New York.

Morrissey JH (1981). Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity *Analytical Biochemistry*, 117: 307-310.

Neuhaus JM, Ahl-Goy P, Hinz U, Flores S, Meins F (1991). High level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana sylvestris*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Molecular Biology*, 16: 141-151.

Nicholson RL and Hammerschmidt R (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:369-389.

Noronha EF and Ulhoa CJ (1996). Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Can J. Microbiol*, 42: 1039-1044.

Oldroyd GE and Long SR (2003). *Plant Physiol.*, 131: 1027-1032.

Pandey A and Mann M (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405: 837-846.

Papavizas GC (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and the potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 23: 23-54.

Paszkowski U (2006). Mutualism and parasitism: the yin and yang of plant symbioses. *Curr Opin Plant Biol*, 9:364-370.

Patterson SD and Aebersold RH (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet.* 33 Suppl:311-23.

Pazzagli L, Cappugi G, Manao G, Camici G, Santini A and Scala A (1999). Purification, characterization, and amino acid sequence of cerato-platanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani*. *J. Biol. Chem.* 274:24959-24964.

Pemberton TJ (2006). Identification and comparative analysis of sixteen fungal peptidyl-prolyl cis/trans isomerase repertoires. *BMC Genomics*, 7:244.

Peñalver R and López MM (1999). Cocolonization of the rhizosphere by pathogenic *Agrobacterium* strains and non pathogenic strains K84 and K1026, used for crown gall biocontrol. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1936-1940.

Peñalver R, Vicedo B, Salced CI, López MM (1994). *Agrobacterium radiobacter* strains K84, K1026 and K84 Agr<sup>-</sup> produce an antibiotic-like substance, active *in vitro* against *A. tumefaciens* and phytopathogeni *Erwinia* and *Pseudomonas* spp. *Biocontrol Science and Technology* 4, 259-267.

Peterbauer CK, Lorito M, Hayes CK, Harman GE and Kubicek CP (1996). Molecular cloning and expression of the *nagI* gene (N-acetyl-D-glucosaminidase-encoding gene) from *Trichoderma harzianum* P1. *Curr. Genet.* 30:325–331.

Phizicky E, Bastiaens PI, Zhu H, Snyder M, Fields S (2003). Protein analysis on a proteomic scale. *Nature*, 13;422(6928):208-15.

Plerson III LS, Keppenne VD and Wood DW (1994). Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J. Bacteriol.* 176, 3966-3974.

Polonenko DR, Scher FM, Kloepper JW, Singleton CA, Laliberte M, Zaleska I (1987). Effects of root colonizing bacteria on nodulation of soybean roots by *Bradyrhizobium japonicum*. *Canadian Journal of Microbiology* 33, 498–503.

Postgate JR (1998). Nitrogen fixation. Cambridge: Cambridge University Press.

Pozo MJ and Azcón-Aguilar C (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10:393–398.

Pozo MJ, Cordier C, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S, Barea JM, Azcón-Aguilar C (2002). Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses of *Phytophthora* infection in tomato plants. *J. Exp. Bot.*, 53: 525-534.

Punja ZK and Raharjo SHT (1996). Response of transgenic cucumber and carrot plants expressing different chitinase enzymes to inoculation with fungal pathogens. *Plant Disease*, 80: 999-1005.

Reino JL, Guerriero RF, Hernández-Gala R and Collado IG (2007). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev*, DOI 10.1007/s11101-006-9032-2.

Requena N, Perez-Solis E, Azcón-Aguilar C, Jeffries P, Barea JM (2001). Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 495–498.

Richards WC (1993). Cerato-ulmin: A unique wilt toxin of instrumental significance in the development of Dutch Elm Disease. In: *Dutch Elm Disease Research, Cellular and Molecular Approaches* (Sticklen MB and Serald JL, Eds.), Springer-Verlag. Berlin, Germany. pp. 89–151.

Rifai AM (1996). A revision of genus *Trichoderma*. In: *Commonwealth Mycology. Inst. Mycol. Pap.* 116.

Rohe M, Gierlich A, Hermann H, Hahn M, Schmidt B, Rosahl S, Knogge W (1995). The race-specific elicitor, NIP1, from the barley pathogen, *Rhynchosporium secalis*,

determines avirulence on host plants of the Rrs1 resistance genotype. *EMBO J* 14(17):4168-4177.

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY and Hunt MD (1996). Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, 8: 1809-1819.

Sahai AS and Manocha MS (1993). Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews*, 11: 317-338.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sandhya C, Adapa LK, Nampoothiri KM, Binod P, Szakacs G, Pandey A (2004). Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation *J Basic Microbiol.*, 44(1): 49-58.

Saravan RS and Rose JKC (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* 4:2522-2532.

Schirmböck M, Lorito M, Wang YL, Hayes CK, Arisan-Atac I, Scala F, Harman GE and Kubicek CP (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 4364-4370.

Schmoll M and Kubicek CP (2003). Regulation of *Trichoderma* cellulase formation: lessons in molecular biology from an industrial fungus. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 50(2-3): 125-45.

Schneider RW (1984). Effect of non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on celery roots. Infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *apii* and a novel use of the Lineweaver Burk double reciprocal plot technique. *Phytopathology*, 74: 646-653.

Shirasu K, Schulze-Lefert P (2000). Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Mol Biol*, 44:371-385.

Silo-Suh LA, Lethbridge BJ, Raffel SJ, He H, Clardy J and Handelsman J (1994). Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2023-2030.

Simon A and Sivasithamparam K (1989). Pathogen suppression: a case study in biological suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 21: 331-337.

Sivasithamparam K and Ghisalberti EL (1998). In: *Trichoderma* and *Gliocladium*. Kubiecek CP and Harman GE (eds), Taylor and Francis, London, Vol 1, pp. 139-191.

Staskawicz BJ (2001). Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiology* 125, 73-76.

Suárez MB, Sanz L, Chamorro MI, Rey M, González FJ, Llobell A, Monte E (2005). Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fung Genet Biol* 42:924–934.

Suzuki H, Xia Y, Cameron R, Shadle G, Blount J, Lamb C, Dixon RA (2004). Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack. *J Exp Bot* 55 (395):169-179.

Takken FLW and Joosten MH AJ (2000). Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 699-713.

Tang X, Frederick RD, Zhou J, Halterman DA, Jia Y and Martin GB (1996). Initiation of plant disease resistance by physical interaction of *AvrPto* and *Pto* kinase. *Science*, 274: 2060-2063.

Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang HS, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F (2003). Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*, 15:317-330.

ten Have A (1998). *The American Phytopathological Society*, Vol.11, 1009-1016.

Terakawa T, Takaya N, Horuchi H, Koike M (1997). A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Reports*, 16: 439-443.

Tronsmo A and Harman GE (1992). Coproduction of chitinolytic enzymes and biomass for biological control by *Trichoderma harzianum* on media containing chitin. *Biol. Control* 2:272–277.

Valdivia RH and Schekman R (2003). The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(18): 10287-92.

van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A and Sanders IR (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Letters to Nature*, 396: 69-72.

van der Vlugt-Bergmans CJ, Wagemakers CA, van Kan JA (1997). Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* 10(1):21-29.

Vessey JK (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255, 571–586.

Viaud MC and Balhadere PV (2002). *Magnaporthe grisea* Cyclophilin acts as a virulence determinant during plant infection. *Plant Cell*. Apr, 14(4): 917-30.

Viaud M, Brunet-Simon A, Brygoo Y, Pradier J-M, Levis C (2003). Cyclophilin A and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin A inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Microbiol* 50(5):1451–1465.

Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1–10.

Viterbo A and Chet I (2006). TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Molecular Plant Pathology*, 7( 4 ):249–258.

Vrany J, Rasochova M, Fiker A and Dobias K (1990). Inoculation of potatoes with microorganism under field conditions. I. Effect on plant growth, yields and physiological properties on tubers in potato and sugar-beet regions. *Folia Microbiologica*, 35:326-335.

Walker TS, Bais HP, Grotewold E and Vivanco JM (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol*. 132:44–51.

Wang P and Heitman J (2005). The cyclophilins. *Genome Biology*, 6:226.

Wang P, Cardenas ME, Cox GM, Perfect JR, Heitman J (2001). Two cyclophilin A homologs with shared and divergent functions important for growth and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO Rep*. 2, 511–518.

Wei ZM, Wei Z, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV et al (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257:85–88.

Whipps JM (1997). Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research* 26, 1–134.

Wilhite SE, Lumsden RD and Straney DC (1994). Mutational analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungus *Gliocladium virens* in relation to suppression of *Pythium* damping-off. *Phitopathology*, 84: 816-821.

Wilkins MR and Williams K (1997). Cross-species Protein identification using amino acid composition, peptide mass fingerprint, isoelectric point and molecular mass: a theoretical evaluation. *J. theor. Biol.*; 186: 7-15.

Woo SL, Donzelli B, Scala F, Mach R, Kubicek CP, Del Sorbo G and Lorito M (1999). Disruption of *ech2* (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. *Molec. Plant Microbe Interac.*, 5: 419-429.

Woo SL, Fogliano V, Scala F, Lorito M (2002). Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance biocontrol, 81(1-4):353-6.

Woo SL *et al.* (2003). Identifying biocontrol genes in *Trichoderma* ssp. and mechanism for activating biocontrol processes. 8<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, New Zealand Abstract, 268.

Woo SL, Scala F, Rocco M, Lorito M (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96(2):181-185.

Wösten HA (2001). Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol* 55:625-646.

Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Levine EB, Fitzsimmon KC, Shah DM (1995). Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell*, 9: 1357-1368.

Yao MK, Desilets H, Charles MT, Boulanger R, Tweddell RJ (2003). Effect of mycorrhization on the accumulation of rishitin and solavetivone in potato plantlets challenged with *Rhizoctonia solani*. *Mycorrhiza*, 13:333-336.

Yedidia I and Chet I (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus*) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 1061-1070.

Yedidia I, Benhamou N and Chet I (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3): 1061–1070.

Yedidia I, Benhamou N, Kapulnik Y and Chet I (2000). Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol. Biochem.*, 38: 863-873.

Yedidia I, Srivastva AK, Kapulnik Y and Chet I (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* 235:235-242.

Yedidia I, Shores M, Kerem Z, Benhamou N, Kapulnik Y, Chet I (2003). Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl Environ Microbiol* 69(12):7343-7353.

Zeilinger S, Galhaup C, Payer K, Woo SL, Mach RL, Fekete C, Lorito M and Kubicek CP (1999). Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genet. Biol.* 26: 131-140.

Zhang F, Dashti N, Hynes RK, Smith DL (1996). Plant-growth promoting rhizobacteria and soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. *Annals of Botany* 77, 453–459.

Zhu Q, Maher EA, Masoud A, Dixon RA, Lamb CJ (1994). Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Biotechnology*, 12: 807-812.