
**ESPRESSIONE DI INIBITORI DI
PROTEASI DI ORIGINE
VEGETALE POTENZIALMENTE
UTILI AL CONTROLLO DI
AGENTI FITOPATOGENI**

David Turrà

Dottorato in Scienze Biotechnologiche – XVIII ciclo
Indirizzo Biotechnologie Vegetali
Università di Napoli Federico II



Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XVIII ciclo
Indirizzo Biotecnologie Vegetali
Università di Napoli Federico II



**ESPRESSIONE DI INIBITORI DI
PROTEASI DI ORIGINE
VEGETALE POTENZIALMENTE
UTILI AL CONTROLLO DI
AGENTI FITOPATOGENI**

David Turrà

Dottorando: Dott. David Turrà

Relatore: Prof. Matteo Lorito

Coordinatore: Prof. Gennaro Marino

INDICE

1. RIASSUNTO.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUZIONE.....	7
3.1 <i>Binomio pianta-parassita</i>	7
3.2 <i>Interazione pianta - organismo fitopatogeno</i>	8
3.3 <i>I meccanismi di difesa delle piante</i>	10
3.3.1 <i>Le PR proteins</i>	13
3.3.2 <i>Proteasi ed inibitori di proteasi</i>	14
3.3.3 <i>PI ed attività inibitoria nei confronti dei patogeni</i>	17
3.3.4 <i>Inibitori Kunitz</i>	19
3.3.5 <i>Proteinase Inhibitor 1</i>	21
3.4 <i>Strategie di controllo degli stress biotici</i>	22
3.4.1 <i>Controllo degli stress biotici causati dagli insetti e dai nematodi</i>	22
3.4.2 <i>Controllo degli stress causati da virus</i>	25
3.4.3 <i>Controllo degli stress causati da funghi e batteri</i>	25
4. SCOPO DELLA TESI.....	29
5. MATERIALI E METODI.....	30
5.1 <i>Microrganismi utilizzati</i>	30
5.2 <i>Condizioni di crescita</i>	30
5.3 <i>Materiale vegetale utilizzato</i>	30
5.3.2 <i>Trattamenti effettuati per indurre le risposte di difesa della pianta</i>	31
5.4 <i>Saggi di attività inibitoria delle proteasi</i>	31
5.5 <i>Saggi in vitro dell'attività antifungina</i>	32
5.6 <i>Estrazione degli acidi nucleici</i>	32
5.6.1 <i>Estrazione e digestione del DNA plasmidico estratto da E. coli</i>	32
5.6.2 <i>Estrazione di DNA ed RNA da piante di patata</i>	33
5.7 <i>Sequenze amminoacidiche d'interesse e disegno dei primer</i>	34
5.8 <i>Amplificazione di frammenti di DNA mediante PCR, RT-PCR, RACE 5'</i>	37
5.9 <i>Clonaggio dei geni dei PI</i>	40
5.9.1 <i>Eluizione degli amplificati ottenuti mediante PCR, RT-PCR o RACE5'</i>	40
5.9.2 <i>Ligazione nel vettore plasmidico</i>	40
5.9.3 <i>Trasformazione di cellule competenti di E. coli mediante elettroporazione o shock termico</i>	41

<i>5.10 Overespressione del gene PKI1 in E. coli e purificazione della proteina ricombinante</i>	42
<i>5.11 Analisi Southern</i>	44
<i>5.12 Analisi Northern</i>	45
6. RISULTATI	46
<i>6.1 Sequenziamento ed isolamento di geni di PI aventi attività antifungina</i> ...	46
6.1.1 Sequenze amminoacidiche d'interesse e studio delle omologie di sequenza.....	46
6.1.2 Isolamento di geni codificanti per PI di patata e studio delle omologie di sequenza.....	46
<i>6.2 Caratterizzazione dei geni di PI isolati</i>	48
6.2.1 Caratterizzazione del gene <i>PKI1</i> mediante analisi Southern.....	48
6.2.2 Caratterizzazione del gene <i>PPI3B2</i> mediante analisi Southern.....	49
6.2.3 Analisi Northern ed RT-PCR.....	50
6.2.4 RT-PCR semiquantitativa.....	50
6.2.4.1 Espressione di inibitori Kunitz e PI1 in diversi tessuti di piante di patata.....	51
6.2.4.2 Espressione dei geni Kunitz, PI1, Pin2 e PR1 in piante di patata parassitizzate dal nematode <i>Globodera rostochiensis</i>	52
6.2.4.3 Espressione dei geni Kunitz, PI1, Pin2 e PR1 in piante di patata ferite.....	59
<i>6.3 Espressione eterologa del gene PKI1 in E. coli</i>	65
<i>6.4 Inibizione della germinazione delle spore di funghi fitopatogeni</i>	66
7. DISCUSSIONE	67
8. BIBLIOGRAFIA	72

1. RIASSUNTO

Agenti patogeni, sia di natura biotica che abiotica, stimolano nelle piante la sintesi delle proteine PR, tra cui gli inibitori di proteasi (PI). Gli inibitori di proteasi di natura proteica, solitamente classificati come PR-6, hanno massa molecolare variabile tra i 6 ed gli 80 kDa, sono ubiquitari in natura e raggruppati in base alla classe di proteasi (serina, cisteina, metallo o aspartico proteasi) che sono in grado di inibire. Nelle piante i PI svolgono diverse funzioni fisiologiche come quelle di proteine di riserva, di regolazione dell'attività proteasica endogena, di modulazione dei processi apoptotici, di stabilizzazione delle proteine e di difesa attiva nei confronti di animali, insetti e microrganismi. I PI sono in grado di influenzare la sintesi della chitina nei funghi, di ridurre la crescita di insetti e nematodi, e di inibire l'attività proteasica espressa da diversi microbi. Sebbene l'effetto insetticida e nematocida dei PI sia ben noto, non è ancora chiaro se la loro sovraespressione in pianta possa incrementare la resistenza contro patogeni fungini. Avendo determinato durante un precedente lavoro le sequenze amminoacidiche parziali di diversi PI, purificati da germogli di patata e potenzialmente attivi contro diversi agenti fitopatogeni, abbiamo amplificato (tramite PCR e RACE 5') e clonato i geni *PKI1* e *PKI2* appartenenti alla famiglia degli inibitori Kunitz ed i cDNA dei geni *PPI3B2*, *PPI3A2*, *PPI3A4*, *PPI2C4* e *PPI2C1A* appartenenti alla famiglia dei proteinase inhibitor 1 (PI1). Tra questi abbiamo considerato con particolare interesse l'inibitore Kunitz *PKI1* e il PI1 *PPI3B2*, perché dotati di attività antimicrobica ed inibitoria in generale. Analisi Southern effettuata sul DNA genomico di *Solanum tuberosum* cv. Desiree ha confermato la presenza dei due geni nel genoma di patata e la presenza di almeno nove geni appartenenti alla famiglia dei PI1. L'analisi del profilo di espressione dei tre gruppi di omologia (A, B, C), costituenti la famiglia genica Kunitz, e di tre membri (*PPI3B2*, *PPI3A2*, *PPI2C4*) della famiglia PI1 ha dimostrato che entrambe le famiglie sono espresse a seguito dell'infezione con il nematode *Globodera rostochiensis* e che l'intensità, lo spettro di inibitori prodotti e la velocità di induzione sono in patata strettamente genotipo-dipendente. Evidenze del coinvolgimento del "pathway" dell'JA, ma non dell'SA, nell'interazione patata-*G. rostochiensis* sono invece state ottenute studiando l'espressione di geni delle famiglie Pin2 e PR1. Il gene *PKI1* è stato, infine, introdotto nel ceppo di espressione BL21(DE3)PLYsS di *Escherichia coli* per poter purificare quantità sufficienti a saggiare in vivo l'attività biologica del relativo prodotto proteico. L'analisi del profilo proteico effettuata mediante SDS-PAGE ha evidenziato la presenza di una banda differenzialmente espressa solo nell'estratto ottenuto dalla frazione insolubile della coltura indotta. La proteina chimera (23 kDa) è stata purificata dai corpi di inclusione sia in condizioni denaturanti che non denaturanti.

2. SUMMARY

Pathogens often adapt their enzymatic system to the nature of the polymers present in the host cell wall. For instance plant-pathogenic fungi produce a complement of extracellular enzymes capable of degrading plant structural carbohydrates (Walton, 1994). Plants respond by producing specific inhibitors of pathogen enzymes. Proteinaceous inhibitors (PIs) of proteolytic enzymes have been found to be synthesized by a wide variety of animals, plants, and microorganisms (Green and Ryan, 1971; Richardson, 1977; Taguchi *et al.*, 1992). They are ubiquitous in plants and serve as reserve proteins, regulators of endogenous enzymatic activities, modulators of apoptotic processes, protein stabilizers and defence compounds against animals, insects and microorganisms (Rickauer *et al.*, 1989). PIs can be grouped into four classes corresponding to the four types of proteinases that they are able to inhibit, i. e. serine-, cysteine-, aspartic- and metallo-proteases (Ryan, 1990). Each PI class may be subdivided in different inhibitor families based on sequence homology (Laskowski and Kato, 1980), and it is not uncommon to find isoinhibitors of the same family exhibiting different specificities toward proteases (Ryan, 1990). Some plant serine protease inhibitors are bifunctional, typically displaying trypsin and α -amylase inhibitor activities, while other PIs are made of different domains having distinct PI activities (Koiwa *et al.*, 1997). In addition, some inhibitors show on the same polipeptide chain two or more reactive sites with high similarity, as derived from gene elongation by repeated duplication (Laskowski and Kato, 1980). Functionally, inhibitors are classified as single headed if they have only one reactive site, double headed if they have two and so on (Laskowski and Kato, 1980). Multiheadedness may arise from gene duplication, like in the case of the lima bean inhibitor, or from non-covalent association of several peptide chains each with one reactive site, like in the case of the potato inhibitor I, a tetramer that inhibits four molecules of chymotrypsin (Laskowski and Kato, 1980). Mechanical wounding, bacterial infection, application of fungal elicitors and insect attack are known to enhance proteinase inhibitory activity stimulating PIs accumulation in plant tissues. The direct activity of these inhibitors against herbivorous insects (Hilder *et al.*, 1987) and nematodes (Lilley *et al.*, 1996) has been initially shown by the increased resistance respectively of transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing the cowpea trypsin inhibitor gene. Even if their insecticidal and nematocidal mechanisms of action are well established, little is known about the molecular targets of proteinase inhibitors in pathogenic fungi or in other microorganisms. Antifungal effect *in vitro* has been reported for the proteinaceous trypsin inhibitor *T1* purified from several crops, including corn (Huynh *et al.*, 1992) and barley (Terras *et al.*, 1993), or from bacterial expression systems (Chen *et al.*, 1999). The most interesting classes of PIs are the serine and cysteine PI because of their ability to inhibit the growth of a wide spectrum of plant pathogens. Among the serine protease inhibitors the potato inhibitor I, a tetrameric inhibitor compound of an heterogeneous mix of

isoinhibitors, and the Kunitz inhibitors, a highly polymorphic group of proteins subdivided, based on sequence homology, in the A, B and C groups, are both coded in potato plants by small gene families whose products are particularly abundant in tubers.

The advantages of using PIs to increase plant resistance against different pathogens are the lack of toxic or deleterious effects of these compounds on mammals, and the abundance in these proteins of cysteine and lysine aminoacidic residues, which enhance nutritional properties of crop food (Lawrence and Koundal, 2002).

In our previous work we first selected pathogen extracts containing protease activity to be used as targets for antifungal PI isolation, and then identified a specific serine PI activity able to inhibit proteases, spore germination, germ tube elongation, symptoms formation on leaves of the phytopathogenic fungi *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. The proteic fraction with inhibitory activity was then purified and subjected to sequencing (Hermosa *et al.*, 2005).

The first goal of our work has been to use the obtained aminoacidic sequences DNPLDVISFK, EFECKGKQLQWPELIGVP and LFDNILGVVVDMPVV to design degenerate primers useful in identifying and cloning the corresponding coding genes. DNPLDISFK sequence shares more than 90% homology with the N-terminal region of both potato Kunitz and Aspartic proteinase inhibitors (AF492359, S25314). Moreover this sequence is highly conserved among the members of the Kunitz B group. The couple of primers LPS-RP2 and SP-RP2 have been used in PCR experiments to amplify the genes *PKI1* (DQ087220) and *PKI2* of 666 bp, coding for B group Kunitz inhibitors having the DNPLDVISFK sequence at their N-terminus. Both genes have at their 5' an 84 bp region coding for a signal peptide responsible for the vacuolar targeting of the inhibitor. In addition *PKI1* gene codes for a 24,15 kDa protein that is 98% homologous to the potato kunitz-type proteinase inhibitor *P1H5* (AF492359) that Heibges *et al.*, (2003b) demonstrated to inhibit in vitro the growth of the fungal pathogen *F. moniliforme*. For this reason the *PKI1* gene has been chosen, between the two cloned Kunitz inhibitor genes, to be used in more detailed studies.

EFECKGKQLQWPELIGVP sequence is 100% homologous to the N-terminal sequence of the potato chymotrypsin Inhibitor I (S07233). LFDNILGVVVDMPVV, instead, has a lower level of homology (86%) with both the tomato proteinase Inhibitor I (A24048) and with the potato chymotrypsin Inhibitor I (S07233). The primer SPI and the nested primers SPII and SPIII, have been used in RACE 5' experiments to amplify the 5' region of the gene coding for the sequence EFECKGKQLQWPELIGVP. Aligning the 5' region of the 127 bp gene fragment, termed *Inhibitor II*, amplified by RACE 5' and the 5' region of potato and tomato PI1 sequences submitted in GenBank, it has been possible to design the primers CIFI and CIFII on conserved portions at the start codon of PI1 genes. The couple of primers CIFI-SPIII has been used in RT-PCR experiments on potato sprouts mRNA to amplify five different 324 bp full length cDNA, named *PPI3B2* (DQ087221), *PPI3A2* (DQ087224), *PPI3A4* (DQ087225), *PPI2C4* (DQ087223), *PPI2C1A* (DQ087222), coding for 11,98 kDa monomers. Blastx analysis of the five cloned PI1 cDNAs showed for all of them around 90% homology to the potato *POTPIN1B* gene (L06606) and 88% average homology among them. Since the *PPI3B2* cDNA was the only one to code for both aminoacidic sequences EFECKGKQLQWPELIGVP and

LFDNILGVVVDMPVV we decided to further characterize this gene. Although it is well established that in the potato genome the Kunitz inhibitor family is compound of about 20 genes (Heibges *et al.*, 2003a), for as much as it regards the number of genes belonging to the PI1 family different reports state contrasting results. Cleveland *et al.* (1987) reported the presence of only 6 genes in *S. tuberosum* cv. Russet Burbank, while Lee *et al.* (1986) identified at least 10 members in different *Lycopersicon* species. Southern analysis was performed on *S. tuberosum* cv. Desireè genomic DNA in order to confirm the presence of *PKI1* and *PPI3B2* genes and to determine the number of genes that belong to the PI1 family. The unique hybridizing band obtained when the potato (*S. tuberosum* var. Desireè) DNA was digested with the *BamH* I enzyme and hybridized with the *PKI1* probe indicated that the *PKI1* gene is present as a single copy. On the other hand, the nine (DNA *Nsi* I digested) or more (DNA *EcoR* I, *EcoR* I/ *Nsi* I or *Hind* III digested) hybridizing bands obtained when the DNA was hybridized with the *PPI3B2* probe indicated that this gene, like *PKI1*, could be part of a small multigene family that has at least 9 different members. Northern analysis was performed to study the expression profile of *PKI1* gene and the presence of a putative intron. The analysis of sprouts mRNA showed an unique band of the same size either when the 666 bp *PKI1* probe or the 221 bp *INT* probe, corresponding to the putative intron, were used. When the five leaf mRNA samples were hybridized with the *INT* probe a smaller band was observed only in the samples previously attacked by insects. The expression levels were different for the analyzed samples. A 40 times higher expression level was found in leaf samples untreated or 5 h after inoculation with *B. cinerea*, compared to those corresponding to 20 h after inoculation or wounding. These results indicated both the absence of the putative intron, whose presence had been suggested by the finding of specific consensus sequences, and the presence of one or more homologues of *PKI1* gene coding for smaller transcripts and strongly induced in leaves after insect attack. RT-PCR analysis carried out on sprout and different leaf mRNA samples confirmed the absence of the intron and indicated the expression of the *PKI1* gene, even if at low levels, also in leaf tissues.

Within the A, B or C homology groups of Kunitz inhibitors different members share an average homology of 90%, while members of the A and B groups, more similar between them than with the C group (A vs. C, 34% identity; B vs. C, 38% identity), share on average 75% identity. For this reason the Northern analysis cannot be used to discriminate between the A and B Kunitz groups. In order to solve this problem semiquantitative RT-PCR has been employed. The use of this technique allowed us to study individually the expression profile of the three Kunitz homology groups and of the PI1 family genes *PPI3A2*, *PPI3B2*, *PPI2C4*, that have been selected as representatives of three subgroups of this family. The relative abundance of Kunitz, PI1, Pin2 and PR1 transcripts has been analyzed in:

1. different tissues (roots, stolons, tubers, sprouts, leaves, stems, flowers) of cv. Desireè and P40 potato plants. A basal expression level higher in P40 tissues if compared with cv. Desireè's was observed for all the Kunitz homology groups and in almost all the analyzed tissues. A higher amount of transcripts in Desireè tissues when compared to P40's was, instead, found for the PI1 family, which is constitutively expressed in all the analyzed tissues of both genotypes. *PPI3B2*, *PPI3A2* and *PPI2C4*

genes of the PI1 family are expressed in the sprouts and only to a lower extent in the tubers. Since the entire PI1 family is constitutively expressed in all the analyzed tissues it seems possible that some of the members of this family might have a function in the regulation of the endogenous protease activity, while others in storage processes or in defence mechanisms.

2. roots (local response) and leaves (systemic response) of potato plants (cv Desireè, P40 and LB7/4/c-I-7) infected with the *Ro1* pathotype of the plant pathogen *G. rostochiensis*. The samples have been collected at three different time points (10, 17 and 24 days after infection). All the inhibitors that have been studied (Kunitz, PI1 and Pin2), in contrast with PR1 genes, take part to the plant responses triggered by the nematode *G. rostochiensis* both locally and systemically. *PPI3A2* gene, but not *PPI3B2* and *PPI2C4* genes, is differentially expressed after infection. This results indicate that different members of the same family sharing very high nucleotide sequence homology can be differentially regulated after different stimuli. In addition the differential expression of the Pin2 family, marker of jasmonic acid (JA) pathway (Graham *et al.*, 1985b), while the absence of clear changes in transcription of PR1 genes, markers of salicylic acid (SA) pathway (Sobczak *et al.*, 2005), suggests that the interaction between potato plants and the nematode *G. rostochiensis* involves the use of the JA, but not of the SA pathway. In Desireè and P40 plants there is a local and systemic upregulation of all the expressed inhibitors, while in LB7/4/c-I-7 plants the same PIs are downregulated. This result indicates that these PIs do not have an important role in the resistance process triggered by the *Gro 1-4 R* gene in LB7/4/c-I-7 plants, and moreover that the differences of PI gene regulation found between resistant and susceptible genotypes are mainly genotype-dependent.
3. wounded leaves (local response) and not wounded leaves (systemic response) of four different potato genotypes (Cv. Desireè, P40, P3, P38). As in the nematode infection studies also the PI regulation of wounded potato plants is strictly dependent on the analyzed genotype. The identified differences in PIs expression patterns among different genotypes mainly concerned expression intensity, inhibitors spectrum and speed of induction. In Desireè plants *PPI3A2* and *PPI3B2* genes, but not *PPI2C4* are induced after wounding.

Finally in order to produce sufficient quantities of PIs to be used in *in vitro* assays against different phytopathogenic fungi we expressed the *PKI1* gene in a bacterial expression system. The coding region, without signal peptide, of the *PKI1* gene was initially cloned into the pGEM®-T Easy cloning vector and then subcloned into the unique *Nde* I and *Bam*H I sites of the *E. coli* overexpression vector pET-15b. The constructs were checked by sequencing, and then transformed in the *E. coli* strain DH5 α first and to the expression host BL21 (DE3)pLysS then. BL21 strain contains a chromosomal copy of T7 RNA polymerase gene under the control of the *lac* promoter. *PKI1* expression was induced by the addition of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) to the bacterial culture. The protein extraction was carried out from uninduced and induced samples from both soluble and insoluble (inclusion bodies) cytoplasmic fractions. The chimeric protein overexpressed in the BL21 bacterial system was

predicted to be 23 kDa and contained a portion of the pET-15b vector at the N terminus, made of a His tag and a thrombin cleavage site (2.31 kDa), followed by PKI1 without signal peptide. Analysis of the protein patterns of the SDS-PAGE cytoplasmic fractions indicated a differential band of the expected size in the induced insoluble extract. This fraction, purified by metal chelation chromatography and analyzed by SDS-PAGE, gave a unique band of 23 kDa. The pure chimeric protein was then purified in both not denaturing and denaturing conditions from *E. coli* inclusion bodies. In the first case the extraction process requires the use of imidazole, that adsorbs at 280 nm (preventing the quantification of the purified protein) and inhibits fungal growth. When, instead, the protein was extracted in denaturing conditions it was then necessary to renature and to concentrate it. PKI1 protein was however quickly degraded because it is not possible to use PIs during the extraction process (they would interfere with the results of the antifungal assays).

The obtained results allowed us on one hand to characterize individual genes or groups of genes belonging to the Kunitz and PI1 gene families, whose members share high degrees of similarity, on the other hand to identify the problems associated with the purification of PI genes from bacterial expression systems. These problems arise from the difficulties in extracting proteic products from the inclusion bodies without negatively influencing the results of the *in vitro* and *in vivo* assays against phytopathogenic fungi. In conclusion it was possible to isolate, clone and characterize genes coding for proteic products that had been previously identified from the screening of the redundant plant PI, because able to inhibit fungal growth. The identification of these genes can be useful to increase transgenically or not the resistance of important crop species against different pathogenic fungi. The genes coding for PIs can also be used to transform yeasts or other microorganisms in order to obtain an industrial production of proteins that can be used for instance as biopesticides or to increase the efficacy and the range of plant pathogens that can be controlled with biocontrol agents.

3. INTRODUZIONE

3.1 Binomio pianta-parassita

La selezione delle varietà vegetali utilizzate in agricoltura è stata dettata da scelte basate su diversi principi quali l'adattabilità alle condizioni climatiche, quantità e qualità dei raccolti, capacità di resistere alle malattie o ad insetti. L'agricoltore dell'era preindustriale è riuscito a ridurre o evitare in alcuni casi la distruzione dei campi o la decurtazione dei raccolti operata da diversi organismi patogeni mediante la selezione effettuata su base empirica, essendo completamente ignaro della natura della resistenza e delle stesse malattie. Successivamente con lo sviluppo della microscopia e della biologia ci si è resi conto che le malattie infettive di animali e piante erano il risultato di un'interazione tra due o più fonti. Si è poi compreso come le piante e i relativi parassiti si siano coevoluti per migliaia di anni attraverso un reciproco adattamento. Durante questo processo, la pressione di selezione esercitata dai parassiti ha determinato nelle piante lo sviluppo di meccanismi di difesa (caratteri di resistenza) contro molti di essi. Solo quando un parassita riesce ad adattarsi a questi meccanismi di difesa diventa un potenziale patogeno. Come risultato si sono realizzate più o meno specifiche combinazioni pianta-patogeno, la cui diffusione è stata mediata dall'ambiente in cui tale sistema binario si è sviluppato. Tra le cause di tale diffusione vi sono le pratiche agricole in grado di alterare talvolta anche profondamente gli equilibri naturali. Agli albori della civiltà le prime coltivazioni, probabilmente effettuate contemporaneamente alla raccolta dei prodotti spontanei, erano poco estese, molto distanziate tra loro, per lo più di breve durata e spesso comprendevano popolazioni di piante ad alta difformità genetica. Nei millenni successivi l'evoluzione delle pratiche agricole ha creato le condizioni per la comparsa e l'aggravamento di alcune importanti fitopatie. Le cause principali sono state la formazione di vaste aree coltivate, contigue tra loro e capaci di sostenere un'efficace diffusione degli inoculi dei parassiti, ed uno spostamento delle specie coltivate in ambienti nuovi, spesso molto diversi da quelli originari, eventualmente più favorevoli a parassiti o meno favorevoli alle piante ospiti. Questi processi sono andati via via intensificandosi fino ad assumere l'attuale situazione in cui le colture si sviluppano in condizioni ecologiche molto diverse da quelle delle zone di origine. A favorire ulteriormente la diffusione e lo sviluppo delle patologie delle piante sono stati anche i profondi cambiamenti apportati alle tradizionali tecniche di coltivazione. Particolarmente drammatici sono stati gli effetti prodotti dalla riduzione delle rotazioni colturali, dall'aumento della densità d'impianto, dal cambiamento delle tecniche di irrigazione, dalla concimazione intensiva, dalla meccanizzazione, dalla coltivazione in ambiente protetto ed infine dall'impiego di materiale genetico uniforme. Le elevate perdite di produzione causate dalle malattie parassitarie sono un fenomeno che risulta più evidente nei paesi in via di sviluppo, dove spesso una pratica agricola poco evoluta si

limita a raggiungere i livelli di produzione primitiva, cioè quella conseguibile senza l'impiego di alcun metodo di lotta ai microrganismi fitopatogeni ed agli insetti. Nei paesi in cui, invece, prevalgono forme di agricoltura più evoluta, il controllo degli organismi patogeni delle piante è effettuato principalmente mediante l'impiego di prodotti chimici di sintesi per i loro numerosi vantaggi, tra cui la facilità di applicazione, l'efficacia, l'affidabilità e l'ampio spettro d'azione. L'impiego di tali prodotti non è però privo di svantaggi: primi tra tutti sono i rischi ecologici ed ambientali (prevalentemente causati da un utilizzo non ottimale), quali la comparsa di popolazioni di parassiti resistenti agli stessi fitofarmaci, l'inquinamento dei terreni e delle falde freatiche, la riduzione della microflora utile, la presenza di residui tossici nelle derrate alimentari, ecc. Per i rischi suddetti, recentemente la ricerca si è orientata verso lo sviluppo di metodologie ecocompatibili (alternative e/o complementari all'uso dei fitofarmaci) per il controllo delle malattie delle piante quali:

- l'applicazione di microrganismi agenti di biocontrollo.
- l'utilizzo di metodologie di lotta agronomica (solarizzazione, pacciamatura, ecc.).
- l'uso di tecniche di miglioramento genetico classico con il supporto della biologia molecolare per la selezione di caratteri utili ("marker assisted selection").
- l'uso di piante transgeniche esprimenti geni di resistenza ai patogeni.
- l'impiego di molecole di origine naturale attive contro il patogeno (biofitofarmaco).

3.2 Interazione pianta - organismo fitopatogeno

La penetrazione della pianta da parte dei patogeni può avvenire mediante diverse modalità. Nel caso dei funghi avviene attraverso ferite, aperture naturali (stomi, idatodi, stimmi, lenticelle aperte) oppure attraverso la formazione di strutture specializzate (appressorio) e la secrezione di enzimi cutinolitici e cellulolitici. I batteri ed i virus che non dispongono, invece, di apposite strutture atte a penetrare debbono sfruttare necessariamente le aperture naturali o le ferite provocate da vettori o da cause naturali. Esistono poi parassiti che sfruttano mezzi meccanici per nutrirsi della pianta ospite (insetti) o per penetrare al suo interno (nematodi). I nematodi endoparassitici penetrano attraverso i tessuti dell'ospite direttamente, utilizzando sia metodi meccanici che biochimici. In questo caso la penetrazione e successiva migrazione attraverso i tessuti della pianta da parte del patogeno è mediata dall'utilizzo dello stiletto (apposita struttura per la penetrazione ed il nutrimento) in concomitanza con le secrezioni (enzimi idrolitici) della ghiandola esofagea. Durante l'interazione tra il patogeno che penetra o che si nutre e la pianta ospite è avviato un processo di riconoscimento tra i due organismi (Daly, 1984). Molte componenti della pianta quali gli acidi grassi, i frammenti di parete ed alcuni composti fenolici, possono agire da molecole segnale per l'attivazione di geni del patogeno i cui prodotti costituiscono i fattori di patogenicità. Allo stesso modo, la pianta percepisce molecole segnale che indicano la presenza del patogeno, come componenti della parete cellulare del fungo rilasciati dall'azione di enzimi idrolitici della pianta (glucanasi e chitinasi) e/o molecole prodotte dal patogeno in risposta ai segnali provenienti dalla pianta. La percezione del patogeno da parte della

pianta induce, quindi, la trascrizione dei geni coinvolti nelle risposte di difesa. La resistenza di una pianta nei confronti di un determinato patogeno può essere caratterizzata da un unico/pochi geni (resistenza mono/oligogenica, anche detta verticale), oppure da più geni (resistenza poligenica o orizzontale). Nel secondo caso ciascuno è necessario, ma non sufficiente, al conseguimento della resistenza poiché ogni gene codifica per un fattore che si comporta da carattere quantitativo. Le resistenze oligogeniche a differenza di quelle poligeniche sono molto efficaci e poco influenzabili dalle condizioni ambientali e colturali, ma sono solitamente poco durevoli essendo efficaci solo verso specifiche razze del patogeno. Tale patogeno, a causa della pressione selettiva, sarà in grado di superare rapidamente la resistenza mediante la comparsa di nuove razze fisiologiche. Tra gli esempi di resistenza poligenica vi è la “resistenza del non ospite”, resistenza espletata da tutte le piante di una specie verso i membri di una data specie di un patogeno (Heath, 1991). Essa coinvolge geni e fattori di difesa precostituiti ed indotti (Heath, 1997). Contrariamente, la “resistenza dell’ospite” viene espressa da un genotipo di una pianta appartenente ad una specie ospite normalmente suscettibile ad una particolare razza di un patogeno. Spesso è controllata da un singolo gene di resistenza (*R*), il cui prodotto interagisce direttamente od indirettamente con un elicitore specifico del patogeno codificato da un gene definito di avirulenza (*Avr*) (Hammond-Kosack and Jones, 1996). I geni *Avr* sono stati scoperti grazie alla loro capacità di codificare prodotti che inducono risposte di difesa in piante aventi i corrispettivi geni di resistenza (*R*). In questo caso l’interazione tra pianta ospite (resistente) e patogeno è incompatibile. Al contrario, si definisce interazione compatibile quella tra una pianta ospite (suscettibile) che si ammala in seguito all’attacco di un patogeno (virulento). Nell’interazione compatibile, i geni *Avr* e/o *R* sono assenti o non funzionali (Keen, 1990). (Fig.1)

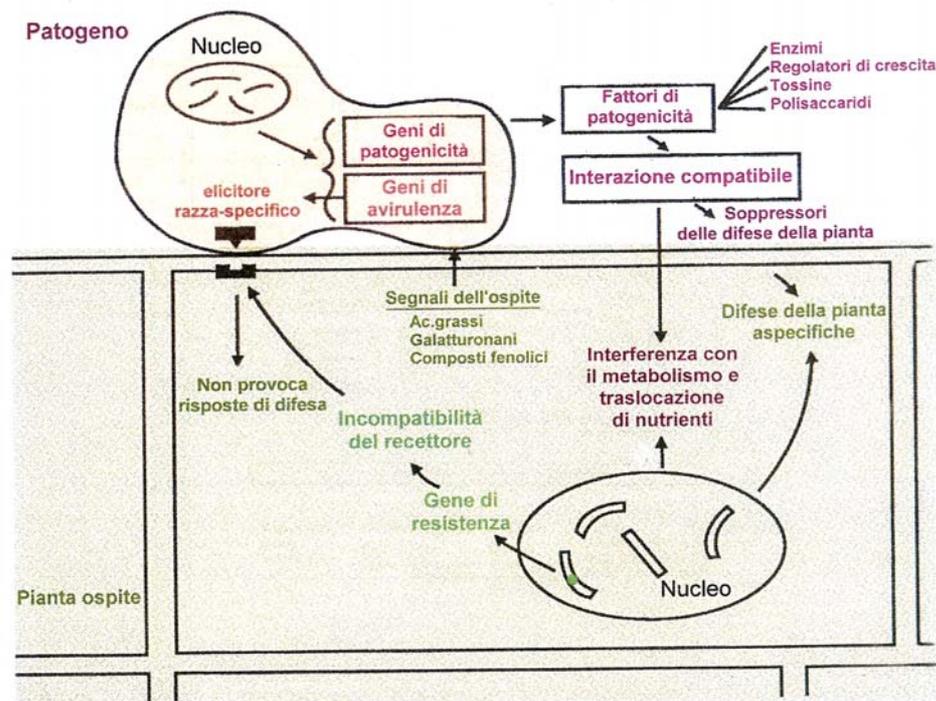


Figura 1: Illustrazione di un'interazione compatibile tra un patogeno e la sua pianta ospite.

La resistenza dell'ospite è stata spiegata da Flor (1955) con la teoria gene-per-gene, secondo la quale nell'interazione incompatibile per ciascun gene che conferisce virulenza (patogenicità) al patogeno c'è un corrispondente gene di resistenza nella pianta ospite, che conferisce resistenza al patogeno e viceversa. In questo caso il gene di virulenza diventa un gene di "avirulenza". Quando prende luogo l'interazione, diretta od indiretta, del prodotto di un gene di avirulenza con quello del corrispondente gene di resistenza, avviene l'attivazione delle risposte di difesa. Tali risposte sono caratterizzate dal rapido flusso di calcio o di altri ioni, dall'"oxidative burst" extracellulare, dalla riprogrammazione trascrizionale nel ed intorno al sito di infezione ed in molti casi dalla morte cellulare programmata localizzata (HR) (Greenberg and Vinatzer, 2003; Nimchuck *et al.*, 2003). La somma di questi eventi porta al blocco della crescita del patogeno. In contrapposizione l'assenza di un riconoscimento specifico determina nella pianta una risposta di difesa basale, che è indotta da "patterns molecolari associati al patogeno" (PAMPS) i quali sono attivati da molecole del patogeno quali la flagellina o i lipopolisaccaridi (LPS) (Gomez-Gomez and Boller, 2002). La risposta di difesa basale si sovrappone significativamente quella mediata dalle proteine R, anche se risulta essere più lenta e di minore intensità (Belkhadir *et al.*, 2004). La difesa basale non impedisce la colonizzazione da parte del patogeno, ma ne limita solamente la diffusione (Glazebrook *et al.*, 1997). Per tale motivo l'azione delle proteine R sembra essere principalmente quella di accelerare ed amplificare l'innata risposta di difesa basale.

3.3 I meccanismi di difesa delle piante

I meccanismi di difesa delle piante possono essere raggruppati in due grandi categorie: resistenza meccanica e resistenza biochimica.

La resistenza meccanica può essere pre-infezionale o preconstituita e post-infezionale o indotta. La prima riguarda la capacità della pianta di formare barriere in grado di contrastare l'adesione, la penetrazione o la colonizzazione da parte del patogeno. Tratti caratteristici di questa difesa sono lo spessore della cuticola, la lignificazione della parete, il contenuto in cera, la fuoriuscita di essudati, i tricomi, la struttura degli stomi, il contenuto in calcio della parete, ecc.

La cuticola è costituita da una struttura spugnosa idrofila formata da cutina mista ad inclusioni idrofobe di cera ed ostacola l'adesione e la penetrazione del patogeno, nonché la fuoriuscita di alcuni essudati della pianta necessari alla germinazione delle spore. Le cere, caratterizzate da elevata idrofobicità, riescono difatti ad ostacolare l'adesione delle gocce d'infezione e la formazione di uno strato continuo d'acqua in cui i propagali fungini possono depositarsi e germinare. Lignina e suberina depositate nella parete cellulare dei vegetali possono impedire la penetrazione di molti funghi fitopatogeni, aumentando le resistenze della pianta. I tricomi formano uno strato idrorepellente ostacolando l'adesione delle spore, l'inoculo di virus da parte di vettori, ed impediscono l'alimentazione, l'ovideposizione ed i movimenti di artropodi parassiti. La struttura degli stomi, qualora essi siano piccoli, poco accessibili e poco

numerosi, possono impedire l'ingresso del patogeno. Anche il Ca può svolgere un ruolo importante nella resistenza come nell'interazione tra pomodoro e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. In questo caso la resistenza della pianta è determinata dalla sostituzione dello Zn (fondamentale alla sporulazione e alla virulenza del fungo) e del Fe con il Ca.

Per resistenza meccanica post-infezionale si considerano, invece, tutte le difese atte a bloccare lo sviluppo del patogeno, e che sono indotte dall'infezione. Queste possono essere a loro volta suddivise in strutture di difesa istologiche, cellulari, citoplasmatiche o in reazioni di difesa necrotiche.

Nell'ambito delle strutture di difesa istologiche vi è la formazione dello strato ligno-suberizzato mediante il processo della lipocoumation. Tale processo consiste nell'accumulo di sostanze quali suberine, lignosuberine, lignina, gomme e tannini nelle pareti cellulari e negli spazi intercellulari dei primi strati sottostanti le cellule morte. Un'ulteriore barriera protettiva intorno ai tessuti danneggiati è costituita da uno strato di sughero determinato dalla suberificazione di uno strato di cellule prodotte dal meristema sottostante. Vi è poi la formazione dello strato di abscissione che consente il distacco dei tessuti morti e l'eliminazione dell'inoculo in esso presente. Tra le strutture di difesa istologica ritroviamo anche le talle, estroflessioni citoplasmatiche delle cellule perivascolari che ostruiscono il lume dei vasi ostacolando la diffusione del patogeno nel sistema vascolare della pianta. L'avanzata del patogeno e lo scambio di tossine e nutrienti tra quest'ultimo ed i tessuti circostanti della pianta è ostacolata infine dalle gomme, contenenti composti antibiotici (tannini), che sono in grado di insinuarsi negli spazi intercellulari.

La seconda categoria è costituita dalle strutture di difesa cellulare. Tra queste vi sono le papille o lignotuberi, derivanti dall'apposizione di sostanze di svariata natura (soprattutto callosio) nell'area sottostante il punto di penetrazione del patogeno, e le zone di stratificazione, costituite da minerali quali silicio, calcio e manganese o da sostanze organiche quali fenoli, melanina, lignina, suberina, depositati in prossimità dello stiletto di penetrazione.

Tra le strutture di difesa citoplasmatiche, abbiamo la rottura di lisosomi con fuoriuscita di fitoncidi (sostanze ad azione antibiotica).

Nella quarta categoria abbiamo infine le reazioni di difesa necrotiche che culminano con la reazione di ipersensibilità (RI). La reazione di ipersensibilità si definisce come la reazione delle piante ad un agente patogeno con conseguente morte rapida di solo poche cellule o di una porzione ristretta di tessuto, in grado di limitare la progressione dell'infezione. Tale reazione potrebbe essere considerata un fenomeno di sola resistenza meccanica, in realtà l'infezione risulta bloccata anche nelle cellule vicine a quelle morte, poiché sono intervenuti anche processi di reazione biochimica post-infezionale.

La resistenza biochimica analogamente a quella meccanica può essere pre-infezionale (precostruita) e post-infezionale (indotta). La prima prevede la mancanza di composti nutritivi, attrattivi o stimolanti oppure la presenza di composti inibitori, quali le proibitine, l'acido caffeico, l'acido clorogenico, il catecolo, le saponine, i glucosidi cianogenetici, ecc.

Le proibitine o fitoanticipine sono fenoli, chinoni e terpeni presenti negli essudati della pianta. Inibiscono lo sviluppo dei patogeni per tossicità diretta o per inibizione della sintesi di enzimi e fitotossine. Fenoli quali il catecolo l'acido caffeico e l'acido clorogenico svolgono un ruolo importante nella lignificazione delle pareti cellulari indotta dall'attacco del patogeno. Tali sostanze una volta

trasformate in chinoni dalle polifenolossidasi, hanno una spiccata attività antimicrobica. La stessa reazione di polifenolossidazione produce anche H_2O_2 che aiuta la polimerizzazione dei fenoli in sostanze ligniniche. Tra i meccanismi di resistenza biochimica pre-infezionale troviamo anche i glucosidi. Dall'idrolisi del legame glucosidico, ad opera di β -glucosidasi specifiche, si ha la formazione di uno zucchero e di un aglicone avente attività fungitossica. Altre molecole utilizzate dalla pianta durante la resistenza biochimica pre-infezionale sono le saponine, i glucosidi cianogenici ed i glucosinolati. Le saponine legano gli steroli di membrana e causano la formazione di pori. Tra le saponine, l'avenacina è sicuramente la più studiata. Essa è normalmente presente in forma biologicamente inattiva, l'avenacoside, ma a seguito dell'attacco del patogeno viene attivata dalla glucosio idrolasi. I glucosidi cianogenici sono invece molecole in grado di rilasciare HCN, sostanza tossica che agisce sulla respirazione cellulare. I glucosinolati, infine, sono molecole capaci di rilasciare nitrili, tiocianati e isotiocianati (composti fortemente tossici) quando processati da tioglucosidasi.

La resistenza biochimica post-infezionale è legata alla secrezione di sostanze che non erano presenti prima dell'infezione oppure che erano presenti in quantità ridotte: i fenoli, le fitoalessine, i sesquiterpeni, i R.O.S. (reactive oxygen species), le proteine PR (pathogenesis related), ecc. I fenoli esercitano la loro azione solo dopo ossidazione ad opera di fenolasi, fenolossidasi, perossidasi e polifenolossidasi in lignine, tannini e chinoni. Queste ultime hanno spiccata attività antimicrobica, avendo la capacità di denaturare le proteine e di inibire l'attività enzimatica dei parassiti. Il burst ossidativo rappresenta una delle prime reazioni di difesa della pianta ed è caratterizzato dall'accumulo di H_2O_2 e delle specie reattive dell'ossigeno (R.O.S.) nei tessuti infetti. I R.O.S. accumulatisi durante le reazioni incompatibili possono distruggere le membrane cellulari determinando la produzione di perossidi lipidici ed allo stesso tempo favorendo reazioni che rafforzano le pareti cellulari. I R.O.S. inoltre agiscono sia come molecole antimicrobiche che come molecole segnale in grado di attivare la RI (Reazione di Ipersensibilità) e la SAR (Resistenza Sistemica Acquisita). La SAR consiste nell'acquisizione di uno stato di resistenza in parti distali, anche non ancora sviluppate, dal sito di infezione. La condizione di SAR è associata all'espressione di numerosi geni, spesso indicati come "SAR genes" ed all'attivazione di "pathways" metabolici rivolti alla produzione di numerose proteine e metaboliti. Tale tipo di resistenza è mediata da almeno nove famiglie di geni, tra i quali quelli che codificano per le proteine PR, per le perossidasi e le lipossigenasi. Messaggeri della SAR sono l'acido salicilico, l'acido arachidonico, l'acido dicloronicotinico, il metil jasmonato e l'etilene. Tra i meccanismi di difesa biochimica post-infezionale vi è anche l'utilizzo delle fitoalessine. Queste sono composti a basso peso molecolare, lipofili ed ad attività antimicrobica prodotti dalla pianta *ex-novo* in risposta ad infezione o stress. Non hanno specificità d'induzione o d'azione. La loro sintesi è indotta più rapidamente nelle combinazioni incompatibili che in quelle compatibili. Tra le fitoalessine sesquiterpenoidi troviamo la rishitina e la lubimina (Solanaceae) mentre tra le fitoalessine isoflavonoidi troviamo la risatina, la gliceollina e la faseolina (Leguminose). Enzimi chiave per la loro sintesi sono la PAL (phenylalanine ammonia lyase) e la CHS (chalcone synthase).

Di notevole importanza sono anche le PR proteins. Esse si accumulano a seguito di stress biotici o abiotici sia nelle cellule che negli spazi intercellulari.

La loro produzione risulta efficace nell'incremento delle difese della pianta sia nelle cellule circostanti al sito di penetrazione che sistemicamente. Molte di esse hanno spiccata attività antimicrobica o determinano il rafforzamento delle pareti cellulari della pianta.

3.3.1 Le PR proteins

Si definiscono come le proteine vegetali indotte nelle situazioni patologiche. Sono state individuate per la prima volta nel 1970 in foglie di tabacco attaccate da TMV (tobacco mosaic virus) che mostravano la RI. Sono spesso presenti in piccole quantità, ma si accumulano ad elevate concentrazioni sia nella cellula che negli spazi intercellulari in risposta all'attacco di un patogeno o a stress abiotici (induttori chimici, stress osmotici, UV, ferita, ecc). Possono, inoltre, essere espresse in maniera costitutiva sia in specifici organi (spesso radici e foglie senescenti), sia durante fasi specifiche dello sviluppo della pianta (alcune di queste proteine hanno ruoli diversi nella maturazione del polline e nella fioritura). Tra le molecole coinvolte nell'attivazione dei geni codificanti per le proteine PR vi sono l'acido salicilico, l'etilene, l'acido jasmonico ed altri messaggeri trasportati sistemicamente nella pianta. Tra le caratteristiche che accomunano le varie PR proteins vi sono:

- estrema acidità o basicità, per cui esse risultano altamente solubili e reattive
- stabilità e resistenza agli enzimi proteolitici, anche endogeni
- massa molecolare relativamente piccola (tra 8 e 50 kDa)
- localizzazione intercellulare, parietale o vacuolare
- emivita lunga, il che ne favorisce l'accumulo.

Le proteine PR sono state classificate in undici famiglie (Van Loon, 1985) a seconda della funzione, delle caratteristiche sierologiche, sequenza amminoacidica, peso molecolare ed altre proprietà biologiche. Comprendono enzimi (glucanasi, proteasi, lisozimi, ribonucleasi, chitosanasi, perossidasi), inibitori di proteasi, proteine ricche in glicina o cisteina, taumatine, osmotine e proteine simili (Tabella 1). Le prime cinque famiglie (PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5) sono le più ampiamente studiate. Ognuna di queste famiglie presenta due sottofamiglie: una basica a localizzazione vacuolare ed una acida a localizzazione esocellulare (apoplastica) (Kitajima and Sato, 1999).

Tabella 1. Classificazione delle “pathogenesis related proteins” (PR).

Famiglia	Proprietà
PR-1	antifungine, 14-17 kDa
PR-2	endo-beta-1,3-glucanasi di classe I, II, III; 31-35KDa
PR-3	endochitinasi di classe I, II e IV; circa 30 kDa
PR-4	antifungine, proteine <i>win-like</i> , attività endochitinasica, 13-15 kDa
PR-5	antifungine, proteine <i>thaumatin-like</i> , osmotine, zeamatine, permeatine
PR-6	inibitori di proteasi, 6-13 kDa
PR-7	Endoproteasi
PR-8	chitinasi di classe III, lisozima
PR-9	Perossidasi
PR-10	Ribonucleasi
PR-11	attività endochitinasica

Anand *et al.*, (2002) hanno riportato che l'espressione transgenica, costitutiva, di una o più proteine PR è in grado di aumentare le resistenze della pianta.

3.3.2 Proteasi ed inibitori di proteasi

Gli enzimi proteolitici sono essenziali per la sopravvivenza di tutti gli organismi viventi e sono codificati da approssimativamente il 2% dei geni. Essi sono coinvolti nella proteolisi, processo metabolico responsabile dell'idrolisi e del turnover delle proteine (Ryan and Walker-Simmons, 1981). Le funzioni da essi svolte variano dalla degradazione delle proteine di riserva, al fine di permettere l'assimilazione dell'azoto nei pathways biosintetici (durante la germinazione dei semi), all'implicazione nei processi di sviluppo, quali la morte cellulare programmata durante la formazione delle trachee (Minami and Fukuda, 1995), ed all'interazione tra le piante ed altri organismi. Questi enzimi risultano, infatti, fondamentali nel processo di infezione dei patogeni e nella digestione delle proteine vegetali da parte degli erbivori. Una caratteristica interessante nelle proteasi dei patogeni è costituita dall'adattamento di questi enzimi ai substrati presenti nei tessuti dell'ospite. Infatti i funghi fitopatogeni sono in grado di produrre una batteria di enzimi esocellulari, capaci di degradare i polimeri (carboidrati e proteine) presenti nei tessuti vegetali (Walton, 1994).

Per le molteplici funzioni svolte dalle proteasi, queste se non controllate possono risultare potenzialmente molto pericolose all'interno dei sistemi viventi. Esistono, quindi, svariati meccanismi per il monitoraggio dell'attività proteasica endogena, tra cui di rilievo è l'interazione di questi enzimi con le proteine che li inibiscono (Rawlings *et al.*, 2004).

Gli inibitori di proteasi di natura proteica (PI) sono proteine ubiquitarie in natura essendo stata confermata la loro presenza in un'ampia varietà di animali, piante e microrganismi (Green and Ryan, 1971; Richardson, 1977; Taguchi *et al.*,

1992). (Fig. 2).

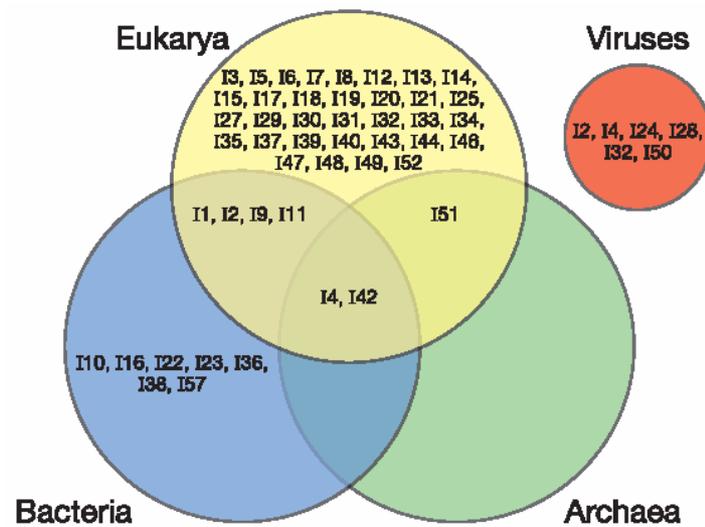


Figura 2: Distribuzione delle famiglie di inibitori di proteasi in natura.

La loro esistenza fu inizialmente riportata alla fine del diciannovesimo secolo quando Fermi e Pernossi (1894) notarono la presenza di attività inibitoria della tripsina nel siero. L'isolamento e la caratterizzazione dei primi PI, così come la comprensione di molti concetti legati all'interazione proteasi-inibitore sono stati inizialmente descritti nei lavori pionieristici di M. Kunitz durante gli anni 1930-40 (Birk, 2003). I PI possono essere raggruppati in quattro classi corrispondenti alle classi di proteasi che sono in grado di inibire, (Laskowski *et al.*, 1987) i. e. serina-, cisteina-, aspartico- e metallo-proteasi. Ogni classe di PI può essere suddivisa in diverse famiglie sulla base delle omologie di sequenza amminoacidica (Laskowski and Kato, 1980) (Tabella 2).

Tabella 2. Famiglie di inibitori proteici di proteasi di natura vegetale.

Famiglia	Proteasi inibita
Serina proteasi inibitori Famiglia Soybean trypsin inhibitor (kunitz) Famiglia Bowman-Birk Famiglia Barley trypsin inhibitor Famiglia Potato inhibitor I Famiglia Potato inhibitor II Famiglia Squash inhibitor Famiglia Ragi I-2/ mais trypsin inhibitor Famiglia serpine	Tripsina e chimotripsina
Cisteina proteasi inibitori (fitocistatine)	Papaina, catepsina B, H, L
Metallo proteasi inibitori	Carbossipeptidasi A, B
Asparitico proteasi inibitori	Catepsina D

E' comunque possibile ritrovare inibitori appartenenti alla stessa famiglia che esibiscono differenti specificità nei confronti delle proteasi (Ryan, 1990). Ciascuna famiglia può essere ulteriormente suddivisa in gruppi, sulla base dell'omologia di sequenza nucleotidica, come nel caso della famiglia degli inibitori kunitz. Da un punto di vista funzionale, i PI possono essere classificati come "single headed" se possiedono un unico sito attivo o "double-multi headed" se hanno due-più siti attivi (Laskowski and Kato, 1980). La presenza di molteplici siti attivi può derivare da: duplicazione genica, come nel caso del lima bean inhibitor, o da associazione non covalente di diverse catene peptidiche ognuna avente un sito attivo, come nel caso del potato inhibitor I, un tetramero che inibisce quattro molecole di chimotripsina (Laskowski and Kato, 1980). Le modalità con le quali gli inibitori possono interagire con le proteasi ricadono in due categorie: reazione di "trapping" irreversibile e reazione di "tight-binding" reversibile (Rawlings *et al.*, 2004).

1. La reazione di trapping prevede l'interazione con una endopeptidasi dato che dipende dall'idrolisi di un legame peptidico interno all'inibitore. Tale reazione determina il cambiamento conformazionale irreversibile di quest'ultimo (anche denominato inibitore "suicida"). Le serpine, le α_2 -macroglobuline e gli inibitori delle caspasi p35 sono le uniche tre famiglie di PI a mostrare questo meccanismo di reazione.
2. Nella reazione reversibile di tight-binding gli inibitori formano interazioni ad alta affinità con il sito attivo dell'enzima bersaglio. L'inibizione è causata dal legame dell'inibitore all'enzima in maniera substrato-simile. La forma intatta ("vergine") dell'inibitore è nel complesso in equilibrio con la forma "modificata", nella quale il legame peptidico del sito reattivo è idrolizzato. Il complesso può poi dissociarsi rilasciando o la forma "vergine" o quella "modificata" dell'inibitore.

Per quanto riguarda la massa molecolare dei PI di pianta questa può variare tra i 3000 ed i 25000 Da. I più studiati sono gli inibitori delle serina proteasi (serina PI), correntemente suddivisi in otto famiglie, in base alla loro sequenza amminoacidica primaria. Nonostante le loro sostanziali differenze topologiche e relative alla sequenza primaria, il meccanismo di catalisi e la struttura del sito di reazione dei serina PI di pianta risultano ben conservati se si fa eccezione della sottofamiglia delle serpine.

Le funzioni fisiologiche svolte dai PI di pianta sono le seguenti:

- Regolazione dell'attività proteasica endogena prima e durante la germinazione dei semi al fine di controllare il turnover delle proteine e la digestione dei prodotti di riserva. La concentrazione degli inibitori si riduce durante la germinazione per facilitare l'idrolisi delle proteine utili durante questo processo (Ussuf *et al.*, 2001).
- Protezione delle piante dall'attacco di animali, insetti e microrganismi (Rickauer *et al.*, 1989). Tale ruolo è stato suggerito dall'espressione dei geni di PI in foglie di diverse specie a seguito di ferite, infezioni batteriche, applicazione di elicitori fungini e attacco da parte di insetti.
- Stabilizzazione delle proteine. Il rapido accumulo nelle ultime fasi di sviluppo del seme, soprattutto durante l'essiccazione ha fatto supporre questa funzione (Domosey *et al.*, 1995). Xu *et al.*, (1996) hanno inoltre indicato l'accumulo di inibitori della tripsina (TI) nei semi in sviluppo di fagiolo e lattuga a seguito di stress legati alla disidratazione quali siccità, salinità, ed applicazione di acido abscissico.
- Modulazione dell'apoptosi o morte cellulare programmata (PCD). È stato mostrato come l'applicazione ectopica di cistatine (cisteina PI) inibisca l'attività delle cisteina proteasi indotte, che a sua volta bloccano la PCD (Solomon *et al.*, 1999). È stato quindi suggerito che la regolazione della PCD nelle piante sia basata sull'equilibrio tra l'attività delle cisteina proteasi e dei loro inibitori.

3.3.3 PI ed attività inibitoria nei confronti dei patogeni

L'evidenza diretta del coinvolgimento di questi composti tra i meccanismi di difesa delle piante è stato inizialmente dimostrato dall'espressione del gene del "cowpea trypsin inhibitor" (*CpTI*) in piante di tabacco, le quali mostravano un'aumentata resistenza nei confronti dell'insetto *Manduca sexta* (Hilder *et al.*, 1987). Da allora molti diversi inibitori della serina e della cisteina proteasi sono stati utilizzati per sviluppare piante transgeniche resistenti agli insetti. Lo stesso gene *CpTI* utilizzato per trasformare diverse piante ospiti ha determinato resistenza nei confronti di vari coleotteri e lepidotteri, mentre piante di tabacco trasformate con geni codificanti per Proteinase inhibitor I (PI1) e Proteinase inhibitor II (Pin2) o con entrambe erano resistenti a lepidotteri ed ortotteri (Ussuf *et al.*, 2001). Altri esempi sono costituiti da piante di tabacco transgeniche esprimenti l'inibitore della tripsina *TI* che erano resistenti a *Spodoptera litura* (Yeh *et al.*, 1997) e piante di riso trasformate con il gene della cistatina di mais *CC* resistenti a *Sitophilus zeamais* (Irie *et al.*, 1989). In prove in campo in cui piante esprimenti il gene *CpTI* sono state testate contro *Helicoverpa zae* i livelli di resistenza si sono mostrati variabili da un esperimento all'altro. Ussuf *et al.*, (2001) hanno ipotizzato che la protezione offerta da questo gene possa essere influenzata da diversi fattori quali l'età della pianta, le condizioni ambientali,

l'eterogeneità della popolazione dell'insetto. Esistono comunque evidenze che gli insetti siano in grado di cambiare la composizione delle proteasi nel loro intestino o di sovraesprimere quelle già esistenti o di produrre nuove varianti insensibili ai PI introdotti nella pianta, superando così la minaccia che è offerta da questi ultimi (Ussuf *et al.*, 2001).

L'attività antivirale dei PI è stata evidenziata da recenti lavori (Campos *et al.*, 1999). L'orizacistatina, una cisteina PI di riso, quando introdotta in piante transgeniche di tabacco determina resistenza nei confronti dei potyvirus, poiché questi ultimi utilizzano cisteina proteasi durante i processi proteolitici. L'espressione costitutiva di questa cistatina ha determinato resistenza nei confronti di due importanti virus quali il TEV di tabacco e il PVY di patata, ma non nei confronti del virus del mosaico del tabacco che non utilizza cisteina proteasi.

Meno conosciuti sono gli effetti di questo tipo di composti su funghi ed altri microrganismi. Gli effetti osservati sui funghi, quando questi vengono trattati con PI di pianta purificati, includono inibizione della crescita, inconsueta ramificazione, coiling e fuoriuscita del succo citoplasmatico dalle ife (Lorito *et al.*, 1994a). Il meccanismo d'azione a livello molecolare non è però ancora stato chiarito. Una diretta attività antifungina dei PI di pianta fu inizialmente riportata da Lorito *et al.*, (1994a): in questo lavoro, quattro PI proteici isolati da foglie giovani di cavolo, inibivano la germinazione delle spore e l'allungamento del tubetto germinativo in saggi *in vitro* dei funghi fitopatogeni *Botrytis cinerea* e *Fusarium solani*. Per quanto riguarda il possibile meccanismo d'azione, tale miscela di PI da cavolo ha mostrato di essere capace di inibire l'attività proteolitica responsabile dell'attivazione del complesso enzimatico della β -D-glucan sintasi, con conseguente riduzione del processo di incorporazione dei glucani e della formazione delle pareti cellulari in *Botrytis cinerea*. La maggior parte dei PIs studiati fin'ora si sono rivelati essere attivi solo contro un range di funghi relativamente ridotto. Tuttavia un PI caratterizzato da elevati livelli di espressione in genotipi di mais resistenti all'infezione da *Aspergillus flavus*, ha mostrato una forte attività contro gruppi di funghi tassonomicamente diversi appartenenti sia agli Hyphomycetes che agli Zygomycetes (Chen *et al.*, 1999). Heibges *et al.*, (2003b) hanno, inoltre, riportato l'attività antifungina *in vitro* di due inibitori Kunitz nei confronti del fungo *Fusarium moniliforme*. Anche nel nostro laboratorio sono stati isolati da germogli di patata due inibitori di serina proteasi aventi forte attività inibitoria nei confronti di: proteasi fungine, germinazione delle spore, allungamento del tubetto germinativo e sviluppo delle lesioni necrotiche prodotte dai funghi *B. cinerea* e *A. alternata in vivo* (Hermosa *et al.*, 2005). Non solo i serina PI di pianta sono però in grado di ridurre l'attività enzimatica dei funghi fitopatogeni. Recentemente è stato isolato da piante di zucca (*Cucurbita maxima*) un inibitore delle aspartico proteasi attivo contro la pepsina e capace di inibire la crescita del fungo *Glomerella cingolata* (Christeller *et al.*, 1998). Un ultimo esempio è fornito dalle cistatine estratte da *Castanea sativa* che hanno mostrato attività antifungina sopprimendo la crescita del fungo *B. cinerea* (Pernas *et al.*, 1999).

Risultati simili sono stati ottenuti nei confronti dei nematodi quando è stata saggiata la resistenza di piante transgeniche trasformate con inibitori di serina e di cisteina proteasi. Sia le cisteina che le serina proteasi sono presenti nell'intestino di nematodi fitopatogeni. L'assimilazione dei PI da parte dei nematodi è resa possibile dal ridotto peso molecolare di queste molecole. I

nematodi infatti sono in grado di assimilare attraverso il “feeding tube” molecole non superiori ai 40 kDa (Cai *et al.*, 2003). Tra gli esempi di PI ad attività nematocida vi è il gene *CpTI* che in piante transgeniche di patata influenza la crescita ed il destino sessuale del cyst nematode *Globodera pallida* (Atkinson and Hopher, 1996). Urwin *et al.*, (1995) hanno poi descritto l'effetto deprimente della cistatina di riso *Oc-1* sulla crescita e sullo sviluppo di *G. pallida* quando espressa in piante transgeniche di pomodoro. Risultati ottimi sono stati ottenuti anche piramidando due diversi geni di PI quali il *CpTI* e l'*Oc-1ΔD86* (forma modificata e migliorata di *Oc-1*). E' stato così possibile aumentare la resistenza nei confronti dei patogeni *G. pallida*, *Heterodera schachtii* e *Meloidogyne incognita* (Urwin *et al.*, 1998). Cai *et al.*, (2003) hanno recentemente descritto l'attività inibitoria della sporamina (un inibitore Kunitz) su *H. schachtii* quando espressa in *Beta vulgaris*. Nel 2001 Urwin *et al.*, hanno infine fornito la prima dimostrazione dell'efficacia nematocida in campo di cisteina PI espressi in piante di patata transgeniche.

3.3.4 Inibitori Kunitz.

I PI appartenenti alla famiglia Kunitz sono per lo più costituiti da una singola catena polipeptidica di 20-24 kDa in cui quattro cisteine formano due ponti disolfuro. Sul “loop” definito da uno dei due ponti disolfuro è presente l'unico sito reattivo dell'inibitore. Walsh e Twichell, (1991) hanno indicato la regione altamente conservata tra il residuo amminoacidico 49 e 65 [L,I,V,M]-x-D-x-[E,D,N,T,Y]-[D,G]-[R,K,H,D,E,N,Q]-x-[L,I,V,M]-x(5)-Y-x-[L,I,V,M] come sequenza consenso degli inibitori Kunitz. I precursori di questi inibitori sono caratterizzati da una porzione N-terminale che consta di un peptide segnale e del corto propeptide Asn-Pro-Ile-Xxx-Leu-Pro, identico a quello responsabile del veicolamento vacuolare della sporamina A di *Ipomea batatas*. Il taglio del peptide segnale dal precursore della sporamina A in cellule di tabacco trasformate avviene tra i residui di Ser²³ e Arg²⁴ ed il rimanente propeptide è rimosso dopo il trasporto della proteina nel vacuolo (Matsuoka *et al.*, 1990).

Gli inibitori Kunitz si trovano in semi, organi di riserva e tessuti vegetativi di molte specie di piante dove giocano un ruolo importante in qualità di proteine di riserva e nella difesa delle piante contro i patogeni (Ryan., 1990). Il prototipo di questa famiglia di proteine fu inizialmente isolato dai semi di soia da Kunitz (1945). Da allora molti altri inibitori Kunitz sono stati isolati e caratterizzati, di cui la gran parte da semi e tessuti di riserva. Non tutti gli inibitori Kunitz sono capaci di inibire le proteasi, alcuni inibiscono le invertasi, altri le amilasi ed altri ancora sono bifunzionali mostrando attività contro entrambe proteasi e amilasi. In alcuni casi, come per la proteina di riserva di *Psophocarpus tetragonolobus* che costituisce circa il 15% delle proteine totali dei semi, non è ancora stata identificata alcuna attività inibitoria. In patata gli inibitori Kunitz sono proteine abbondanti ed altamente polimorfiche che si trovano nei tuberi. Dopo la patatina, che può costituire fino al 40% delle proteine solubili dei tuberi (Strickland *et al.*, 1995), i PI a basso peso molecolare sono la maggiore fonte di proteine di riserva di questa pianta. Ishikawa *et al.*, (1994) sono stati in grado di suddividere la famiglia degli inibitori kunitz di patata sulla base dell'omologia di sequenza nucleotidica in tre principali gruppi di omologia, denominati A, B e C. Quelli del gruppo A includono geni codificanti per gli inibitori della catepsina D, mentre quelli del gruppo B e C includono geni codificanti per inibitori della

tripsina, chimotripsina e della subtilisina. Successivamente Heibges *et al.*, (2003a) hanno costruito un fenogramma basato sulle sequenze amminoacidiche dedotte degli inibitori (Fig. 3).

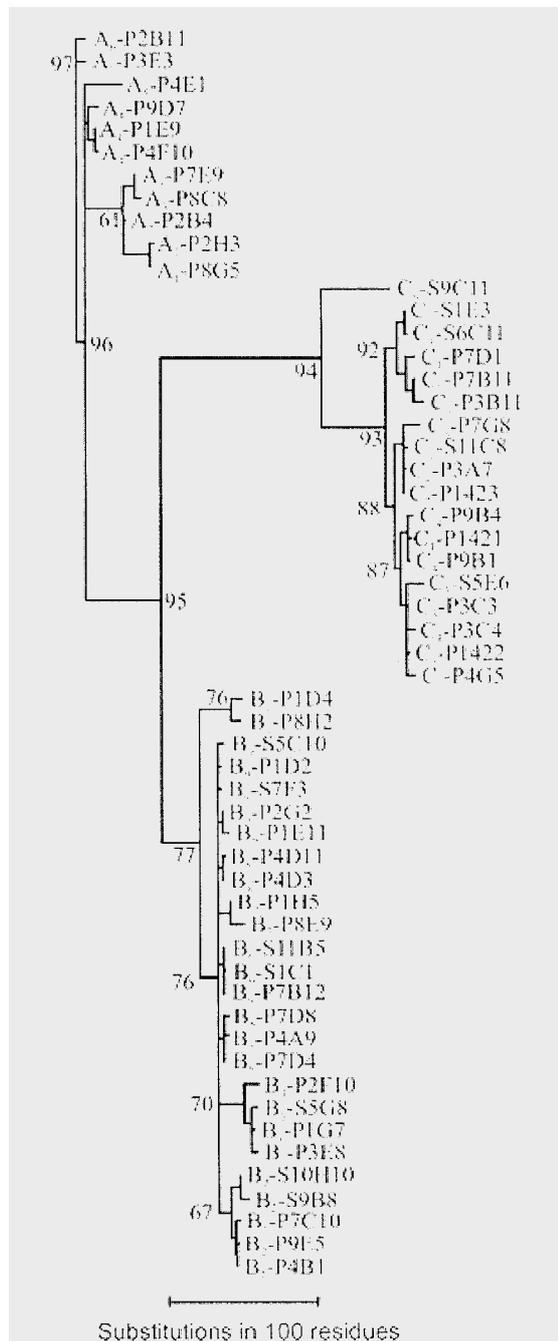


Figura 3: Fenogramma degli inibitori Kunitz di patata.

Nonostante all'interno dei gruppi di omologia A, B e C nei quali può essere suddivisa la famiglia Kunitz, esista una similarità di almeno il 90%, inibitori del gruppo A e B, più simili tra loro che con il gruppo C (A vs. C, 34% di identità; B vs. C, 38% di identità), mostrano in media un'identità del 75% (Heibges *et al.*,

2003a).

Un minimo di 21 geni (sei per il gruppo A, nove per il gruppo B e sei per il gruppo C) è presente nel genoma di patata. La maggior parte dei geni degli inibitori dei tre gruppi sono organizzati in un cluster che mappa in una singola regione sul cromosoma III di patata (Heibges *et al.*, 2003a). Questa famiglia genica è inoltre caratterizzata da un'estrema variabilità intraspecifica, in cui ogni cv. di patata esprime un profilo allelico degli inibitori del tutto unico. Il vantaggio selettivo dell'osservata variabilità strutturale può essere associato alla variabilità funzionale in risposta a stimoli ambientali e stress. Laskowski *et al.*, (1987) hanno suggerito che specifiche regioni (sito reattivo) dei geni codificanti per i Kunitz PI possano essere soggette ad un fenomeno di selezione darwiniana positiva che ha offerto un vantaggio selettivo durante il processo evolutivo.

3.3.5 Proteinase Inhibitor 1.

Le piante di patata e pomodoro contengono due piccole famiglie geniche che codificano per due inibitori di serina proteasi chiamati inibitore I (monomero di 8100 Da) ed inibitore II (monomero 12300 Da). I PI1 sono inibitori tetramericici (omo- ed etero-tetrameri) costituiti da un miscela eterogenea di iso-inibitori le cui proprietà riflettono quelle dei singoli protomeri. Tutti i protomeri purificati possono riassociarsi individualmente per formare omotetrameri. Il peso molecolare del complesso varia dai 39000 ai 41000 Da e ciascuna subunità ha una massa di 9000-10000 Da (Melville and Ryan, 1972). I membri della famiglia dei Proteinase Inhibitor 1 includono sia inibitori di pianta che di origine animale e sono caratterizzati dalla presenza della sequenza consenso WPE [V/L] [V/I] Gxxx [K/E] (Bairoch, 1992; Mur *et al.*, 2004). La presenza di iso-inibitori appartenenti a questa famiglia in piante di patata è stata identificata per la prima volta da Melville e Ryan, (1972). Nelle piante l'espressione della famiglia dei PI1 è regolata da fattori quali lo stadio di sviluppo della pianta o stimoli ambientali. I loro geni sono costitutivamente espressi nei

tuberi di patata, ma indotti durante il processo di maturazione dei frutti di pomodoro, nello sviluppo dei frutti immaturi di *L. peruvianum* (Wingate and Ryan, 1991), a seguito di ferite, applicazione di elicitori oligosaccaridici, etilene, acido salicilico (SA), ethephon, attacco di insetti, infezione di virus (Heitz *et al.*, 1993). Diversi iso-inibitori possono presentare diversa specificità nei confronti delle proteasi bersaglio. La natura dell'amminoacido P₁ presente nel sito reattivo determina la specificità dell'inibitore (Heitz *et al.*, 1993). I vari omologhi possono essere attivi non solo contro le serina endopeptidasi di vertebrati ed invertebrati quali la tripsina, la chimotripsina, l'elastasi e la cathepsina G, ma anche contro la subtilisina batterica, la endopeptidasi di *Streptomyces griseus* e la proteasi B di lievito. Liu *et al.*, (2001) hanno inoltre riportato la capacità di questi inibitori di bloccare l'induzione dell'attivatore trascrizionale AP-1 in cellule di mammifero invertendo l'effetto dei raggi UVB o UVC. L'attività inibitoria di questi composti sull'attivazione di AP-1 può così spiegare il loro effetto antitumorale. Altra caratteristica dei PI1 è la mancanza di ponti disolfuro per la stabilizzazione della struttura dell'inibitore. Questa è l'unica famiglia di serina PI ad esserne priva, se si escludono i membri della famiglia PI1 di patata e pomodoro che invece presentano un unico ponte disolfuro. In patata come descritto da Cleveland *et al.*, (1987) i geni codificanti per i PI1 contengono due introni di 479 e 417 bp rispettivamente. Tali geni codificano per una pre-pro-

proteina di 96 amminoacidi che ha una massa molecolare di 2000-3000 Da più grande rispetto al prodotto maturo che si accumula nel vacuolo centrale (Graham, 1985a). La pre-sequenza o sequenza di transito (quasi identica in pomodoro e in patata) media la compartimentalizzazione degli inibitori nei vacuoli. Essa è successivamente rimossa mediante l'idrolisi del legame Ala-Arg tra gli amminoacidi 23 e 24. La pro-sequenza, invece, consiste di 13 amminoacidi in patata e di 19 in pomodoro. Il taglio di questo peptide in corrispondenza dei legami Asn-X in pomodoro e Gln-X in patata ad opera di proteasi vacuolari altamente specifiche determina il rilascio della proteina matura. Anche se i vacuoli sono il principale sito di accumulo di questi inibitori, Narvaez-Vasquez *et al.*, (1993) hanno dimostrato che una piccola parte viene depositata nelle pareti cellulari degli apici radicali di piante di pomodoro. La presenza degli inibitori all'interfaccia della radice con il suolo indica che essi possono avere anche un ruolo extracellulare nella protezione del meristema radicale dai patogeni.

3.4 Strategie di controllo degli stress biotici

Le principali cause degli stress di natura biotica che colpiscono le piante riducendone fortemente le rese sono: miceti, batteri ed altri microrganismi procariotici (micoplasmi, fitoplasmi, protozoi), virus ed entità virus-simili, fanerogame parassite, insetti e nematodi. La corretta impostazione di misure di lotta contro tali stress richiede la conoscenza delle basi teoriche generali di diagnosi (epidemiologia e specializzazione parassitaria), nonché della natura e delle caratteristiche biologiche di entrambe i bionti che partecipano all'interazione pianta-patogeno. La protezione delle colture da tali stress deve essere inoltre armonizzata nel contesto agronomico generale, entro i limiti richiesti nel rispetto dell'ambiente e della salute dell'uomo e degli animali.

Le malattie fungine costituiscono una delle principali cause di perdita di produzione agricola. Il loro controllo viene comunemente effettuato utilizzando pratiche agricole, cultivar (cv) fungo-resistenti (ottenute sfruttando il miglioramento genetico classico) e prodotti chimici. Sebbene il miglioramento genetico abbia fornito una serie di successi nell'ottenimento di cultivar resistenti alle malattie fungine, il tempo richiesto per effettuare l'incrocio, il reincrocio e la successiva selezione della progenie con il carattere di resistenza desiderato, può essere troppo lungo se paragonato a quello necessario alla comparsa di nuove razze virulente del fungo. Inoltre l'agricoltore spesso preferisce utilizzare prodotti chimici di sintesi, i quali sono però caratterizzati da costi elevati, efficacia ridotta (causata dall'adattamento dei patogeni) e dannosità nei confronti dell'ambiente. La crescente preoccupazione per la salubrità dell'ambiente e la necessità di produrre a costi contenuti, ha quindi spinto il mercato verso lo sviluppo di varietà agricole che necessitano di dosi ridotte di fitofarmaci. In questi ultimi anni si sta osservando la graduale affermazione, nonostante le controversie associate al loro utilizzo, delle piante transgeniche resistenti agli insetti ed ai pesticidi, il clonaggio dei geni di resistenza a patogeni e l'esplorazione di nuove tecniche per il miglioramento genetico. Tutto ciò sta costituendo le basi per un graduale cambiamento dei prodotti chimici in prodotti biotecnologici per il controllo degli stress biotici ed abiotici (Lorito *et al.*, 2002).

3.4.1 Controllo degli stress biotici causati dagli insetti e dai nematodi

Le ICP (Insecticidal Cystal Protein) prodotte dal batterio Gram positivo del suolo *Bacillus thuringiensis* sono state ampiamente studiate, negli ultimi trent'anni, per il controllo di insetti e nematodi. Questa famiglia di proteine è codificata dai geni *cry*, suddivisi in trentadue gruppi principali. Alcune proteine sono tossiche selettivamente per i Lepidotteri, altre per i Coleotteri o per i Ditteri e altre ancora sono nematocide. Tra i vari tentativi realizzati per utilizzare al meglio le proprietà tossiche di queste proteine, la soluzione delle piante transgeniche produttrici di "Bt toxin" sembra quella che meglio risponde alle esigenze del mercato. Altre strategie per ottenere piante resistenti ad insetti sono basate sull'espressione di geni codificanti inibitori di enzimi digestivi degli insetti, ad esempio proteasi ed α -amilasi (Tabella 4), oppure di peptidi in grado di alterare l'equilibrio ormonale degli insetti come ad esempio la famiglia di peptidi che bloccano l'ecdisione (l'ormone che regola la crescita negli insetti) (Ffrench *et al.*, 2000).

Tabella 4: Geni espressi in pianta per aumentare la resistenza a insetti patogeni.

<u>Geni e prodotti</u>	<u>Origine</u>	<u>Azione/ meccanismo</u>	<u>Piante transgeniche</u>
proteine Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Popilliae</i>	formazione di pori in cellule dell'epitelio intestinale	tabacco, pomodoro, soia, grano, cotone
α -amilasi	grano, orzo, fagiolo	inibizione degli enzimi digestivi	tabacco e altre piante
Chitinasi	<i>Manduca sexta</i>	lisi delle strutture interne di chitina	Tabacco
inibitori di tripsina di orzo	orzo	inibizione degli enzimi digestivi	Tabacco

Negli ultimi anni un gran numero di piante transgeniche trasformate con geni codificanti per PI hanno mostrato resistenza agli insetti (Tabella 5). Il vantaggio offerto dai PI è costituito dalle piccole dimensioni dei geni, e dalla elevata stabilità dei loro prodotti proteici.

Tabella 5: Piante transgeniche trasformate con geni di PI resistenti agli insetti.

Gene	Pianta trasformata	Predatori inibiti
Cowpea trypsin inhibitor (<i>CpTI</i>)	Tabacco	<i>Manduca sexta</i>
	Tabacco	<i>Spodoptera litura</i>
	Riso	<i>Sesamia inferens</i> , <i>Chilo suppressalis</i>
	Patata	<i>Lacnobiaoleracea</i>
	Melo	Coleotteri, Lepidotteri
	Lattuga, pomodoro	Coleotteri, Lepidotteri
	Rapa	Coleotteri, Lepidotteri
	Fragola	Coleotteri, Lepidotteri
	Girasole	Coleotteri, Lepidotteri
PI1	Petunia, tabacco	Lepidotteri, Ortoteri
<i>PI1</i> e <i>Pin2</i> di patata	Tabacco	<i>Manduca sexta</i>
<i>PI1</i> di patata	Riso	<i>Sesamia inferens</i>
<i>PI1</i> di patata	Betulla, lattuga	Lepidotteri, Ortoteri
Potato CI	Tabacco	<i>Chrysodeixis eriosoma</i>
<i>TI</i> di <i>I. batatas</i>	Tabacco	<i>Spodoptera litura</i>
<i>TI</i> di <i>I. batatas</i>	Cavolo	<i>Pieris conidia</i>
Cistatina di riso	Pioppo	<i>Chrysomela tremulae</i>
Kunitz I. di soia	Riso	<i>Nilaparvata lugens</i>
Kunitz I. di soia	Patata, tabacco	Lepidotteri
<i>TI</i> di orzo	Frumento	<i>Sitotroga cerealella</i>
Cistatina di mais	Riso	<i>Sitophilus zeamatis</i>
<i>TI</i>	Arabidopsis, tabacco	Lepidotteri
<i>PI</i> di tabacco	Tabacco, pisello	<i>Helicoverpa armigera</i>

Per quanto riguarda i nematodi esistono diverse strategie per incrementare la resistenza delle piante nei loro confronti. Quella sino ad ora più utilizzata prevede l'impiego di geni di resistenza (R) dominanti o semidominanti. Tra i geni R più studiati vi è il gene *Mi* che conferisce resistenza a diverse specie di nematodi root-knot mediante la formazione di una necrosi localizzata intorno al sito d'ingresso del nematode (Dropkin, 1969). Altri esempi sono costituiti dai geni *Gro1* e *Cre*. Il gene *Gro1* isolato da *Solanum spegazzini* determina resistenza nei confronti dei patotipi *Ro1* e *Ro5* di *Globodera rostochiensis*, mentre il gene *Cre* isolato da *Triticum aestivum* conferisce resistenza nei confronti di *Heterodera avenae* (Williamson, 1996). Poiché non è certo che geni R funzionino in sistemi eterologhi e dato che la resistenza basata sulla relazione gene-per-gene può essere facilmente superata da patotipi virulenti sono al vaglio strategie alternative quali:

- Il blocco della formazione del "feeding site" mediante l'introduzione di geni codificanti per composti fitotossici che danneggiano le "feeding cells". A tal scopo è necessario l'impiego di promotori "feeding site"

specifici.

- L'espressione in pianta di prodotti tossici (ma non fitotossici) o che riducano la digestibilità dei nutrienti da parte del nematode come ad esempio i PI (Cai *et al*, 2003).

3.4.2 Controllo degli stress causati da virus

Oltre alle più classiche strategie di controllo delle particelle virali, quali la selezione di genotipi resistenti mediante l'impiego della genetica classica è possibile ottenere piante transgeniche resistenti ai virus utilizzando: l'espressione di proteine virali mutate, gli RNA difettivi-interferenti e gli RNA antisenso (Tabella 6). L'espressione delle coat protein (CP) modificate interferisce nell'assemblaggio delle particelle virali, mentre l'impiego di RNA antisenso, che consiste nella produzione di RNA complementari a quelli codificanti per il genoma virale, determina fenomeni di silenziamento genico. Infine la tecnologia degli RNA difettivi-interferenti consiste nell'utilizzo di RNA virali mutati ed inattivi che competono con i genomi virali "integri" per i processi di trascrizione e replicazione.

Tabella 6: Geni espressi in pianta per aumentare resistenza a virus.

<u>gene e prodotti</u>	<u>Origine</u>	<u>attività/effetti</u>	<u>piante transgeniche</u>
cDNA di coat protein	molti virus	Inibisce l'assemblaggio o altri meccanismi/fasi del ciclo. Resistenza a molti virus.	tabacco, patata ecc
mutante difettivo della MP	TMV/PLRV	Inibisce il movimento del virus. Resistenza a varietà di virus.	tabacco, patata ecc
gene Pro, senso, antisenso	PVY	Silenziamento genico post-trascrizionale, resistenza a PVY.	tabacco e riso
geni di resistenza (N,Rx)	Tabacco	Resistenza a TMV e PVX.	tabacco e pomodoro
RNAse	mammiferi	Sistema di degradazione dell'RNA. Resistenza a TMV, CMV e ad altri virus.	tabacco

3.4.3 Controllo degli stress causati da funghi e batteri

Anche se i principali mezzi di lotta a questi patogeni sono tuttora basati sull'applicazione di fitofarmaci si sta cercando di utilizzare mezzi di lotta biologica o piante transgeniche al fine di ridurre l'impatto ambientale legato all'utilizzo di questi prodotti chimici. Le principali linee di ricerca riguardano:

- l'incremento dell'arsenale antimicrobico della pianta mediante sintesi inducibile o costitutiva di diversi composti che inibiscono direttamente il patogeno (Tabella 7);

- l'interferenza con i segnali di riconoscimento tra pianta e patogeno, mediante il riconoscimento specifico di questo ultimo e l'induzione dei meccanismi di difesa localizzata e/o sistemica (Tabella 8);
- l'inattivazione di tossine prodotte dal patogeno o l'aumento della tolleranza della pianta verso di esse (Lorito and Scala, 1999)
- lotta biologica.

Tabella 7: Geni microbici espressi in pianta che aumentano le risposte di difesa a patogeni.

<u>gene codificante</u>	<u>Origine</u>	<u>attività/effetti</u>	<u>Piante</u>
enzimi antimicrobici			
Chitinasi(<i>chiA</i>)	<i>Serratia marcescens</i>	Chitinasi antifungina. Resistenza a <i>Alternaria longipes</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> .	Tabacco
Chitinasi(<i>chi1</i>)	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Chitinasi coinvolta nell'autolisi. Resistenza a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Botrytis cinerea</i> .	tabacco
Endochitinasi (chit42)	<i>Trichoderma harzianum</i>	Chitinasi antifungina. Resistenza a <i>A. alternata</i> , <i>A. solani</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> .	tabacco, patata, mela, petunia, uva
Chitinasi + glucanasi	riso, tabacco	Interazione sinergica. Resistenza a <i>Cercospora nicotianae</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .	tabacco, pomodoro
Lisozima	umana, virus, e altre sorgenti	Attività litica sulle cellule del patogeno. Resistenza a vari batteri patogeni	tabacco, patata
Ribonucleasi batterica (barnase) con promotore inducibile(<i>prp1-1</i>) e <i>barstar</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Ribonucleasi localizzata nel sito di infezione. Riduzione della sporulazione di <i>P. infestans</i> .	patata
Glucosio-ossidasi	<i>Aspergillus niger</i>	Genera ROS e HR. Resistenza a <i>E. carotovora</i> , <i>P. infestans</i> . Resistenza a largo spettro.	patata, pomodoro
Trichodiene sintasi(<i>Tri5</i>)	<i>Fusarium sporotrichoides</i>	Produzione di fitoalessina. Resistenza a microbi e	tabacco

Tossina del cholera, subunità A	<i>Vibrio cholerae</i>	insetti. Antibatterico. Resistenza a <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tabaci</i> .	tabacco
Osmotina e osmotina-like	Tabacco	resistenza a <i>P.infestans</i> , <i>Pythium ultimum</i> .	patata
Proteine che inattivano i ribosomi (RIP)	orzo, mais	resistenza a <i>R. solani</i>	tabacco

Tabella 8: Geni microbici espressi in pianta, che attivano le risposte di difesa della pianta o proteggono dalle tossine del patogeno.

<u>gene codificante</u>	<u>origine</u>	<u>Attività/effetto</u>	<u>pianta</u>
Avirulenza (avr9,info1)	<i>Cladosporium fulvum</i> , <i>P. infestans</i>	Elicita HR. Resistenza a PVX	tabacco, pomodoro
Virulenza (Ecp2)	<i>Cladosporium fulvum</i>	Elicita HR, resistenza a <i>C. fulvum</i>	pomodoro
b-cryptogein	<i>cryptogea</i>	Elicita le risposte di difesa a largo spettro.	patata, tabacco
batterio-opsina (pompa protonica)	<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
Pecto liasi (PL3)	<i>Erwinia carotovora</i>	Attiva le risposte di difesa producendo elicitori da tessuti di pianta. Resistenza a <i>E. carotovora</i> .	patata
oligogalatturonide liasi	<i>E. carotovora</i>	Degrada oligomeri di zucchero in prodotti inattivi. Interferisce con i segnali e sopprime la patogenicità in patata nell'interazione con <i>E.carotovora</i> .	patata

Tra i geni utilizzati per migliorare le difese della pianta, quelli codificanti per le chitinasi sono stati ampiamente studiati per il vantaggio di codificare per proteine che agiscono su un polimero (la chitina) presente nei funghi ed in altri patogeni quali insetti e nematodi, ma assente nelle piante. Sebbene vari funghi fitopatogeni abbiano dimostrato una ridotta sensibilità nei confronti di alcune chitinasi di pianta, diverse “crop” sono state trasformate utilizzando sia chitinasi vegetali da sole che in combinazione con glucanasi (Zhu *et al.*, 1994; Jach *et al.*, 1995). Oltre a quelle di origine vegetale sono state utilizzate anche chitinasi di origine batterica, come il gene *chiA* di *Serratia marcescens*, o di origine fungina come *chi1* di *Rhizopus oligosporum* e *CHIT42* del fungo di biocontrollo *T.harzianum* (Lorito *et al.*, 1998). Per quanto riguarda, invece, l’ottenimento di piante capaci di riconoscere più efficacemente il patogeno, molti ed incoraggianti risultati sono stati ottenuti. Il primo esempio riportato è stato quello

del gene *avr9* di *C. fulvum* che codifica per un fattore di avirulenza necessario ad ottenere riconoscimento tra la pianta contenente il corrispettivo gene di resistenza (*Cf9*) ed il patogeno (De Wit *et al.*, 2002). Lo stesso meccanismo si verifica anche quando sono introdotti i geni *Ecp2* di *C. fulvum* in pomodoro o il gene della b-criptogeina di *P. cryptogea* in tabacco e patata. Un'altra strategia molto interessante riguarda l'impiego di organismi di biocontrollo. La lotta biologica in patologia vegetale consiste nella riduzione della densità di inoculo o delle capacità patogeniche di un patogeno tramite uno o più organismi. Ciò può accadere o naturalmente o mediante la manipolazione dei fattori ambientali, della pianta ospite, di un antagonista o anche mediante l'introduzione massiva di uno o più antagonisti. In natura esistono molti habitat dove patogeni fungini non sono in grado di svilupparsi sia a causa di fattori di natura biotica quali la presenza di microrganismi ad azione antagonista nei confronti del patogeno che di natura abiotica quali le caratteristiche chimico-fisiche del terreno (Baker, 1987). Tra i più comuni funghi antagonisti troviamo: *Trichoderma* [(agente di biocontrollo di funghi terricoli quali *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Sclerotinia* spp. (Chet and Inbar, 1994)] e *Gliocladium* spp. Esistono anche lieviti quali *Pichia guilliermondii* che sono in grado di parassitizzare funghi fitopatogeni come *Botrytis* e *Penicillium* (Chand-Goyal and Spotts, 1997). I meccanismi mediante i quali i funghi antagonisti svolgono la loro azione di biocontrollo sui patogeni sono:

- Parassitismo: prevede una fase iniziale di riconoscimento, una crescita chemiotattica, un'interazione fisica tra i due funghi, penetrazione dell'ospite, colonizzazione dello stesso ed evasione.
- Competizione per lo spazio e sostanze nutritive: il patogeno è escluso dall'abituale nicchia ecologica ed è esposto a stress ambientali e nutrizionali.
- Antibiosi: produzione di sostanze antibiotiche ad azione tossica sul patogeno.

Molto spesso i tre meccanismi possono essere determinati da uno stesso fungo antagonista. Oltre all'interazione con i patogeni, alcuni funghi antagonisti possono anche interagire con la pianta aumentando la biodisponibilità di elementi inorganici e/o inducendo la resistenza sistemica indotta (ISR).

4. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è stato quello di clonare, caratterizzare ed esprimere in un sistema eterologo geni codificanti per inibitori di serina proteasi, dotati di attività inibitoria diretta nei confronti di funghi fitopatogeni e capaci di bloccare o ridurre lo sviluppo della malattia a seguito dell'infezione. Ci si è prefissi pure di studiare individualmente l'espressione di diversi membri o gruppi genici delle famiglie Kunitz e PI1, a cui appartengono gli inibitori da noi isolati. Il raggiungimento di questi obiettivi è stato realizzato seguendo le seguenti strategie:

- Ottenimento di sequenze aminoacidiche parziali di PI precedentemente selezionati in base alla loro attività antifungina.
- Identificazione e clonaggio dei geni codificanti per i PI di interesse.
- Determinazione del numero di copie del gene o del numero di geni costituenti la famiglia genica nel genoma di piante di *S. tuberosum* cv. Desireè.
- Messa a punto di un sistema per analizzare l'espressione specifica delle tre diverse sottofamiglie (A, B, C) di inibitori Kunitz e di diversi membri (*PPI3A2*, *PPI3B2*, *PPI2C4*) della famiglia genica dei Proteinase inhibitor I (PI1).
- Studio dell'espressione di tali geni o gruppi di geni a seguito di diversi stimoli sia di natura biotica che abiotica ed in differenti genotipi e tessuti della pianta, mediante analisi Northern e RT-PCR semiquantitativa.
- Espressione di tali geni in *E. coli* al fine di ottenere sufficienti quantitativi di tali proteine e determinarne l'efficacia su diversi funghi fitopatogeni.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Microrganismi utilizzati

I microrganismi utilizzati sono stati: *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *G. rostochiensis* ed *Escherichia coli*. Il ceppo B05.10 di *Botrytis cinerea* isolato da vite ed il ceppo F di *Alternaria alternata* isolato da patata sono stati utilizzati come funghi patogeni bersaglio. Il nematode *G. rostochiensis* patotipo *Ro1* è stato utilizzato per infettare diversi genotipi di piante di patata al fine di studiare l'espressione dei PI. I ceppi batterici DH5 α e BL21(DE3)PLY_SS di *Escherichia coli* sono stati utilizzati per il clonaggio e l'espressione dei geni di interesse, rispettivamente.

5.2 Condizioni di crescita

I conidi di *B. cinerea* sono stati raccolti da colture cresciute su malt extract peptone agar (MEP) [costituito da Malt Extract Broth (Sigma 20 g/l) ammendato con peptone micologico (Oxoid 10 g/l) e agarizzato (1.5%)] e quelli di *A. alternata* da colture cresciute su potato dextrose agar (PDA) (Sigma 39 g/l) ad una temperatura di 25° C. I conidi sono stati successivamente risospesi in acqua sterile e filtrati al fine di rimuovere i frammenti ifali.

Le cisti del patotipo *Ro1* di *G. rostochiensis* sono state raccolte da radici di piante di patata cv. Desireè. Tali piante erano state infettate 7 settimane prima utilizzando 20 cisti dello stesso patogeno aggiunte ad una miscela di terreno 50% e sabbia 50% contenente le piantine. Durante questo periodo di tempo le piante sono state tenute in camera di crescita (BBC-York, Germany) nelle seguenti condizioni: 16 ore di luce a 22° C e 8 ore di buio a 18° C.

I ceppi di *Escherichia coli* utilizzati sono stati cresciuti a 37° C sul mezzo LB (Luria-Bertani) (0,5% estratto di lievito, 1% Bacto peptone, 1% NaCl, pH 7) con l'aggiunta di ampicillina, quando necessario.

5.3 Materiale vegetale utilizzato

Le piante di patata utilizzate sono state: *S. tuberosum* cv. Desireè, LB7/4/c-I-7 [linea transgenica derivante dalla trasformazione della cv. Desireè con il gene di resistenza *Gro1-4* sotto il controllo del suo stesso promotore (Paal *et al.*, 2004)] e P40, P38, P3 (derivanti dall'incrocio interspecifico tra *Solanum spegazzini* e *S. tuberosum*). P40, P38, P3 sono genotipi di patata diploidi, a differenza delle piante tetraploidi Desireè e LB7/4/c-I-7. Il genotipo P40 è eterozigote per il locus di resistenza *Gro1* ed è resistente a tutti e cinque i patotipi (*Ro1-Ro5*) di *G. Rostochiensis* (Paal *et al.*, 2004). La cv tetraploide Desireè è invece suscettibile a tutti i patotipi del nematode a differenza della linea transgenica LB7/4/c-I-7 che mostra resistenza solo nei confronti del patotipo *Ro1*. Tutti i genotipi sono stati propagati inizialmente attraverso i tuberi e poi per talea apicale. Le piante così ottenute sono state allevate in condizioni controllate (in una camera di

crescita) per otto settimane.

5.3.2 Trattamenti effettuati per indurre le risposte di difesa della pianta

La reazione biochimica post-infezionale di difesa è stata indotta in piante intatte di diversi genotipi di patata mediante il ferimento meccanico, l'infezione del fungo *B. cinerea* e l'infezione del nematode *G. rostochiensis*. Nel primo caso sono state danneggiate con uno stuzzicadenti due foglie per ciascuna delle tre repliche dei genotipi P40, P38, P3 e cv. Desiree. Le foglie ferite e quelle integre localizzate al di sopra e al di sotto di quelle ferite sono state raccolte e rapidamente congelate in azoto liquido 24 e 48 ore dopo ferimento. Le piante ferite ed i controlli sono state posizionate in una camera di crescita (BBC-York, Germany) con 16 ore di luce a 22° C e 8 ore di buio a 18° C. Ogni esperimento è stato ripetuto almeno tre volte. Foglie intatte di piante di patata non trattate sono stati utilizzate come controlli in ciascun esperimento.

Piante di patata cv. Desiree di 2 mesi sono state inoculate con il patogeno *B. cinerea* B05.10 su quattro foglie superiori e due inferiori. Ogni foglia è stata inoculata in quattro punti con una goccia contenente 7×10^5 spore/ml di *Botrytis* in una soluzione contenente Glucosio 20mM e fosfato di potassio 20mM. Le piante inoculate con il patogeno ed i controlli sono state posizionate in una camera di crescita a 22° C, con umidità relativa del 40% e con un ciclo luce:buio di 24 ore. Ogni esperimento è stato ripetuto almeno due volte. Le foglie inoculate con il patogeno sono state prelevate 5 e 20 ore dopo l'inoculo e congelate in azoto liquido.

Per quanto riguarda l'infezione con *G. rostochiensis*, venti cisti del patotipo *Ro1* del nematode sono state aggiunte ad una miscela costituita dal 50% di terreno e 50% di sabbia in cui erano state trasferite le piante dei genotipi LB7/4/c-l-7, Desiree e P40. Le piante sono state allevate con 16 ore di luce a 22° C e 8 ore di buio a 18° C in camera di crescita. L'intero apparato radicale (ripulito dal terreno) e le foglie delle piante infette è stato prelevato dopo 10, 17 e 24 giorni per ciascuna delle tre repliche. Le radici e le foglie prelevate dalle piante infette e quelle dei controlli sono state congelate in azoto liquido fino alla successiva estrazione dell'RNA. Foglie e radici intatte di piante di patata non trattate sono state utilizzate come controlli in ciascun esperimento.

5.4 Saggi di attività inibitoria delle proteasi

Per poter determinare le attività inibitorie delle proteasi sono stati utilizzati i saggi descritti da Brock *et al.*, (1962) e da Peng e Black (1976), con alcune modifiche.

I campioni saggiati sono stati incubati in presenza o in assenza di differenti concentrazioni di α -chimotripsina (Sigma) (25 μ g/ml) o di tripsina (Sigma) (6,25 μ g/ml) e l'attività inibitoria è stata determinata misurando l'abilità di inibire l'attività dell'enzima sul substrato sintetico pNA (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide). Il substrato è stato preparato ad una concentrazione 3 mM in dimetil formammide (Sigma) e successivamente utilizzato ad una concentrazione 0,15 mM diluendolo in un tampone sodio-fosfato 0,1M pH 6,9. La tripsina e la chimotripsina sono state incubate per 5 min. a temperatura ambiente, con o senza il campione da saggiare, in un volume di reazione finale di 175 μ l. Il livello di attività inibitoria è stata riportata come percentuale di

riduzione dell'attività proteasica tra il campione da analizzare (frazioni purificate più pNA e proteasi usata nel controllo) e il rispettivo controllo (pNA più tripsina o chimotripsina). Per ciascun campione di PI l'attività inibitoria è quindi stata determinata misurando la differenza di assorbanza a 450 nm in assenza ed in presenza del campione da saggiare. L'assorbanza è stata letta utilizzando un lettore di piastre ELISA (Microplate Reader, Bio-Rad).

5.5 Saggi in vitro dell'attività antifungina

L'attività antifungina delle frazioni proteiche purificate è stata valutata mediante saggi d'inibizione della crescita fungina *in vitro*. Saggi biologici di inibizione della germinazione sono stati condotti su spore di *B. cinerea* B05.10 e *A. alternata* F come descritto da Lorito *et al.* (1993), con alcune modifiche. Le miscele utilizzate nei saggi (90 µl), contenevano 500 conidi del fungo bersaglio sospesi in PDB 1% e tampone sodio fosfato 30 mM pH 6,8. Ai conidi sono stati aggiunti 5 o 10 µl delle frazioni purificate dagli estratti. Le miscele sono state incubate in piastre ELISA poste a 25° C in camera di crescita. Queste sono state osservate in tempi diversi, mediante un microscopio invertito, per poter determinare l'effetto della frazione proteica in analisi sulla germinazione delle spore e sull'allungamento del tubetto germinativo. Tutti i saggi biologici effettuati includevano dei controlli costituiti da acqua sterile o dalle soluzioni tampone (alla concentrazione finale d'impiego) utilizzate durante il processo di purificazione della proteina ricombinante in modo da escludere un loro effetto nel saggio. La lunghezza di almeno 20 ife e la germinazione di almeno 50 conidi per ciascuna delle repliche è stata misurata. Ogni esperimento è stato ripetuto in due giorni separati, almeno con tre repliche per ciascun trattamento.

5.6 Estrazione degli acidi nucleici

5.6.1 Estrazione e digestione del DNA plasmidico estratto da *E. coli*

L'estrazione del DNA plasmidico di *E. coli* è stata effettuata a partire da 1,5 ml di una coltura batterica, fatta crescere in LB per circa 16 ore, secondo il protocollo di lisi alcalina descritta da Sambrook *et al.*, (1989), a cui sono state apportate alcune modifiche. Il pellet batterico è stato risospeso in 100 µl di soluzione I (50 mM glucosio, 25 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA pH8), agitando vigorosamente. Alla miscela sono poi stati aggiunti 200 µl della soluzione II (0.2 N NaOH, 1% SDS) si è poi invertito rapidamente il tubo per cinque volte ed è stato conservato su ghiaccio. Alla miscela sono stati aggiunti 150 µl della soluzione III (60 ml di acetato di potassio 5 M, 11.5ml di acido acetico glaciale, 28.5 ml di acqua), si è agitato gentilmente in posizione invertita, al fine di disperdere la soluzione III attraverso il lisato batterico, ed il tutto è stato mantenuto su ghiaccio per 5-6 minuti. Il lisato batterico ottenuto è stato centrifugato due volte a 12000 x g per 5 minuti a 4° C ed in entrambe i casi si è prelevato il surnatante contenente gli acidi nucleici. Il DNA a doppio filamento è stato poi fatto precipitare aggiungendo alla fase acquosa 2 volumi di etanolo assoluto e centrifugando a 12000 x g per 5 minuti a 4° C, dopo aver conservato la miscela per 2 minuti a 4° C. Il surnatante è stato quindi allontanato ed il pellet contenente il DNA lavato con 1 ml di etanolo 70% (volume:volume). Il pellet è stato asciugato all'aria per circa 10 minuti e poi

risospeso in 50 µl di TE (pH 8) a cui sono stati aggiunti 2 µl di RNasi A (Sigma) (20 µg/ml). Il DNA è stato quantizzato mediante determinazione dell'assorbanza spettrofotometrica a 260 nm oppure per comparazione visiva della fluorescenza emessa a seguito di un trattamento con bromuro d'etidio ed in presenza di quantità note di DNA standard. Un'aliquota del DNA è stato conservato a 4° C fino al successivo utilizzo ed un'altra (3-4 µl) sottoposta ad analisi di restrizione per verificare la presenza del DNA esogeno nel vettore plasmidico. La reazione di digestione è stata effettuata utilizzando l'enzima di restrizione *EcoRI* che è in grado di tagliare sul plasmide pGEM-T Easy da entrambe i lati del sito di clonaggio. Dopo tale verifica, 1 µg di DNA plasmidico purificato con il Kit QIAGEN (vedi Eluizione degli amplificati ottenuti mediante PCR), è stato inviato, per il sequenziamento, all'azienda MWG-Biotech AG (Ebersberg, Germany). Le sequenze nucleotidiche degli inserti così ottenute sono state analizzate tramite i software BlastN e BlastX che confrontano, rispettivamente, le sequenze nucleotidiche e quelle amminoacidiche dedotte, con quelle contenute nella banca dati GeneBank del National Center for Biotechnological Information (consultabile al sito internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Il programma CLUSTALW e TREEVIEW consultabili al sito <http://www.ebi.ac.uk/clustalw> sono stati invece utilizzati per l'allineamento di molteplici sequenze amminoacidiche o nucleotidiche e per il disegno di fenogrammi, rispettivamente.

5.6.2 Estrazione di DNA ed RNA da piante di patata

L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando il seguente procedimento: 50 mg di foglie di patata sono state inserite in un tubo Eppendorf, sottoposte a rapido congelamento (immersione in azoto liquido) e macinate con un bastoncino cotonato. La polvere è stata sospesa in 250 µl di tampone di estrazione [0.5 ml di tampone 1 2X pH 7.5 (0.6 M NaCl, 100 mM Tris, 40 mM EDTA, 4% sarcosil e 1% SDS), 0.4 ml di Urea 12M, 0.05 ml fenolo e 0.05 ml H₂O]. La sospensione è stata trattata due volte utilizzando 400 µl di una soluzione di fenolo/cloroformio-alcol isoamilico (24:1; volume:volume), e miscelando il tutto gentilmente. La fase acquosa è stata trasferita in un tubo Eppendorf pulito, e sono stati aggiunti 0,8 volumi di isopropanolo. La miscela è stata mantenuta a temperatura ambiente per 10 minuti. Dopo aver centrifugato per 10 minuti, il pellet è stato lavato con etanolo al 70% (volume:volume), ed infine asciugato in una centrifuga Speed-Vac. Il pellet asciutto è stato quindi risospeso in 80 µl di tampone 10mM Tris, 1mM EDTA pH 8 contenente RNasi A (Sigma) (10 µg/ml). Il DNA è stato quantizzato come descritto sopra e conservato a 4° C fino al successivo utilizzo.

Per l'estrazione dell'RNA sono stati utilizzati due diversi protocolli. Il primo è stato utilizzato su germogli e foglie di piante attaccate da insetti o 5, 20 ore dopo l'inoculazione con *B. cinerea* o 20 h dopo il fermento. In questo caso il congelamento e la macerazione sono stati eseguiti come descritto sopra per l'estrazione del DNA. L'RNA è poi stato estratto secondo il protocollo di Chomczynski e Sacchi (1987).

La seconda metodica è stata utilizzata per l'estrazione dell'RNA da radici e foglie di piante infette con *G. rostochiensis* 10, 17, 24 giorni dopo l'infezione, da foglie di piante 24, 48 ore dopo il fermento, e da tuberi, stoloni, radici, germogli, fusti, foglie, fiori di piante non trattate. In questo caso è stato utilizzato il

protocollo dell'RNAwiz (Ambion, Austin, TX, U.S.A.) con alcune modifiche. Per ogni estrazione sono stati utilizzati 100 mg di tessuto precedentemente congelato in azoto liquido e polverizzato in mortaio con l'impiego di un pestello. Il campione polverizzato è stato inserito in un tubo Eppendorf ed è stato risospeso in 1 ml di RNAwiz™ (Ambion). L'omogenato è poi stato incubato a temperatura ambiente per 5 min. per dissociare le nucleoproteine dagli acidi nucleici. Dopo aver aggiunto 200 µl di cloroformio il campione è stato miscelato vigorosamente per 20 secondi, incubato a temperatura ambiente per 10 minuti e centrifugato a 14000 x g per 15 minuti a 4° C. Senza disturbare l'interfase è stato trasferita la fase acquosa in un nuovo tubo a cui sono stati aggiunti 500 µl di acqua sterile ed è stato miscelato il tutto. Alla soluzione è stato poi aggiunto 1 ml di isopropanolo, prima di miscelare nuovamente e di incubare a temperatura ambiente per 20 minuti. La miscela è stata centrifugata per 25 minuti a 14000 x g a 4°C, è stato allontanato il surnatante e lavato il pellet con 1 ml di etanolo al 75%. La soluzione è stata centrifugata a 14000 x g a 4°C per 5 minuti ed è stato allontanato il surnatante. Il pellet è stato fatto asciugare all'aria per circa 15 minuti e l'RNA successivamente disciolto in un appropriato quantitativo di acqua. L'integrità dell'RNA è stata determinata mediante elettroforesi su gel d'agarosio. Dall'RNA sono poi state allontanate eventuali contaminazioni di DNA utilizzando il DNA Free kit (Ambion) seguendo le raccomandazioni del fornitore. Le concentrazioni di RNA sono state infine determinate utilizzando uno spettrofotometro (Spectrophotometer, Bio-Rad). L' mRNA è stato isolato dall'RNA totale usando il kit GenElute™-mRNA Miniprep mRNA kit (Sigma) seguendo i consigli del fornitore.

5.7 Sequenze amminoacidiche d'interesse e disegno dei primer

I seguenti primer, sintetizzati dalla MWG-Biotech AG, sono stati disegnati a partire da sequenze parziali (DNPLDISFK, EFECKGKQLQWPELIGVP, LFDNILGVVVDMPVV) ottenute dal sequenziamento amminoacidico di una miscela di inibitori di proteasi dotati di attività fungicida (Hermosa *et al*, 2005). I primer LPS (5'-CTACCTAGTGATGCTACTCCAGTA-3') e SP (5'-ATGAAGTGTTTATTTTGT-3') sono stati disegnati su porzioni altamente conservate al 5' di geni codificanti per inibitori Kunitz di patata. Il primer RP2 (5'-TTACTGGACTTGCTTGAAGG-3') è stato disegnato sulla predetta sequenza nucleotidica codificante per DNPLDISFK. I primer NSPNDE (5'-CATATGGATGCTACTCCAGTAC-3') e RPBAM2 (5'-GGATCCTTACTGGACTTGCTTG-3') differiscono dai primer LPS e RP2, rispettivamente, per l'aggiunta di una coda (sottolineata) contenente i siti di restrizione *Nde* I e *Bam*H I all'estremità 5' e 3', rispettivamente, della sequenza del gene *PKI1* (DQ087220).

I primer INTF (5'-AGGTAAGTCCCCAAATTC-3') e INTR (5'-CCTAGAGATGCATCGTAAT-3') sono stati disegnati all'estremità 5' e 3', rispettivamente, di un putativo introne identificato all'interno della sequenza del gene *PKI1*.

I primers SPI (5'-AGTAAGAGTACATGGAGATA-3') ed i primer "nested" SPII (5'-CATGTGGCTACTTAATTGC-3') e SPIII (5'-GCTTCAACAATCCATTAATTAACC-3') sono stati disegnati sulla predetta sequenza nucleotidica codificante per LFDNILGVVVDMPVV e sono stati utilizzati per amplificare mediante RACE 5' la porzione al 5' del gene *PPI3B2*. I

primer degenerati CIFI (5' -ATGGAGTYAAAGTTTGCTCAC-3') e CIFII (5' -ACAATAAAASAAWATGGAGT-3') sono stati disegnati in corrispondenza dell'ATG di geni codificanti per PI1 sfruttando regioni omologhe e conservate tra il frammento genico ottenuto dalla RACE 5' e le sequenze di PI1 di patata e pomodoro depositati in GenBank. Per quanto riguarda i primer utilizzati negli esperimenti di RT-PCR semiquantitativa questi sono stati disegnati sfruttando regioni specifiche per ciascun gene o gruppo di geni. Tali sequenze sono state identificate allineando tra loro i membri di ciascuna famiglia genica di interesse (fig. 4A e 4B).

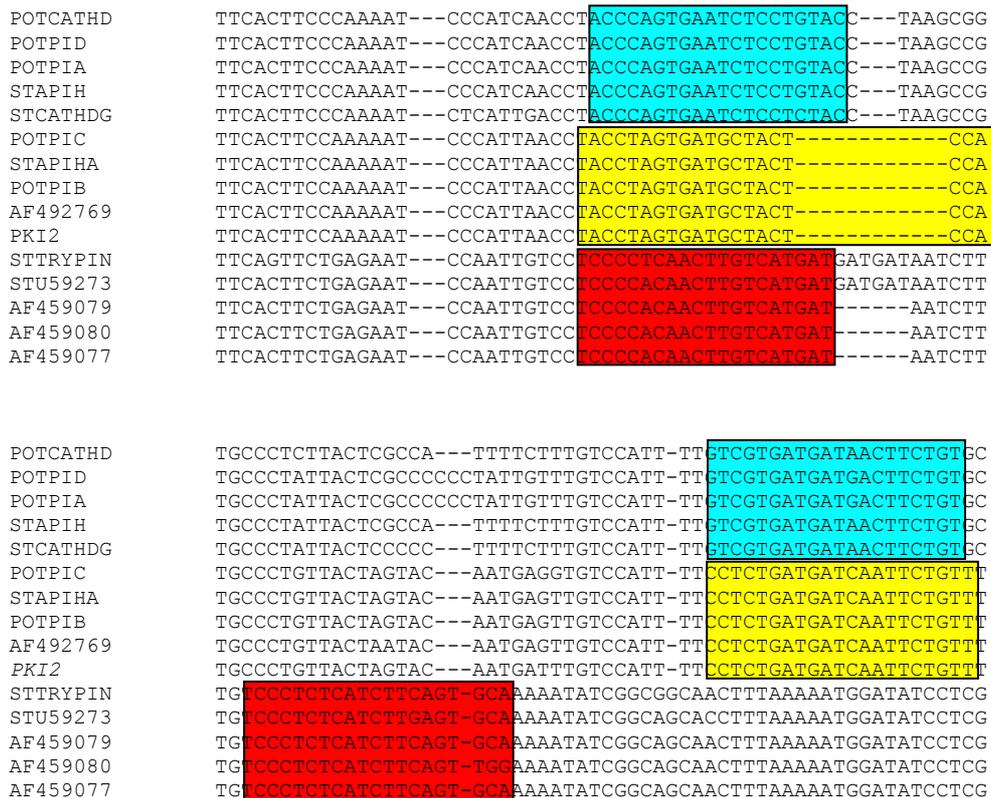


Figura 4A. Allineamento delle sequenze nucleotidiche di diversi membri della famiglia Kunitz ed identificazione di regioni specifiche per i gruppi di omologia A, B, C (▲-A, ▲-B, ▲-C) sulle quali sono stati disegnati i primer gruppo-specifici.

BG595539 G-AACTTCAAAGGA-ATTTGAATGCAATGGAAAACCTAAGC-TGG-CCAGAAC--TTAT
 TC92866 G-AACTTCTAAAGGA-ATTTGAATGCAATGGAAAACCTAAGC-TGG-CCAGAAC--TTAT
 PPI2C4 G-AACTTCTAAAGGA-ATTCAATGCAATGGAAAACCTAAGC-TGG-CCAGAAC--TTAT
 CN515078 G-AACTTCTAAAGGA-ATTTCAATGCAATGGAAAACCTAAGC-TGG-CCAGAAC--TTAT
 PPI2C1 G-AACTTCTAAAGGA-ATTTCAATGCAATGGAAAACCTAAGC-TGG-CCAGAAC--TTAT
 TC92867 G-AACTTCTAAAGGA-ATTTCAATGCAATGGAAAACCTAAGC-TGG-CCAGAAC--TTAT
 TC92863 G-AACTTCTAAAGGA-ATTTGAATGCAATGGAAAACAATTC-TGG-CCAGAAC--TTAT
 CN514606 GCAACTTCTAAAGGA-ATTTGAATGCAATGGAAAACAATTC-TGG-CCAGAAC--TTAT
 TC104609 G-AACTTCTAAAGGA-ATTTGAATGCAATGGAAAACCTAAGA-TGG-CCAGAAC--TTAT
 PPI3A4 G-AACTTCTAAAGGA-ATTTGAATGCAATGGAAAACAAGG-TGG-CCAGAAC--TTAT
 PPI3A2 G-AACTTCTAAAGGA-ATTGAATGCAATGGAAAACAAGG-TGG-CCAGGAC--TTAT
 PPI3B2 G-AACTTCAAAGGA-ATTTGAATGCAATGGAAAACCTACAA-TGG-CCAGAAC--TTAT

BG595539 GGGTG-----ATGTT-GGACAAATTCCTAAGGG-GGGCTTAATTAATGGGATTATTA
 TC92866 GGGTG-----ATGTT-GTAGAAA-TGCCTGTGGTTCGTTAA--TTAATGGATTACTG
 PPI2C4 GGGTG-----ATGTT-GTAGAAA-TGCCTGTGGTTCGTTAA--TTAATGGATTACTG
 CN515078 GGGTAGAAAAGTGTTTT-GTAGAAAATGCCTGTGGTTCGTTAA--TTAATGGATTACTG
 PPI2C1 GGGTG-----ATGTT-GTAGAAA-TGCCTGTGGTTCGTTAA--TTAATGGATTACTG
 TC92867 GGGTG-----CTGTT-GTACAAA-TTCCTGTGGTTGGTTAA--TTAATGGATTATTG
 TC92863 GGGTT-----CTGTT-GTACAAA-TTCCTAGGG-TGG-CTTAATTAATGGATTATTA
 CN514606 GGGTT-----CTGTT-GTACAAA-TTCCTAGGG-TGGCTTAATTAATGGATTATTA
 TC104609 GGATT-----ATGCT-GTATCAA-TGCCTGTGGTTGGTTAA--TTAATGGATTATTG
 PPI3A4 GGATT-----ATGCT-GTATCAA-TGCCTGTGGTTGGTTAA--TTAATGGATTATTG
 PPI3A2 GGATT-----ATGCT-GTATCAA-TGCCTGTGGTTGGTTAA--TTAATGGATTATTG
 PPI3B2 GGGTG-----TTGTT-GTAGAAA-TGCCTGTGGTTCGTTAA--TTAATGGATTATTG

Figura . Allineamento delle sequenze nucleotidiche di diversi membri della famiglia P11 ed identificazione di regioni specifiche (▲) per i geni *PPI3A2* (DQ087224), *PPI3B2* (DQ087221), *PPI2C4* (DQ087223), sulle quali sono stati disegnati i primer gene-specifici.

I primer utilizzati negli esperimenti di RT-PCR semiquantitativa sono indicati nella tabella 9.

Tabella 9: Primer e condizioni utilizzati negli esperimenti di RT-PCR semiquantitativa.¹ Le sequenze dei primer Pinlf e Pinlr sono state precedentemente descritte da Lin *et al.*, (2003).

Nome	Sequenza primer 5'→3'	T _a (°C)	n. di cicli	cDNA (bp)	Gene, gruppo o famiglia amplificati
2c4f	TCAATGCAATGGAAAATAAGC	67	40- 43	206	<i>PPI2C4</i>
2c4r	GACGAACCACAGGCATCTC	- 0,03/ciclo			
3b2f	TGAATGCAAAGGAAAATACAA	63	40- 43	206	<i>PPI3B2</i>
3b2r	AACCGACCACAGGCATGTC				
3a2f	TGAATGCAATGGAAAACAAAGG	63	40- 43	206	<i>PPI3A2</i>
3a2r	TAACCAACCACAGGCATTGA				
5pir	ATGGAGTCAAAGTTTGCTCAC	58	30- 34	233	Famiglia PI1
Asp3	AACCATTTCAGTATTATCTGAAC				
Af	ACCCAGTGAATCTCCTCTAC	64	36- 40	482	Gruppo kunitz A
Ar	ACAGAAGTCATCATCACGAC				
Bf	TACCTAGTGATGCTACTCCA	59	36- 40	489	Gruppo kunitz B
Br	AACAGAATTGATCATCAGAGG				
Cf	TCCCCACAACCTTGTCATGAT	65 - 0,04/ciclo	36- 40	485	Gruppo kunitz C
Cr	TGCACTCAAGATGAGAGGGA				
Pinlf ¹	CATGGATGTTTCAACAAGGAAGTT	60	36- 40	426	Famiglia Pin2
Pinlr ¹	CTCTCCTTACATACAAACTTG				
PR1af	TTAAACCAATCCAACTATTCC	57	35- 37	500	Famiglia PR1
PR1br	CAAGTTATAAAGTACCACCCG				
Tubf	ATGGATCTAGAGCCTGGTACTATG	58	26	525	Famiglia Tubulina
Tubr	CAAACAGCAAGTAACACCACTC				

Nella suddetta tabella oltre ad essere riportati i primer gene o gruppo-specifici utilizzati per amplificare selettivamente tre diversi geni (*PPI3B2*, *PPI3A2*, *PPI2C4*) della famiglia PI1 o i gruppi A, B e C della famiglia di inibitori Kunitz, sono anche state riportate le coppie di primer utili all'amplificazione di intere famiglie geniche quali: 5PIR-ASP3 per la famiglia dei PI1, Pinlf-Pinlr per la famiglia dei Pin2, PR1af- PR1br per la famiglia delle PR1 e Tubf- Tubr per la famiglia della β -tubulina.

5.8 Amplificazione di frammenti di DNA mediante PCR, RT-PCR, RACE 5'

Le reazioni polimerasiche, effettuate in esperimenti di PCR, RT-PCR e RACE 5'

utilizzando i primer LPS, SP, RP2, NSPNDE, RPBAM2, INTF, INTR, SPI, SPII, SPIII, CIFI, CIFII, sono state condotte in un volume totale di reazione di 50 μ l utilizzando come templati DNA (di pianta o plasmidico) o cDNA (di pianta). In questi casi sono state utilizzate le condizioni riportate nella colonna "Mix3" della tabella 10a ed il protocollo per i cicli termici descritto in tabella 10b.

Tabella 10a: Protocollo delle reazioni di PCR. * Sono stati utilizzati 5 μ l di cDNA (1:15) o 2 μ l di una soluzione di DNA 20 ng/ μ l.

PCR reagents	Mix 1	Mix 2	Mix 3
Taq polimerasi (5U/ μ l)	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
MgCl ₂ 50 mM	0,9 μ l	0,7 μ l	2 μ l
PCR buffer 10X	3 μ l	3 μ l	5 μ l
dNTPs (2,5 mM)	2,4 μ l	2,4 μ l	3 μ l
cDNA (1:15)	5 μ l	5 μ l	5 μ l *
Primer (10 pic/ul)	1,5 μ l (ogni primer)	1,5 μ l (ogni primer)	4 μ l (ogni primer)
H ₂ O	16,2 μ l	16,4 μ l	29,5 μ l
Volume finale	30 μ l	30 μ l	50 μ l

Tabella 10b: Cicli termici effettuati nelle reazioni di PCR in cui sono stati utilizzati i primer LPS, SP, RP2, NSPNDE, RPBAM2, INTF, INTR, SPI, SPII, SPIII, CIFI, CIFII. Per tutte le PCR sono stati utilizzati 32 cicli e diverse temperature di appaiamento (*) a seconda della coppia di primer.

Passaggio	Temperatura (°C)	Tempo
Hot start	94	5 min.
Denaturazione iniziale	94	45 sec.
Appaiamento	*	50 sec.
Estensione	72	90 sec.
Estensione finale	72	10 min.

Le temperature di appaiamento sono state di 58°C (SP-RP2, LPS-RP2, NSPNDE-RPBAM2, INTF-INTR), 62°C (CIFI-SPIII) o 55°C (CIFII-SPI, CIFII-SPII) a seconda delle coppie di primer usate. Le combinazioni di primer SP-RP2, LPS-RP2 sono state utilizzate per amplificare il gene *PKI1* (DQ087220) con o senza peptide segnale, rispettivamente. I primer INTF e INTR sono stati usati per amplificare una regione corrispondente ad un putativo introne del gene *PKI1*. Le coppie di primer CIFI-SPIII e CIFII-SPII sono state utilizzate per amplificare le sequenze codificanti gli inibitori PPI3B2, PPI3A2, PPI3A4 (DQ087225) e PPI2C4, PPI2C1A (DQ087222), rispettivamente.

Negli esperimenti di RT-PCR ed RT-PCR semiquantitativa, il cDNA a singolo filamento è stato generato mediante reazioni di retrotrascrizione (RT) utilizzando il kit Superscript™ II RNase H- (Invitrogen) seguendo le istruzioni del fornitore. Le reazioni di RT sono state effettuate in un volume totale di 20 μ l utilizzando 70 ng di RNA poly(A)⁺ (germogli) o 1,5 μ g (radici), 4 μ g (tuberi, stoloni, germogli, fusti, foglie e fiori) di RNA totale. Per verificare la presenza di eventuali contaminazioni da DNA genomico nei campioni di cDNA è stata effettuata una PCR utilizzando la coppia di primer Tubf-Tubr che amplificano una porzione del gene della β -tubulina contenente un introne (il DNA genomico dà una banda di dimensioni maggiori rispetto al cDNA).

Per quanto riguarda le reazioni polimerasiche effettuate negli esperimenti di RT-PCR semiquantitativa, queste sono state condotte in un volume totale di reazione di 30 μ l. Le condizioni utilizzate in questi casi sono state riportate

nelle colonne “Mix1” e “Mix2” della tabella 10a ed il protocollo per i cicli termici descritto in tabella 11. La “mix” 1 è stata utilizzata per amplificare le famiglie geniche P11, PinII, PR1 e β -tubulina, mentre la “mix 2” è stata usata per l’amplificazione selettiva dei cDNA *PPI3A2*, *PPI3B2*, *PPI2C4* e dei gruppi A, B e C di inibitori kunitz. Le combinazioni di primer utilizzate in questi esperimenti sono state: 5PIR-ASP3, PinII_f-PinII_r, PR1_{af}-PR1_{br}, Tub_f-Tub_r, 2c4_f-2c4_r, 3b2_f-3b2_r, 3a2_f-3a2_r, Af-Ar, Bf-Br, Cf-Cr. I geni, gruppi di geni o famiglie geniche amplificati mediante l’impiego di ciascuna coppia di primer sopra riportate sono descritti in tabella 9. La specificità dei primer gene o gruppo-specifici utilizzati negli esperimenti di RT-PCR semiquantitativa è stata saggiata individualmente mediante PCR sul DNA dei membri *PPI3A2*, *PPI3B2*, *PPI2C4* della famiglia genica dei P11 o dei rappresentanti dei gruppi A, B e C degli inibitori Kunitz, precedentemente clonati nel plasmide pGEM®-T Easy Vector (Promega). I geni *P7E9* (AY089959), *PKI1* e *P9B1* (AF459079) sono stati utilizzati rispettivamente come rappresentanti dei gruppi A, B e C.

Tabella 11: Cicli termici effettuati nelle reazioni di PCR in cui sono stati utilizzati i primer 5PIR, ASP3, PinII_f, PinII_r, PR1_{af}, PR1_{br}, Tub_f, Tub_r, 2c4_f, 2c4_r, 3b2_f, 3b2_r, 3a2_f, 3a2_r, Af, Ar, Bf, Br, Cf, Cr. * La temperature di annealing ed il numero di cicli utilizzati per ciascuna coppia di primer sono descritti in tabella 9.

Passaggio	Temperatura (°C)	Tempo
Hot start	94	4 min.
Denaturazione iniziale	94	45 sec.
Appaiamento	*	35 sec.
Estensione	72	1 min.
Estensione finale	72	10 min.

Prima dell’amplificazione semiquantitativa dei diversi campioni ci si è assicurati che le quantità di cDNA in essi contenute fossero uguali e che l’RNA di partenza fosse integro, mediante l’impiego del gene della β -tubulina che è servito da standard interno. In aggiunta sono state determinate per ogni set di primer il numero di cicli di PCR che identificasse la fase esponenziale di amplificazione dei relativi prodotti e che ne permettesse una percezione affidabile e la successiva quantizzazione. Ciascun esperimento è stato effettuato in triplicato e sono stati inclusi appositi controlli per determinare la specificità degli ampliconi. Le amplificazioni sono inoltre state ripetute in occasioni indipendenti su cDNA neo sintetizzato da estrazioni indipendenti di RNA. La relativa abbondanza dei trascritti è stata determinata mediante l’analisi quantitativa delle fotografie digitali dei gel, effettuata utilizzando il software ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Inizialmente è stata calcolata l’area del picco relativa a ciascun campione e ne è stato sottratto il “background”. Successivamente l’abbondanza dei trascritti di ciascun campione è stata calcolata come numero di volte che questo risulta essere più o meno espresso in relazione al controllo (tessuto non trattato al tempo zero nel caso dell’infezione con *G. rostochiensis* o tempo uno nel caso delle piante ferite) a cui è stato dato un valore di 1. E’ poi stata calcolata e riportata in grafico, per ciascun punto temporale, la percentuale di espressione dei geni studiati come rapporto tra l’abbondanza del trascritto nel tessuto trattato rispetto a quello non trattato. I dati dell’espressione relativa di ciascun gene o gruppo di geni sono

stati rappresentati come media delle tre repliche indipendenti più o meno l'errore standard della media.

Per quanto riguarda la RACE 5' questa è stata effettuata utilizzando il kit 5'/3' RACE Kit (Boehringer Mannheim), secondo le raccomandazioni del fornitore. I prodotti della RACE 5' sono stati generati utilizzando i primer SPI, SPII, SPIII. Le temperature di annealing utilizzate durante le nested PCR sul cDNA poly(A)⁺, sono state di 55°C e 65°C con i primer SPII e SPIII rispettivamente. Gli ampliconi ottenuti dalle reazioni di PCR, RT-PCR e RACE 5' sono stati separati mediante elettroforesi su gel d'agarosio (0,8%-1,5%) in tampone TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM acido acetico, 1 mM EDTA, pH 8) e colorati con bromuro di etidio. Le bande elettroforetiche sono state visualizzate per irraggiamento UV su un transilluminatore.

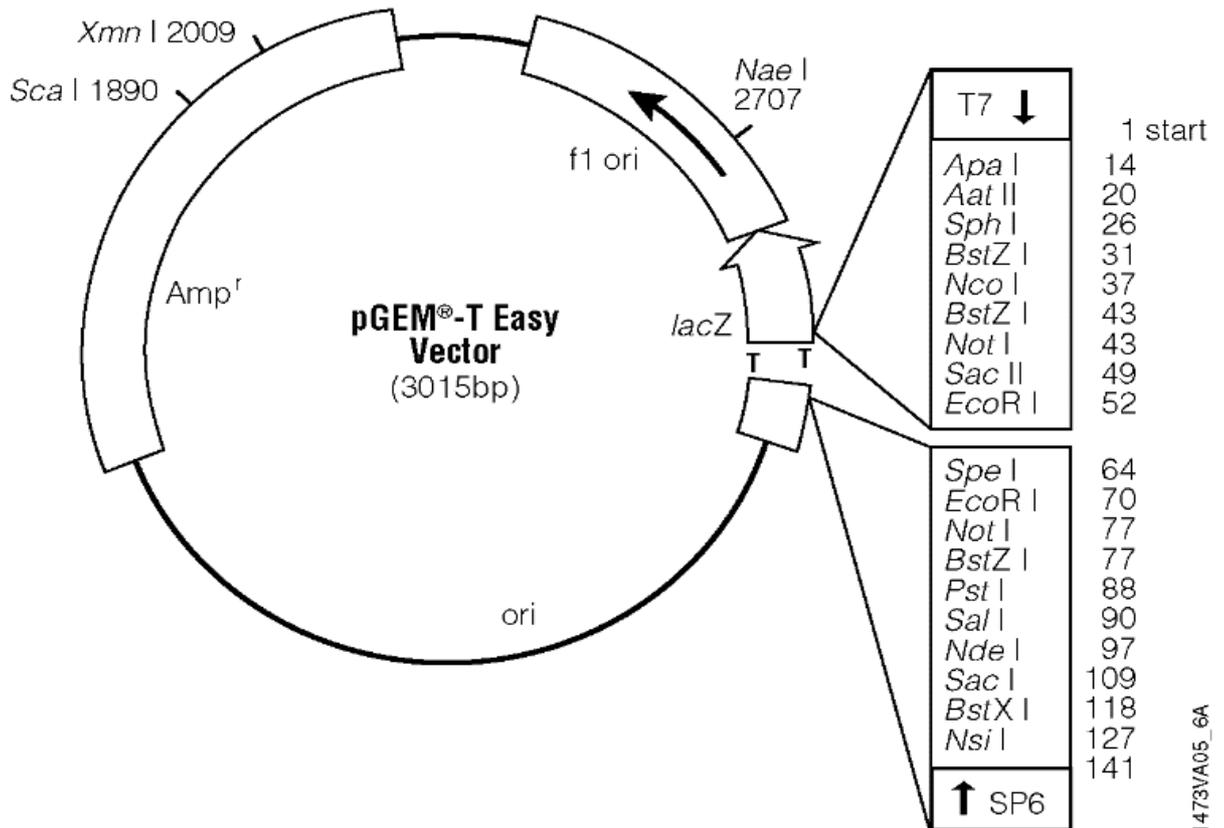
5.9 Clonaggio dei geni dei PI

5.9.1 Eluizione degli amplificati ottenuti mediante PCR, RT-PCR o RACE5'

Le bande elettroforetiche di interesse sono state escisse dal gel d'agarosio su un transilluminatore a raggi UV con l'ausilio di un bisturi e purificate utilizzando l'Agarose Gel Extraction kit QIAEX II (Qiagen, Hilden, Germany). La procedura consiste nella dissoluzione dell'agarosio in presenza di opportuni reagenti e nel successivo assorbimento del DNA ad una resina silicica. I campioni di DNA purificati dal gel sono stati risospesi in acqua. Un'aliquota di ciascuno di essi è stata quantizzata e la restante parte è stata utilizzata o conservata a -20° C.

5.9.2 Ligazione nel vettore plasmidico

Per il clonaggio dei frammenti di DNA amplificati mediante PCR, RT-PCR o RACE 5' è stato usato il plasmide pGEM®-T Easy Vector (Promega) (figura 5).



1473VA05_6A

Figura 5: Mappa circolare del vettore pGEM®-T Easy riportante: sito di inizio della trascrizione dell'RNA polimerasi T7, sito di inizio della trascrizione dell'RNA polimerasi SP6, regione timidilata per il clonaggio di frammenti di DNA, punto di interruzione della sequenza dell'operone *Lac*, regione gene di resistenza all'ampicillina codificante per la β -lattamasi.

Tale vettore, recando un residuo timidilico al 3' terminale di ciascuna estremità, risulta particolarmente efficace per il clonaggio di prodotti di PCR che presentano uno o più residui adenilici al terminale 3' delle sequenze amplificate. Le ligazioni sono state effettuate utilizzando 50 ng di vettore in presenza di un eccesso molare, pari a circa 3:1, dell'inserto di DNA da clonare e dell'enzima T4 DNA ligasi (PROMEGA), in un volume di reazione di 20 μ l. La miscela di reazione è poi stata tenuta per circa 16 ore a 15° C. Il DNA è quindi stato precipitato a -20° C per aggiunta di 1/10 di volume di acetato di sodio 3M pH 5.2 e di 2,5 volumi di etanolo assoluto. Il precipitato è poi stato lavato con etanolo al 70%, brevemente asciugato all'aria e ridissolto in 10 μ l di acqua bidistillata.

5.9.3 Trasformazione di cellule competenti di *E. coli* mediante elettroporazione o shock termico

Dopo la reazione di ligazione si è proceduti alla trasformazione del DNA in cellule competenti di *E. coli*. Il ceppo BL21(DE3)pLYsS è stato trasformato mediante shock termico, mentre il ceppo DH5 α per elettroporazione. Nel primo caso la procedura di shock termico è stata effettuata secondo il protocollo

Novagen (consultabile al sito internet <http://www.novagen.com>). Nel secondo caso, invece, è stato utilizzato un elettroporatore Gene Pulser 2 (BioRad). A 90 μ l di una sospensione di cellule competenti è stato aggiunto il DNA proveniente dalla ligazione (5 μ l). La miscela è stata trasferita in apposite cuvette che, dopo essere state conservate in ghiaccio per 60 secondi, sono state inserite nell'apposito alloggiamento dell'elettroporatore, quest'ultimo settato a 25 μ F, 2.4 kV e 200 omega. Dopo la scarica elettrica, la cuvetta è stata immediatamente rimossa e, alla miscela in essa contenuta, è stato rapidamente aggiunto 1ml del mezzo di coltura SOC (Bacto-tryptone 2%, Bacto yeast extract 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgSO₄ 10 mM, MgCl₂ 10 mM, glucosio 20 mM). La sospensione cellulare, trasferita in appositi tubi di coltura, è poi stata incubata a 37° C per 1 ora in agitazione. Successivamente aliquote da 100 e 200 μ l della sospensione batterica sono state piastrate sul mezzo LB-agar (Luria Bertani) costituito da 5 g/l di Bacto yeast extract, 10 g/l di peptone e 15 g/l di agar tecnico e contenente anche 50 μ g/ml di ampicillina, 20 mg/ml di 5 bromo-4-cloro-3-indolil- β -galattoside (substrato dell'enzima della β -galattosidasi) e 0.1 mg/ml di isopropil- β tiogalattopiranoside (induttore del gene della β -galattosidasi). Tale substrato permette l'analisi dei trasformanti recanti l'inserito, grazie ad un processo denominato "inattivazione inserzionale". Infatti, il sito di clonaggio del plasmide pGEM®-T Easy 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 di *E. coli* trasformate con plasmidi contenenti l'inserito appaiono bianche, mentre quelle contenenti il plasmide vuoto appaiono blu. Le colonie bianche sviluppatasi dopo 24 ore di incubazione a 37° C, sono state trasferite in tubi contenenti 3ml di LB + ampicillina 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.

5.10 Overespressione del gene *PKI1* in *E. coli* e purificazione della proteina ricombinante

La regione codificante, priva del peptide segnale, del gene *PKI1* è stata amplificata mediante PCR utilizzando la coppia di primer NSPNDE&RPBAM2 e clonata nel vettore pGEM®-T Easy. Dopo aver confermato, mediante l'analisi completa della sequenza, l'integrità del frammento genico clonato, il prodotto di 573 bp è stato subclonato nei siti unici *Nde*I e *Bam*H I del vettore di espressione pET-15b (fig. 6) (Novagen, Madison, WI) sotto il controllo del promotore T₇. Tale costrutto è stato inserito nel ceppo ospite di *E. coli* DH5 α , prima, e nell'ospite di espressione BL21(DE3)PLYsS (Novagen), poi. Questo ultimo contiene una copia cromosomiale del gene T7 RNA polimerasi sotto il controllo del promotore *lac*. I cloni positivi sono stati identificati mediante colony-PCR ed analisi su gel d'agarosio dei prodotti di doppia digestione, con gli enzimi *Nde*I e *Bam*H I, del DNA plasmidico. L'integrità dei costrutti è poi stata verificata mediante sequenziamento. L'espressione del gene *PKI1* è stata indotta mediante l'aggiunta di IPTG (isopropil β -D tiogalattopiranoside) ad una concentrazione finale 1 mM. 500ml di mezzo LB contenente ampicillina sono stati inoculati con il ceppo BL21(DE3)PLYsS trasformato con il costrutto pET-15b-*PKI1* e quando la coltura ha raggiunto un'OD₆₀₀ di 0,6-0,8 è stata suddivisa

in due aliquote da 250ml ciascuna. L'IPTG è stato aggiunto ad una sola delle due aliquote, mentre l'altra è stata utilizzata come controllo non indotto.

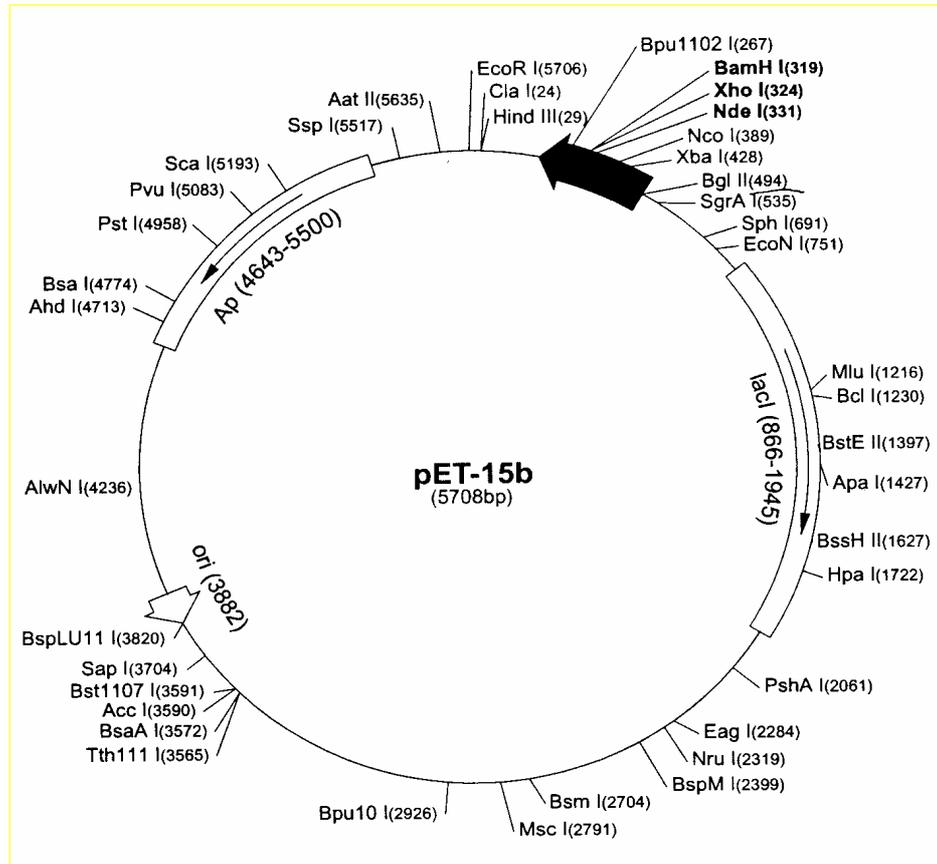


Figura 6: Mappa del vettore pET15b.

Entrambe le colture batteriche sono state fatte crescere in agitazione per altre 3 ore a 250 rpm e a 37° C. L'isolamento delle proteine dal mezzo colturale e dalle frazioni proteiche citoplasmatiche solubili ed insolubili (corpi di inclusione) è stato effettuato seguendo le istruzioni del fornitore. La proteina chimerica (23 kDa) costituita dalla proteina PK11 legata ad una coda di istidine (His tag), tramite un sito di taglio per la trombina, è stata poi purificata dalla frazione proteica insolubile mediante l'utilizzo dell'His-Bind Purification Kit (Novagen), come raccomandato dal fornitore. Sono state utilizzate due diverse metodologie: la purificazione in condizioni non denaturanti (prevede l'impiego di diverse concentrazioni di imidazolo per eluire la proteina ricombinante) e la purificazione in condizioni denaturanti.

Nel caso in cui la proteina è stata estratta in condizioni denaturanti è stato poi necessario rinaturarla e concentrarla. Per quanto riguarda la rinaturazione della proteina è stato utilizzato il Protein Refolding Kit (Novagen), seguendo le istruzioni del fornitore.

Per verificare la presenza e per valutare il grado di purezza della proteina ricombinante in ciascuna delle frazioni proteiche purificate, i vari campioni sono stati sottoposti ad SDS-PAGE. L'elettroforesi è stata effettuata mediante l'utilizzo dell'apparecchio LK B- PhastSystem (Pharmacia, Alameda, CA), e dei

gel Phast-Gel® Homogeneous 20 nonché della soluzione tampone Phast-Gel™ SDS buffer strips, secondo quanto descritto da Laemmli (1970). Dopo la corsa elettroforetica il gel è stato colorato con blu di Comassie per circa 30 minuti e successivamente decolorato con una soluzione contenente metanolo 40% e acido acetico 10%. La quantizzazione delle proteine presenti in ciascun campione è stata, infine, effettuata utilizzando il kit Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad), secondo le istruzioni del fornitore.

5.11 Analisi Southern

Per l'analisi Southern, 5 µg di DNA genomico di *S. tuberosum* cv. Desiree sono stati digeriti con 50 unità degli enzimi di restrizione *Nsi* I, *Bam*H I, *Eco* R I, *Eco* R I / *Nsi* I o *Hind* III, 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® N (Schleicher&Schuell, Keene, New Hampshire) 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) per 16 ore a temperatura ambiente. Il DNA è stato fissato su ciascuno dei lati della membrana tramite esposizione ai raggi UV (1.5 kJ/min) per 3 minuti, e la membrana preibridizzata in 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 PCR DIG Labeling Mix Kit (Roche, Basel, Switzerland) che prevede la marcatura della sonda con digossigenina. Sono state usate come sonde un frammento di 582 bp (gene *PKI1* privo del peptide segnale), amplificato con la coppia di primer LPS&RP2, ed un frammento di 324 bp (l'intero cDNA *PPI3B2*) ottenuto con la coppia di primer CIFI&SPIII. Le sonde digossigenate sono state denaturate per immersione in acqua a 100° C per 10 minuti e rapido raffreddamento su ghiaccio. L'ibridazione è stata effettuata a 42° C o 40° C, quando si utilizzavano come sonde il gene *PKI1* o il cDNA *PPI3B2* rispettivamente, per 16 ore utilizzando 25 ng di sonda per ml di soluzione di ibridazione [DIG Easy Hyb buffer (Roche)]. 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 dalla Boehringer Mannheim, 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). 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.

5.12 Analisi Northern

Per l'analisi Northern l'mRNA è stato purificato dall'RNA totale come descritto in precedenza per le reazioni di RT. 1,5 µg di mRNA estratti da germoglio o da foglie di piante trattate e non (foglia, foglia dopo l'attacco di insetti, foglia dopo l'attacco di insetti e 5 h dopo l'inoculazione con *B. cinerea*, foglia dopo l'attacco di insetti e 20 h dopo l'inoculazione con *B. cinerea*, foglia dopo l'attacco di insetti e 20 h dopo il fermento meccanico) di *S. tuberosum* cv. Desiree sono stati separati mediante elettroforesi su gel di formaldeide-agarosio all'1,2 % e trasferiti per capillarità su una membrana di nylon Nytran® N (Schleicher&Shuell). Sono state utilizzate come sonde frammenti di 666 o 221 bp corrispondenti rispettivamente alla regione codificante il gene *PK11* o ad un frammento, denominato *INT*, corrispondente ad un suo putativo introne. Le sonde di 666 e 221 bp sono state marcate con l'uso del PCR DIG Labeling Mix Kit (Roche) ed i primers SP&RP2 e INTF&INTR, rispettivamente. I successivi passaggi di preibridizzazione, ibridizzazione, lavaggio e detection sono stati eseguiti come già descritto in precedenza per l'analisi Southern, ad eccezione delle temperature di ibridizzazione e del secondo lavaggio che sono state di 48°C.

6. RISULTATI

6.1 Sequenziamento ed isolamento di geni di PI aventi attività antifungina

6.1.1 Sequenze amminoacidiche d'interesse e studio delle omologie di sequenza

A partire da due campioni da noi preventivamente purificati da germogli di patata, denominati rispettivamente PI-16 e PI-10, e costituiti da una miscela di inibitori di proteasi avente attività fungicida, sono state ottenute le sequenze amminoacidiche N-terminali e porzioni di quelle interne (Eurosequence, Olanda). I dati di sequenza del campione PI-10, omologhi a quelli del campione PI-16, sono stati: DNPLDISFK, EFECKGKQLQWPELIGVP, LFDNILGVVVDMPVV (Hermosa *et al.*, 2005). La sequenza amminoacidica EFECKGKQLQWPELIGVP (derivante dal sequenziamento N-terminale della proteina) presenta omologia del 100% con la porzione N-terminale del chymotrypsin inhibitor I catena B di patata (S07233). La sequenza del peptide DNPLDISFK ha mostrato un livello di omologia del 100% con i geni *PKPI-B9* (AAU09272) e *P7D8* (AAM21646) entrambe appartenenti al gruppo B della famiglia degli inibitori Kunitz. La sequenza del peptide LFDNILGVVVDMPVV presenta un elevato grado di identità (circa del 90%) con la porzione C-terminale dei proteinase inhibitor I di pomodoro e patata (A24048 e S07233). La possibilità che tutte e tre le sequenze possano appartenere ad una stessa proteina PI è stata esclusa dall'analisi BlastP. Quest'ultima effettuata utilizzando contemporaneamente tutte e tre le sequenze, non ha indicato un sufficiente grado di omologia con un'unica sequenza amminoacidica presente in banca dati. Sono state, quindi, considerate due ipotesi:

- 1) Le sequenze DNPLDISFK, EFECKGKQLQWPELIGVP e LFDNILGVVVDMPVV appartengono ciascuna ad un diverso PI.
- 2) La sequenza DNPLDISFK appartiene ad un inibitore della famiglia Kunitz e le sequenze EFECKGKQLQWPELIGVP e LFDNILGVVVDMPVV appartengono entrambe ad un unico inibitore della famiglia PI1 della classe delle serina proteasi.

6.1.2 Isolamento di geni codificanti per PI di patata e studio delle omologie di sequenza

Nel presente studio sono stati utilizzati esperimenti di PCR, RT-PCR e RACE 5' per amplificare e clonare diversi geni codificanti per PI di nostro interesse. La prima fase è consistita nel disegnare primer degenerati sulla base delle sequenze amminoacidiche menzionate precedentemente o di porzioni altamente conservate nei geni dei PI di pianta, secondo i criteri descritti nel paragrafo 3.7. Le reazioni di amplificazione effettuate utilizzando diverse coppie di primer sul

DNA genomico o sul cDNA sintetizzato da germogli di *S. tuberosum* cv. Desiree, hanno fornito prodotti di dimensioni variabili tra i 127 e i 1400 bp. Utilizzando le coppie di primer SP-RP2 ed LPS-RP2 è stato possibile amplificare quattro frammenti genici denominati *SPKI1*, *SPKI2* e *NSPKI1*, *NSPKI2* di 666 e 582 bp, rispettivamente. Utilizzando i primer SPI, ed i primer "nested" SPII, SPIII in esperimenti di RACE 5' su cDNA di germogli di patata è stato possibile amplificare un piccolo frammento genico di 127 bp denominato inibitore II. Successivamente mediante la coppia di primer CIFI-SPIII e CIFII-SPII è stato possibile amplificare da mRNA di germogli di patata, mediante RT-PCR, cinque frammenti genici denominati *PPI3B2* (Potato proteinase inhibitor I 3B2), *PPI3A2* (Potato proteinase inhibitor I 3A2), *PPI3A4* (Potato proteinase inhibitor I 3A4), *PPI2C4* (Potato proteinase inhibitor I 2C4), *PPI2C1A* (Potato proteinase inhibitor I 2C1A) di 324, 324, 324, 304 e 324 bp, rispettivamente. Tutti i prodotti di amplificazione sono stati rimossi dal gel e clonati nel vettore pGem-T Easy. L'analisi del DNA plasmidico di cinque colonie di trasformanti per ciascun amplicone clonato ha evidenziato in tutti i casi la presenza di frammenti della dimensione attesa. I frammenti così ottenuti sono stati sequenziati. L'analisi Blastx (Blastx traduce la sequenza da analizzare in tutte e 6 le griglie di lettura e compara i prodotti con le sequenze proteiche nelle banche dati) delle sequenze dedotte dei quattro frammenti, *SPKI1*, *SPKI2*, *NSPKI1*, *NSPKI2*, ha rivelato che tutti i prodotti di amplificazione codificano per la sequenza amminoacidica DNPLDIVSFK, la quale differisce dalla sequenza DNPLDISFK per la sola aggiunta di una valina (sottolineata). L'analisi Blastn ha inoltre mostrato che tutti e quattro i frammenti sono altamente omologhi a geni codificanti per serina PI ed in particolar modo ad inibitori del gruppo B della famiglia Kunitz. Le sequenze dei frammenti *SPKI1*, *NSPKI1* e *SPKI2*, *NSPKI2* clonati differiscono tra loro per la sola presenza, all'estremità 5' del gene, di un peptide segnale di 84 bp, responsabile del veicolamento vacuolare del prodotto proteico. Si è potuto quindi ipotizzare che i quattro frammenti siano relativi a soli due geni, differenti da quelli trovati finora in banca dati e probabilmente completi. Sulla base di tali risultati, i geni identificati sono stati denominati *PKI1* (Potato kunitz inhibitor 1) e *PKI2* (Potato kunitz inhibitor 2). Il gene *PKI1* è risultato essere omologo per il 99% al gene *P1H5* (AF492359) ed al 98% con il gene *P7D8* (AF495585) di *S. tuberosum*, entrambe codificanti per kunitz-type PI. Il gene *PKI2*, invece, ha mostrato un'omologia del 99% con il gene *POTPIB* (D17329) e con il gene *S1C1* (AF492769) di *S. tuberosum*, anch'essi codificanti per kunitz-type PI. Elevati livelli di omologia (superiori all'85%) sono stati riscontrati anche con membri di altre classi di inibitori ed in particolare con gli inibitori delle aspartico proteasi. Le sequenze dei geni *PKI1* e *PKI2*, codificanti per due proteine di 24,10 kDa, sono inoltre state analizzate mediante il programma Lasergene (DNASTAR, Madison, WI) al fine di poter rilevare l'eventuale presenza di introni. Tale analisi ha mostrato la presenza di un unico introne di 221 bp localizzato nella porzione centrale del gene. Per quanto riguarda il frammento genico denominato inibitore II questo corrisponde alla regione 5' terminale di un inibitore della famiglia dei PI1 codificante per due porzioni (QWPELIGVP e LFDNILGW) di entrambe le sequenze amminoacidiche EFECKGKLQWPELIGVP e LFDNILGVVVDMPVV ottenute dal sequenziamento delle proteine purificate. I frammenti genici *PPI3B2*, *PPI3A2*, *PPI3A4*, *PPI2C4*, *PPI2C1A*, invece, corrispondono ai cDNA di geni codificanti per cinque diversi membri della

famiglia dei proteinase inhibitor I di patata, aventi massa molecolare di 11,98 kDa. L'analisi BlastX ha infatti mostrato un elevato grado di omologia (90%) con membri della famiglia dei PI1 e ha evidenziato la presenza sia di un pre-peptide all'estremità N-terminale della proteina che della sequenza consenso, entrambe caratteristiche di questa famiglia di inibitori (vedi paragrafo 1.3.5). Sulla base della predetta sequenza amminoacidica del cDNA del gene *PPI3B2* è inoltre stato evidenziato che solo questo gene codifica per entrambe le sequenze amminoacidiche EFECKGKQLQWPELIGVP e LFDNILGVVVDMPVV di interesse. I geni *PPI2C4*, *PPI2C1A*, *PPI3B2* analizzati mediante il programma Blastn hanno tutti mostrato un'omologia del 95% con i geni *POTPIN1B* (L06606) e *POTPIN1A* (L06985) codificanti per PI1 di *S. tuberosum*. I geni *PPI3A2*, *PPI3A4*, invece, hanno mostrato un'omologia del 93% con entrambe il gene *POTPIN1B* (L06606) ed il gene *STU30861* (U30861) di *S. tuberosum*, anch'essi codificanti per PI1.

6.2 Caratterizzazione dei geni di PI isolati

6.2.1 Caratterizzazione del gene *PKI1* mediante analisi Southern

E' stata effettuata un'analisi Southern in condizioni di alta stringenza su DNA genomico di *S. tuberosum* cv. Desiree per confermare la presenza del gene *PKI1* e per determinarne il numero di copie. Per effettuare tali analisi, due aliquote del DNA genomico sono state digerite, ciascuna con un diverso enzima di restrizione, ed è stata utilizzata come sonda lo stesso gene *PKI1* (figura 7).

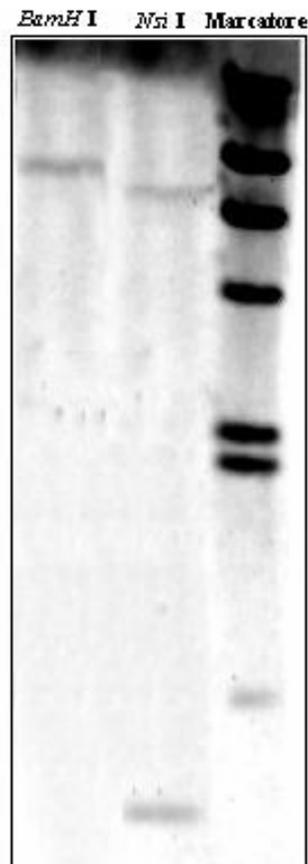


Figura 7: Analisi Southern effettuata su DNA genomico di patata. Il DNA è stato digerito con *BamH* I (corsia 1) e con *Nsi* I (corsia 2). La sonda utilizzata è il gene *PK11*, privo di peptide segnale (582 bp). Nella corsia 3 vi sono gli standard molecolari.

Nsi I è in grado di riconoscere un unico sito di restrizione immediatamente a valle del codone di inizio e quindi di tagliare una sola volta all'interno del gene *PK11* producendo due bande di 5,0 kb e di 564 bp. Il trattamento con l'enzima *BamH* I, il quale non taglia all'interno della sequenza nota, produce invece un'unica banda di 6,6 kb.

6.2.2 Caratterizzazione del gene *PPI3B2* mediante analisi Southern

E' stata effettuata un'analisi Southern su DNA genomico di *S. tuberosum* cv. Desiree in condizioni di bassa stringenza, utilizzando come sonda il cDNA del gene *PPI3B2*, per poter confermare la presenza del gene *PPI3B2* e per determinare il numero di geni costituenti la famiglia dei PI1. La restrizione con *Nsi* I, il quale non riconosce alcun sito di taglio all'interno del gene, mostra almeno nove bande di ibridizzazione. *Eco* R I, *Eco* R II/ *Nsi* I e *Hind* III, per i quali si ritrova un unico sito di taglio all'interno del gene *PPI3B2*, hanno prodotto almeno 13 differenti bande (fig. 8).

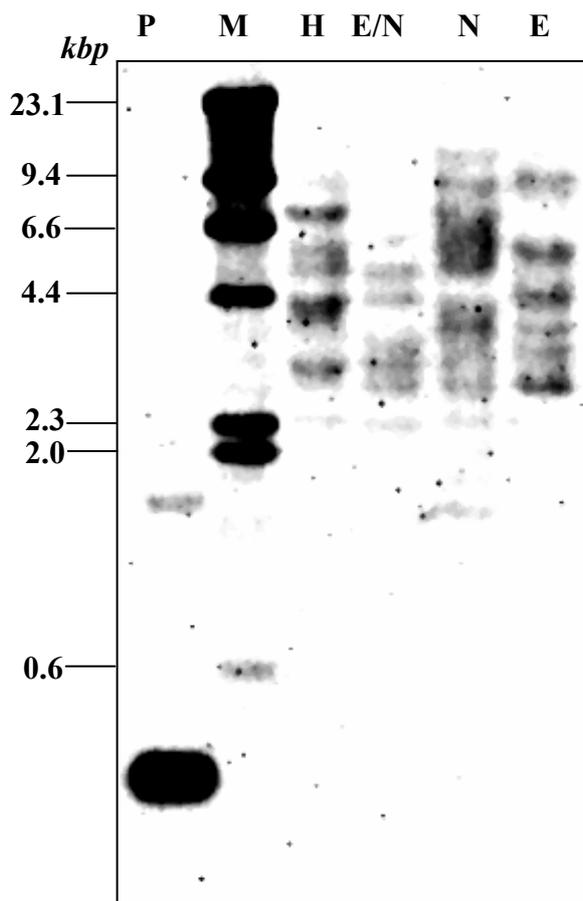


Figura 8: Analisi Southern del gene *PPI3B2* su DNA di *S. tuberosum* cv. Desiree. Corsia E, digestione con *Eco* R I; corsia N, digestione con *Nsi* I; corsia E/N, digestione con *Eco*

R I e *Nsi* I; corsia H, digestione con *Hind* III; corsia M, standard molecolare; corsia P, pGEM®-T Easy-*PPI3B2* digerito con *Eco* R I.

6.2.3 Analisi Northern ed RT-PCR

Per studiare il profilo di espressione del gene *PKI1* e l'eventuale presenza di un putativo introne è stata effettuata un'analisi Northern. Tale analisi è stata eseguita in condizioni di alta stringenza su mRNA estratto dai germogli e da cinque differenti campioni di foglie di piante di *S. tuberosum* cv. Desiree (Fig. 9).

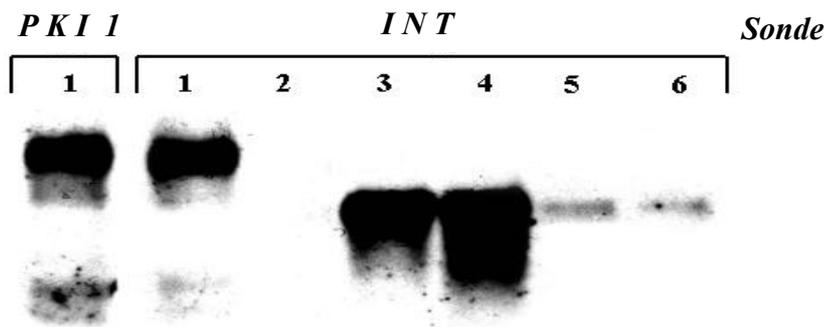


Figura 9: Analisi Northern del gene *PKI1* mediante ibridazione dell'mRNA di *S. tuberosum* cv Desiree con le sonde *PKI1* ed *INT*. Corsia 1, germoglio; corsia 2, foglia; corsia 3, foglia dopo l'attacco di insetti; corsia 4, foglia dopo l'attacco di insetti e 5 h dopo l'inoculazione con *B. cinerea*; corsia 5, foglia dopo l'attacco di insetti e 20 h dopo l'inoculazione con *B. cinerea*; corsia 6, foglia dopo l'attacco di insetti e 20 h dopo il ferimento meccanico.

L'ibridizzazione dell'mRNA di germoglio con la sonda di 666 bp, corrispondente al gene *PKI1*, e con quella di 221 bp, corrispondente al putativo introne *INT*, ha prodotto bande uniche. Questo risultato indica l'assenza di un introne nel gene *PKI1*. Inoltre quando i cinque campioni di mRNA di foglia sono stati ibridizzati con la sonda di 221 bp un'unica banda più piccola di quella attesa è stata individuata soltanto nei campioni di foglie attaccate da insetti. Il livello di espressione ottenuto negli estratti 0 e 5 h dopo l'inoculo con *B. cinerea* è risultato circa quaranta volte superiore a quello 20 h dopo il trattamento con il patogeno o ferimento meccanico.

Gli stessi campioni di mRNA impiegati nell'analisi Northern sono stati utilizzati anche in esperimenti di RT-PCR con le coppie di primer LPS&RP2, INTF&RP2 e INTF&INTR, producendo frammenti di 582, 468 e 221 bp rispettivamente (dati non mostrati). La presenza e le dimensioni di tali prodotti di RT-PCR confermava sia l'assenza dell'introne che un basso livello di espressione del gene *PKI1* in tessuti di foglia.

6.2.4 RT-PCR semiquantitativa

Esperimenti di RT-PCR semiquantitativa sono stati utilizzati per poter analizzare individualmente l'espressione delle tre diverse sottofamiglie (A, B, C) di inibitori Kunitz e di diversi membri (*PPI3A2*, *PPI3B2*, *PPI2C4*) della famiglia genica dei

Proteinase inhibitor I (PI1) a seguito di diversi stimoli sia di natura biotica che abiotica ed in differenti genotipi e tessuti della pianta.

6.2.4.1 Espressione di inibitori Kunitz e PI1 in diversi tessuti di piante di patata

Sono stati analizzati i seguenti tessuti di piante di *S. tuberosum* cv. Desireè e del genotipo P40: radici, tuberi, stoloni, fusti, foglie, fiori e germogli (solo della cv. Desireè) (figura 10). I gruppi di omologia A, B e C degli inibitori Kunitz risultano avere un livello di espressione basale più elevato in tutti i tessuti di P40 rispetto a quelli della cv. Desireè, ad eccezione del gruppo C che solamente nei fiori di P40 presenta livelli di mRNA più elevati rispetto a Desireè. Il gruppo A, inoltre, a differenza dei gruppi B e C è espresso in tutti i tessuti di P40 analizzati.

Per quanto riguarda la famiglia PI1, la quale è espressa a livello costitutivo in tutti i tessuti dei due genotipi analizzati, si riscontra una situazione opposta a quella individuata per gli inibitori Kunitz. In questo caso, infatti, il livello di espressione basale è sempre più elevato nei tessuti della cv. Desireè rispetto a P40. Gli specifici membri della famiglia PI1 *PPI3A2* e *PPI2C4* a differenza di *PPI3B2* risultano essere espressi a livelli percepibili con questa tecnica soltanto nei germogli e, meno intensamente, nei tuberi della cv Desireè. Per poter confermare la presenza dell'inibitore *PPI3B2* nei germogli della cv Desireè, da cui era stato isolato, è stato necessario effettuare una PCR di 15 o 25 cicli utilizzando i primer 3b2f-3b2r su un aliquota dei campioni della precedente RT-PCR [vedi riquadro *PPI3B2* (RT-PCR_{x2}) della figura 10].

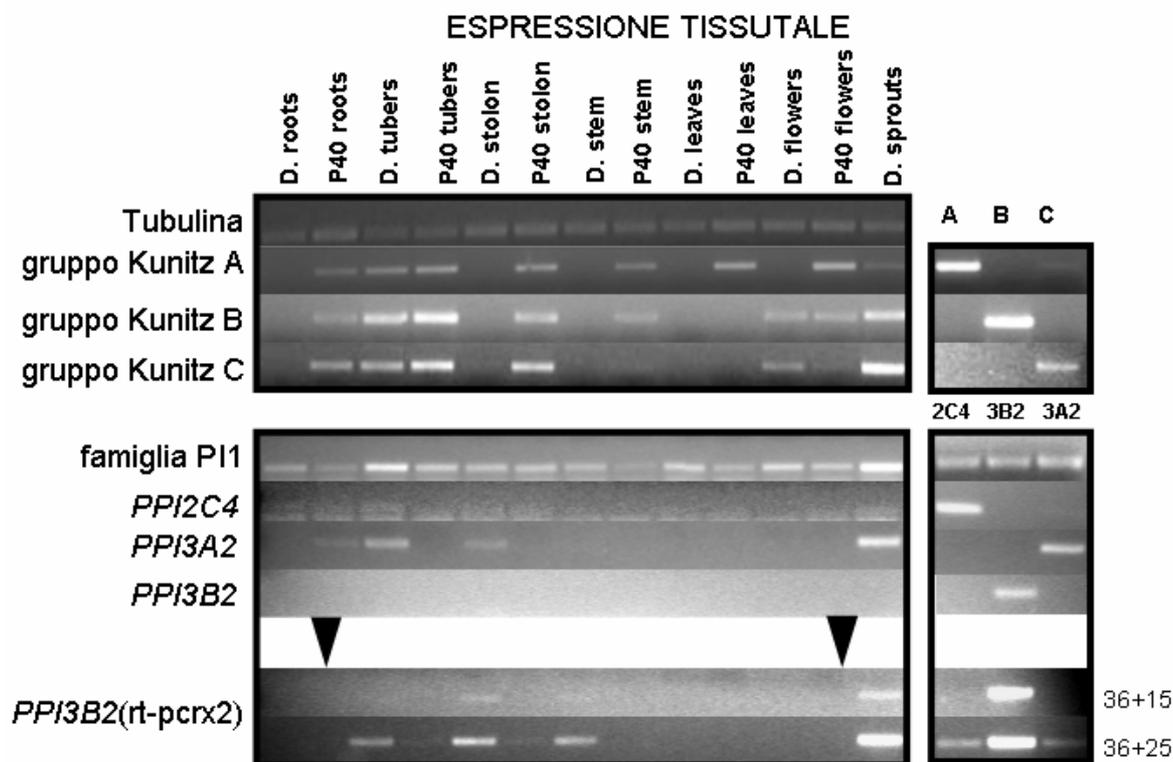


Figura 10. Analisi mediante RT-PCR semiquantitativa di diversi trascritti in tessuti di *S. tuberosum* cv. Desireè e P40, ed analisi della specificità delle reazioni polimerasiche

mediante PCR su DNA controllo dei gruppi Kunitz e dei membri PI1. Corsia D. roots, radici cv. Desireè; corsia P40 roots, radici di P40; corsia D. tubers, tuberi cv. Desireè; corsia P40 tubers, tuberi P40; corsia D. stolon, stoloni cv. Desireè; corsia P40 stolon, stoloni P40; corsia D. stem, fusti cv. Desireè; corsia P40 stem, fusti P40; corsia D. leaves, foglie cv. Desireè; corsia P40 leaves, foglie P40; corsia D. flowers, fiori cv. Desireè; corsia P40 flowers, fiori P40; corsia D. sprouts, germogli cv. Desireè.

6.2.4.2 Espressione dei geni Kunitz, PI1, Pin2 e PR1 in piante di patata parassitizzate dal nematode *Globodera rostochiensis*

E' stata analizzata la risposta locale, in radici (fig. 11a-c), e sistemica, in foglie (fig. 11d-f), delle piante di patata cv. Desireè, P40 e LB7/4/c-l-7 infette con il patotipo *Ro1* del patogeno terricolo *G. rostochiensis*. L'espressione degli inibitori Kunitz, PI1, Pin2, e dei geni codificanti per le proteine PR1, è stata studiata in campioni prelevati 0, 10, 17, 24 giorni dopo l'infezione. Tutte le famiglie di inibitori studiati (Kunitz, PI1 e Pin2), a differenza dei trascritti delle PR1, prendono parte sia localmente che sistemicamente alle risposte della pianta a seguito dell'infezione con il nematode. Gli inibitori Kunitz del gruppo A sono risultati essere espressi solamente nel genotipo P40 e più intensamente nelle foglie rispetto alle radici, a conferma di quanto già visto nell'analisi d'espressione dei tessuti (fig. 10). Per questo gruppo vi è stata una riduzione del 50% ed un aumento del 150% dei trascritti, a livello sistemico, nel secondo e terzo punto temporale, rispettivamente (fig. 12a).

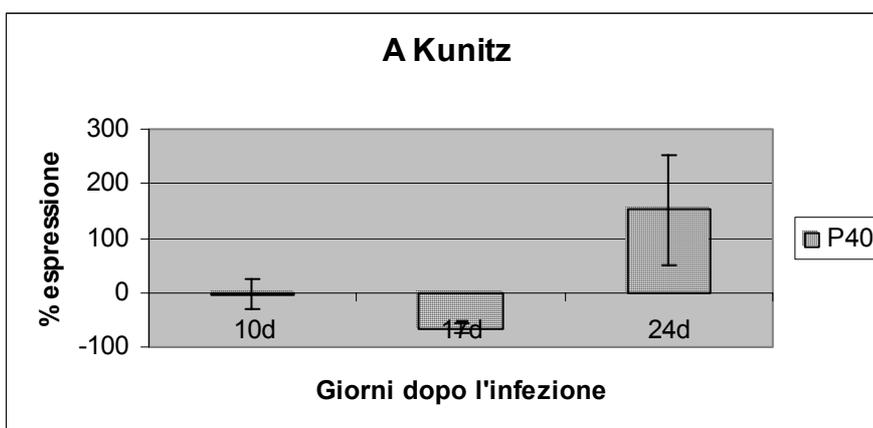


Figura 12a. Percentuali delle variazioni di espressione dei geni di inibitori Kunitz gruppo A in foglie di piante di patata P40 infettate da *G. rostochiensis*.

I gruppi di inibitori Kunitz B e C sono risultati essere espressi solo localmente in tutti i genotipi analizzati. Le quantità di mRNA del gruppo B erano ridotte del 50% nel secondo e nel secondo, terzo punto temporale in Desireè e P40, rispettivamente. Nel genotipo LB7/4/c-l-7 la quantità di trascritti è, invece, aumentata di circa 6 volte nel terzo punto temporale (fig. 12b).

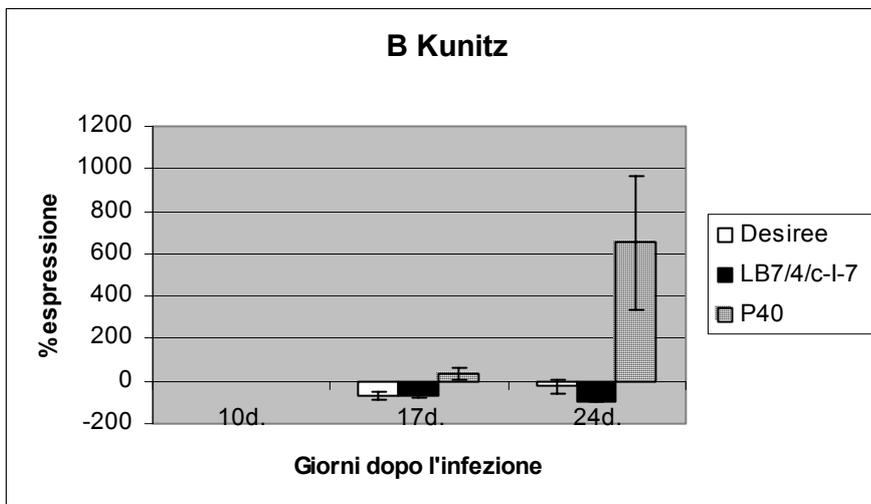


Figura 12b. Percentuali delle variazioni di espressione dei geni di inibitori Kunitz gruppo B in radici di piante di patata cv. Desiree, P40 e LB7/4/c-I-7 infettate da *G. rostochiensis*.

Per quanto riguarda il gruppo C i trascritti sono incrementati per entrambe la cv. Desiree e P40 del 50% nel secondo e terzo punto temporale, mentre in LB7/4/c-I-7 vi è stata una riduzione del 75% nel secondo punto temporale (fig. 12c).

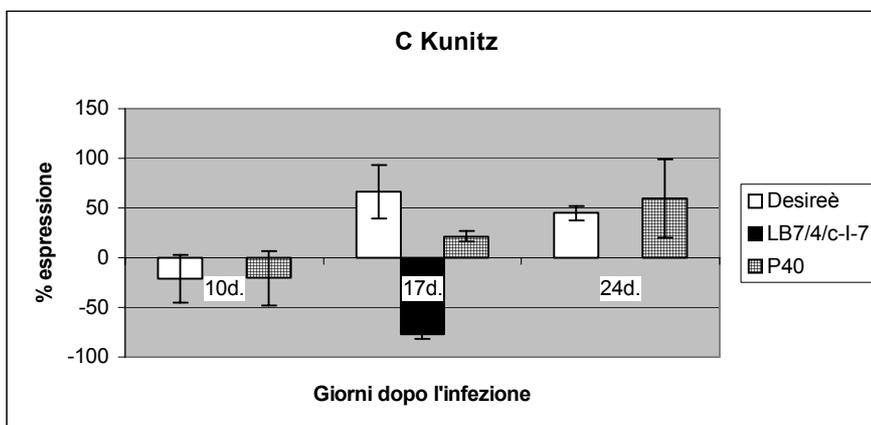


Figura 12c. Percentuali delle variazioni di espressione dei geni di inibitori Kunitz gruppo C in radici di piante di patata cv. Desiree, P40 e LB7/4/c-I-7 infettate da *G. rostochiensis*.

Per quanto riguarda la famiglia dei PI1 è stato possibile apprezzare nella cv. Desiree un aumento locale e sistemico dei trascritti del 50% e del 75%, rispettivamente, sia nel secondo che nel terzo punto temporale. Nella linea transgenica LB7/4/c-I-7 c'è stata, invece, 24 giorni dopo l'infezione una riduzione dei trascritti nelle radici del 40%, mentre non vi è stata espressione differenziale nei campioni di foglia. Il genotipo P40 ha mostrato localmente un aumento del 125% ed una riduzione del 40% dei trascritti nel secondo e nel terzo punto temporale (fig. 12d), rispettivamente, mentre sistemicamente vi è stata una riduzione del 50% prima ed un aumento del 50% poi nel secondo e

terzo punto temporale, rispettivamente (fig. 12e).

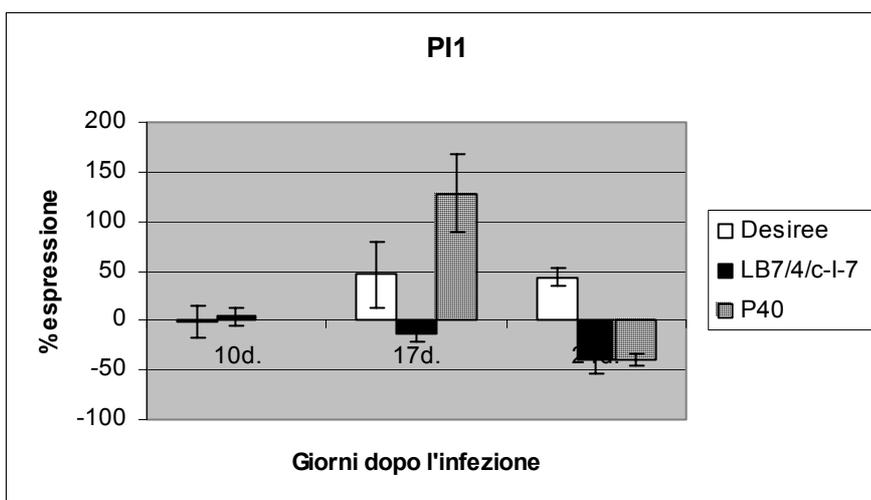


Figura 12d. Percentuali delle variazioni di espressione dei geni della famiglia PI1 in radici di piante di patata cv. Desiree, P40 e LB7/4/c-l-7 infettate da *G. rostochiensis*.

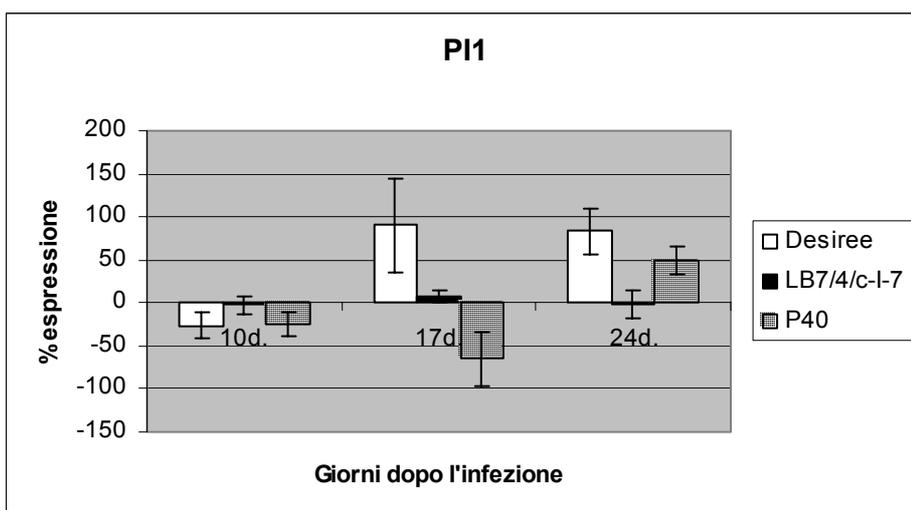


Figura 12e. Percentuali delle variazioni di espressione dei geni della famiglia PI1 in foglie di piante di patata cv. Desiree, P40 e LB7/4/c-l-7 infettate da *G. rostochiensis*.

Il solo gene *PPI3A2* a differenza degli altri membri della famiglia PI1 *PPI3B2* e *PPI2C4*, è stato differenzialmente regolato a seguito dell'infezione. Nella cv. Desiree i livelli di mRNA sono aumentati localmente e sistemicamente del 125% e 60%, rispettivamente, sia nel secondo che nel terzo punto temporale. La situazione opposta è stata riscontrata nel genotipo LB7/4/c-l-7 in cui localmente è stata apprezzata una riduzione del 25% e 50% nel primo e secondo punto temporale, rispettivamente, ed al livello sistemico del 25%, 10% e 25% nel primo, secondo e terzo punto temporale, rispettivamente (fig. 12f e 12g).

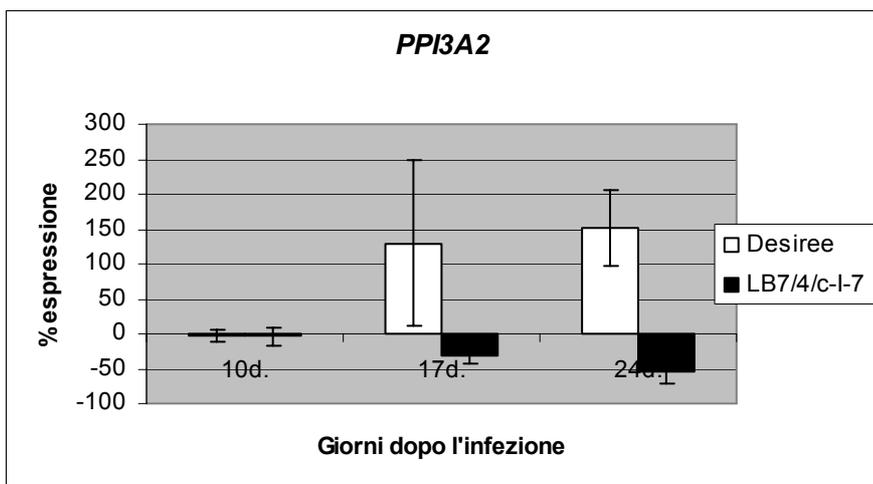


Figura 12f. Percentuali delle variazioni di espressione del gene *PPI3B2* in radici di piante di patata cv. Desiree e LB7/4/c-I-7 infettate da *G. rostochiensis*.

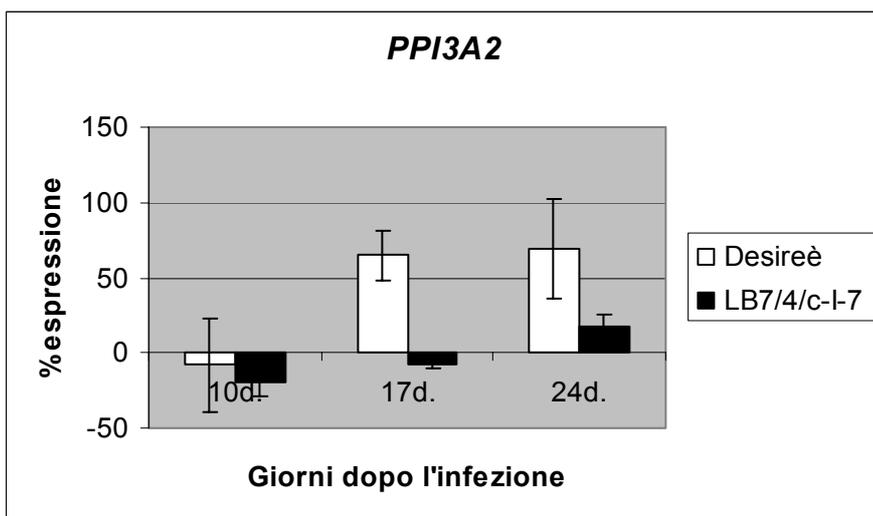


Figura 12g. Percentuali delle variazioni di espressione del gene *PPI3B2* in foglie di piante di patata cv. Desiree e LB7/4/c-I-7 infettate da *G. rostochiensis*.

La famiglia dei Pin2 è risultata nel secondo punto temporale 4 volte più espressa nella cv. Desiree e nel terzo punto temporale 12 volte più espressa in P40. In LB7/4/c-I-7 vi è, invece, stata una riduzione del 100% nel secondo e terzo punto temporale (fig. 12h).

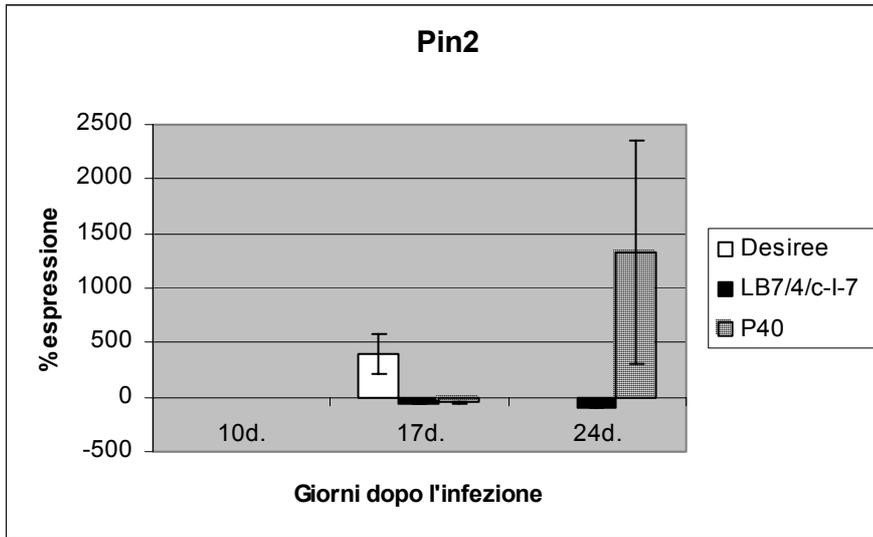
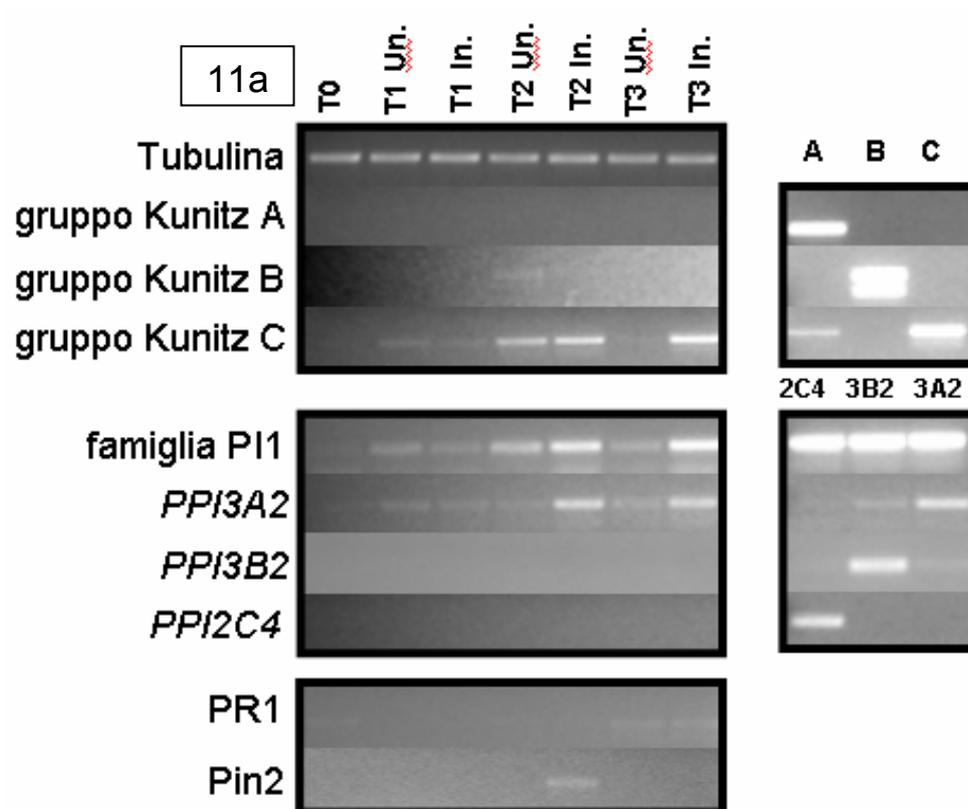
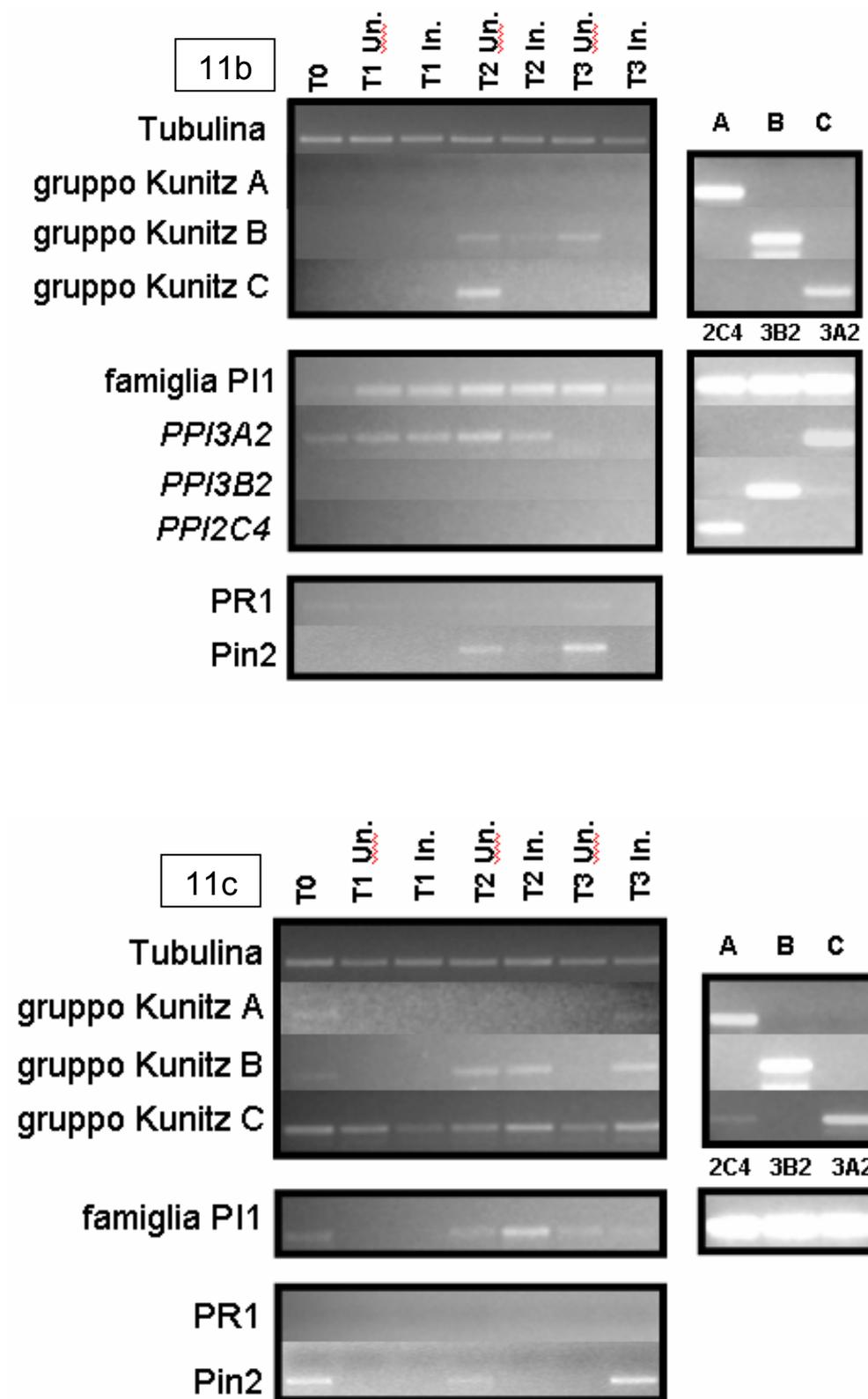
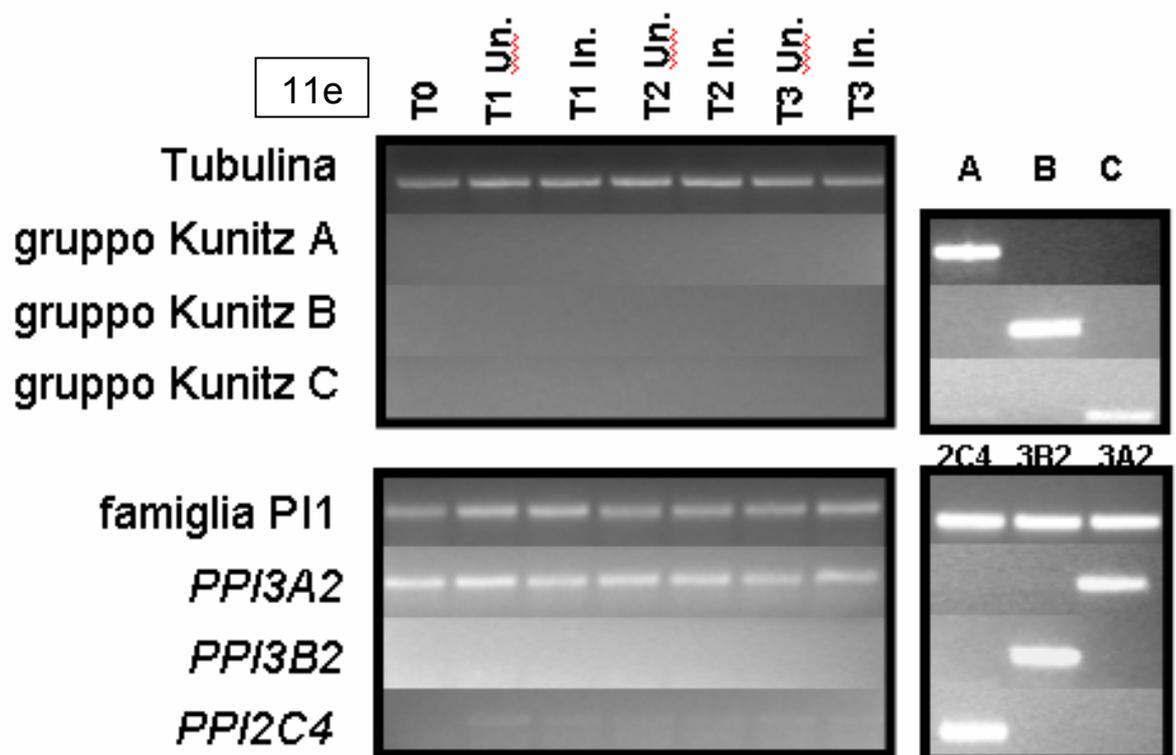
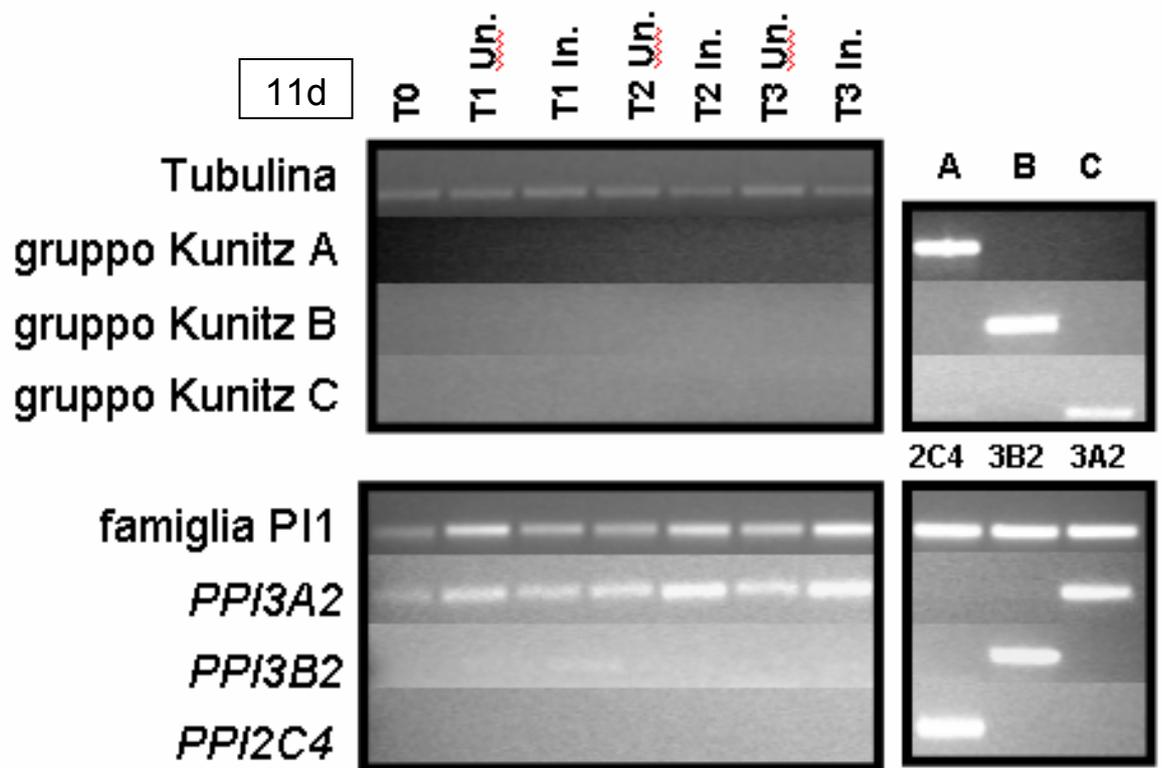


Figura 12h. Percentuali delle variazioni di espressione della famiglia Pin2 in radici di piante di patata cv. Desiree, P40 e LB7/4/c-l-7 infettate da *G. rostochiensis*.







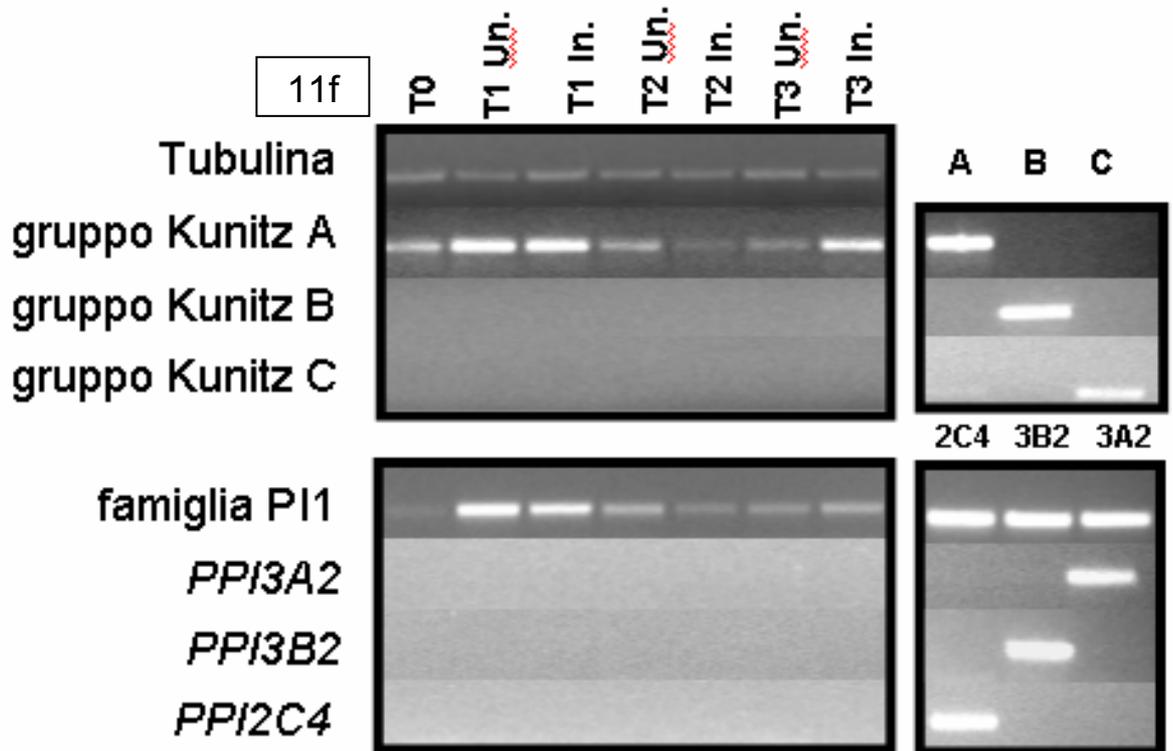


Figura 11a-11f. Analisi mediante RT-PCR semiquantitativa di diversi trascritti in piante di patata infettate dal nematode *G. rostochiensis*, ed analisi mediante PCR della specificità delle reazioni polimerasiche su DNA controllo dei gruppi Kunitz e dei membri della famiglia PI1. Sono state analizzate: radici di *S. tuberosum* cv. Desireè (11a), radici di LB7/4/c-l-7 (11b), radici di P40 (11c), foglie di *S. tuberosum* cv. Desireè (11d), foglie di LB7/4/c-l-7 (11e) e foglie di P40 (11f). Campioni di radici o foglie di piante infette (In.) e non (Un.) sono stati raccolti dopo 0 (T0), 10 (T1), 17 (T2), e 24 (T3) giorni dall'infezione.

6.2.4.3 Espressione dei geni Kunitz, PI1, Pin2 e PR1 in piante di patata ferite

E' stata analizzata la risposta locale e sistemica in foglie (fig. 13a-d) di piante di patata P38, P3, P40 e cv. Desireè ferite. L'espressione degli inibitori Kunitz, PI1, Pin2 e delle PR1 è stata monitorata in campioni prelevati 1 e 2 giorni dopo il ferimento meccanico. Tutte le famiglie di inibitori studiati (Kunitz, PI1 e Pin2), a differenza dei trascritti delle PR1, sono indotti sia localmente che sistemicamente a seguito del ferimento. Nel genotipo P38 vi è un incremento sistemico dei trascritti del 100%, nel secondo punto temporale, per il gruppo A di inibitori Kunitz (fig. 14a), mentre per le famiglie dei PI1 (fig. 14b) e dei Pin2 (fig. 14c) vi è un aumento nel secondo punto temporale sia localmente (PI1 del 40% e Pin2 del 250%) che sistemicamente (PI1 del 40% e Pin2 del 400 %).

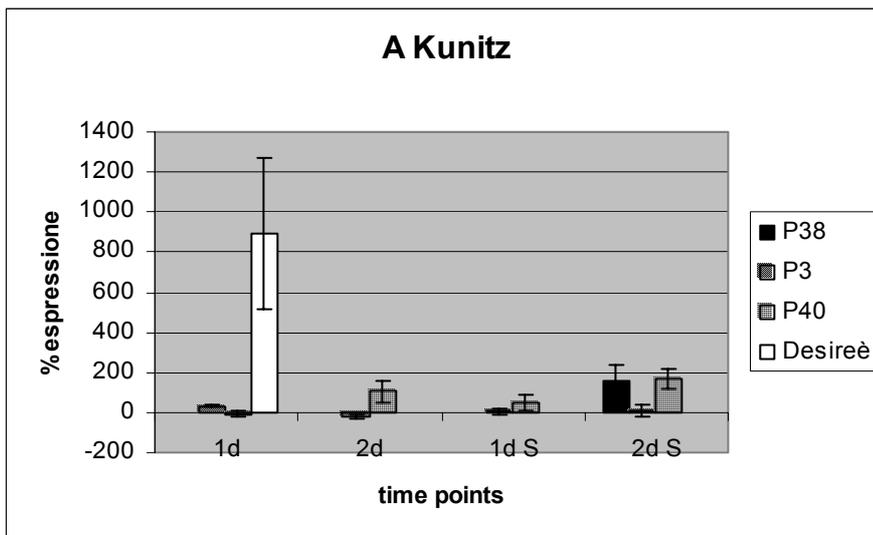


Figura 14a. Percentuali delle variazioni di espressione del gruppo A della famiglia Kunitz in foglie di piante di patata cv. Desireè, P40, P38 e P3 ferite. E' stata analizzata la risposta locale 1 (1d) e 2 (2d) giorni dopo il ferimento e quella sistemica 1 (1dS) e 2 (2dS) giorni dopo il ferimento.

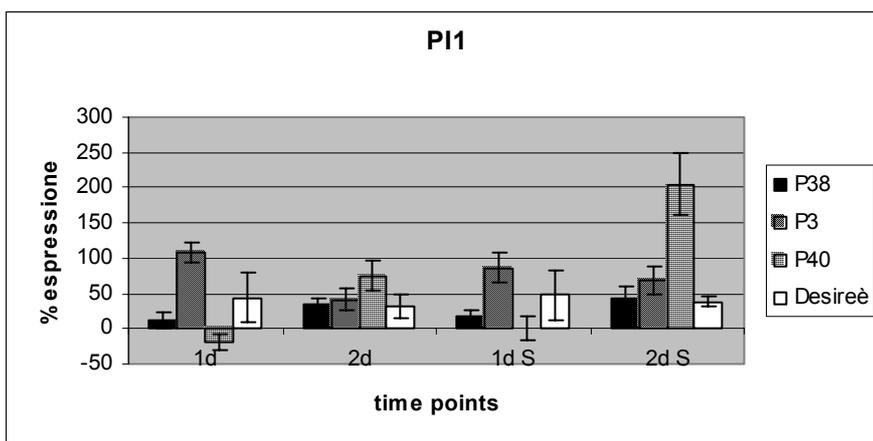


Figura 14b. Percentuali delle variazioni di espressione della famiglia PI1 in foglie di piante di patata cv. Desireè, P40, P38 e P3 ferite. E' stata analizzata la risposta locale 1 (1d) e 2 (2d) giorni dopo il ferimento e quella sistemica 1 (1dS) e 2 (2dS) giorni dopo il ferimento.

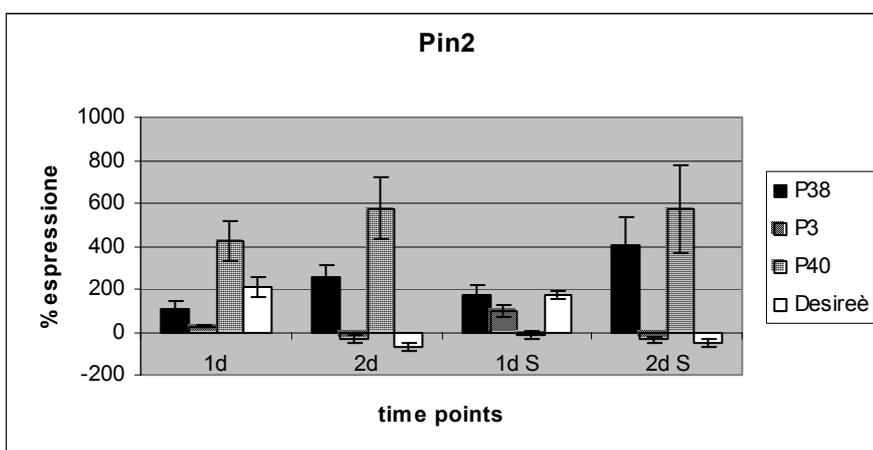


Figura 14c. Percentuali delle variazioni di espressione della famiglia Pin2 in foglie di piante di patata cv. Desireè, P40, P38 e P3 ferite. E' stata analizzata la risposta locale 1 (1d) e 2 (2d) giorni dopo il ferimento e quella sistemica 1 (1dS) e 2 (2dS) giorni dopo il ferimento.

Per quanto riguarda il genotipo P3 si riscontra un aumento locale e sistemico dei trascritti solo nel primo punto temporale per il gruppo A (30% e 10%), la famiglia PI1 (100% e 100%) e la famiglia Pin2 (50% e 100%).

Nel genotipo P40 vi è un aumento locale e sistemico dei quantitativi di mRNA del gruppo A (100% e 100%) e della famiglia PI1 (75% e 200%) solo due giorni dopo il ferimento. La famiglia dei Pin2 è, invece, indotta sia nel primo punto temporale localmente (400%), che nel secondo punto temporale localmente (600%) e sistemicamente (600%).

Nella cv. Desireè, infine, per gli inibitori Kunitz del gruppo A e C (fig. 14d) vi è un incremento locale dei trascritti, 1 giorno dopo il ferimento, del 800% e del 400%, rispettivamente. Le famiglie PI1 e Pin2 sono indotte rispettivamente del 50% e del 200% sia localmente che sistemicamente 1 giorno dopo il ferimento. Per quanto riguarda i geni appartenenti alla famiglia dei PI1 il gene *PPI3A2* (fig. 14e) risulta essere indotto nel primo punto temporale localmente (350%) e sistemicamente (180%), mentre *PPI3B2* (fig. 14f) nel primo punto temporale localmente (100%) e sistemicamente (250%) e nel secondo punto temporale sistemicamente (250%).

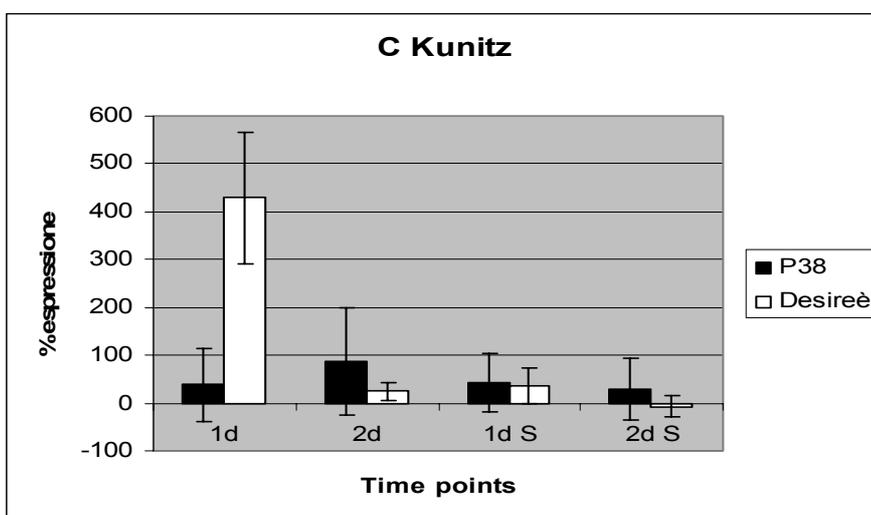


Figura 14d. Percentuali delle variazioni di espressione del gruppo C della famiglia Kunitz in foglie di piante di patata cv. Desireè e P38 ferite. E' stata analizzata la risposta locale 1 (1d) e 2 (2d) giorni dopo il ferimento e quella sistemica 1 (1dS) e 2 (2dS) giorni dopo il ferimento meccanico.

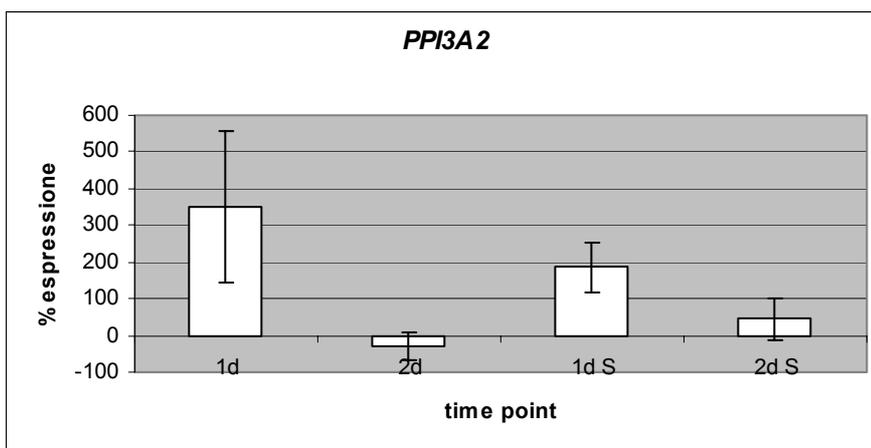


Figura 14e. Percentuali delle variazioni di espressione del gene *PPI3A2* in foglie di piante di patata cv. Desireè ferite. E' stata analizzata la risposta locale 1 (1d) e 2 (2d) giorni dopo il ferimento e quella sistemica 1 (1dS) e 2 (2dS) giorni dopo il ferimento meccanico.

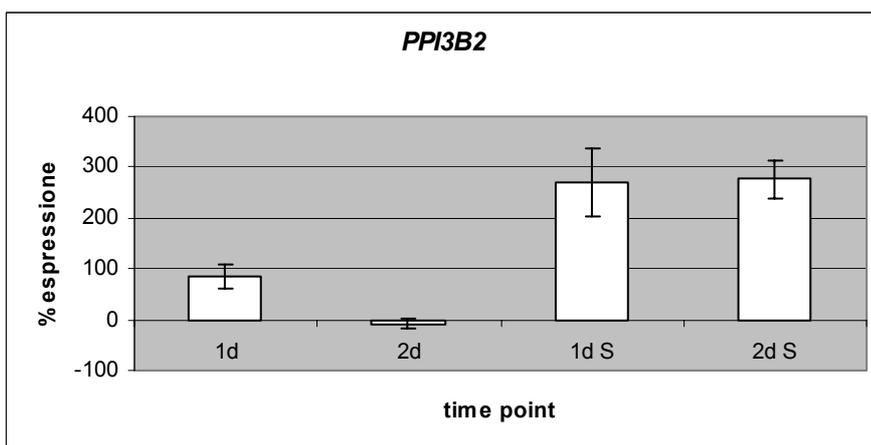
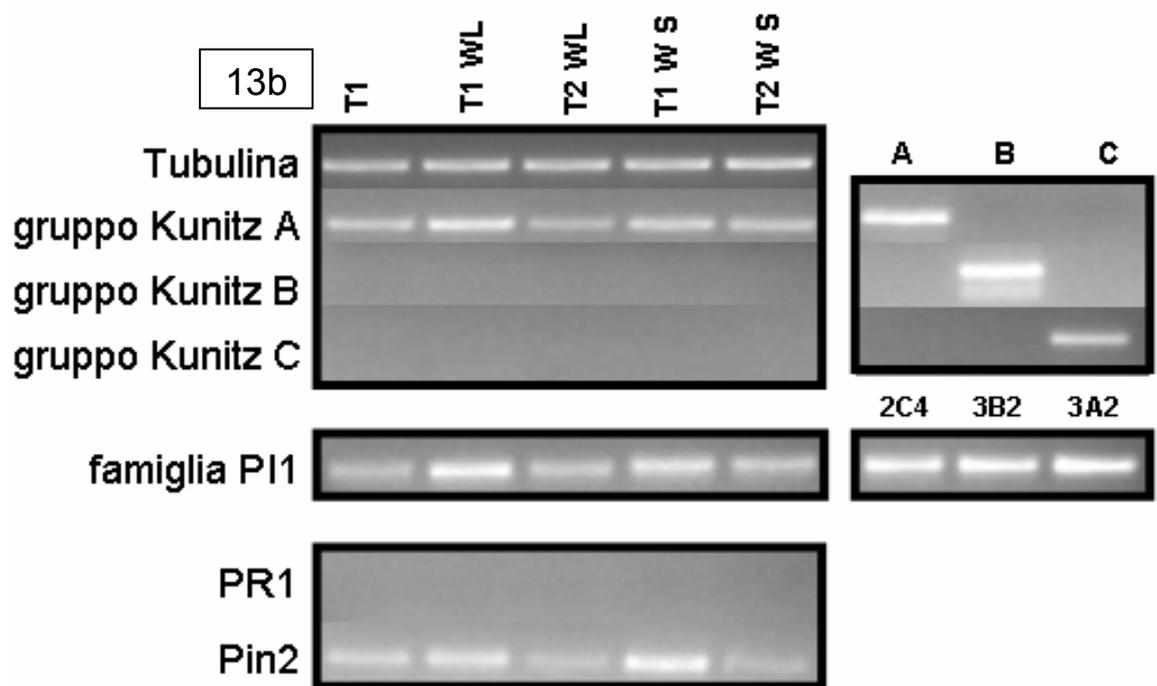
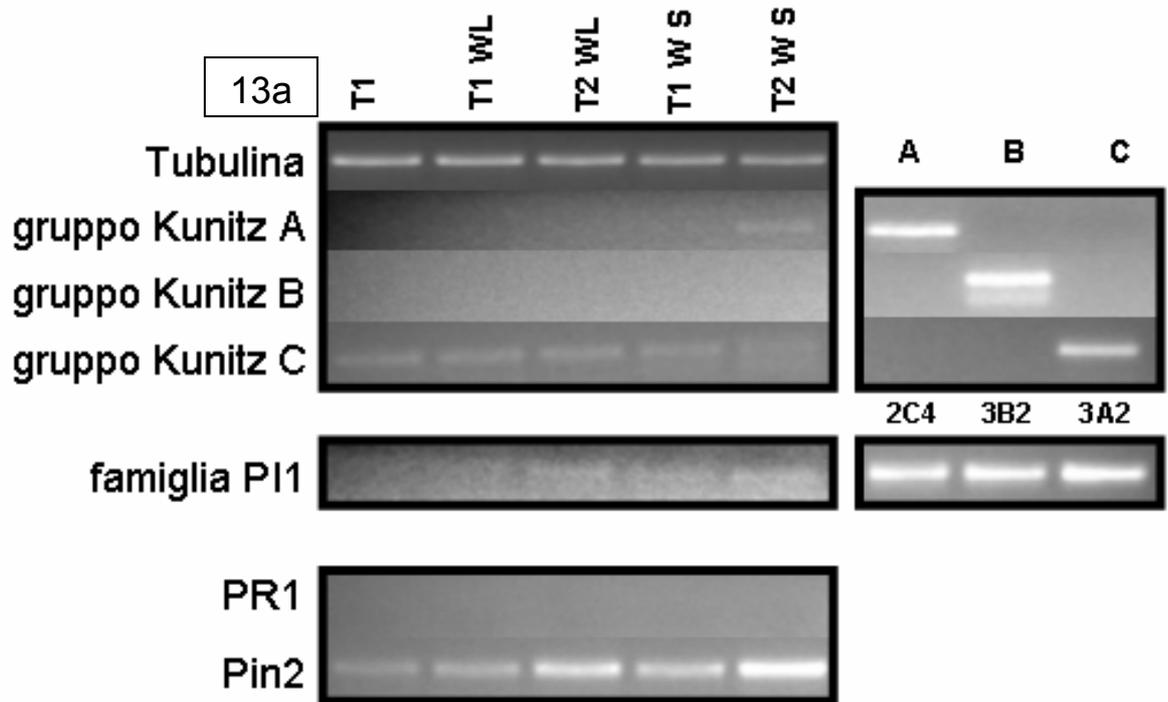


Figura 14f. Percentuali delle variazioni di espressione del gene *PPI3B2* in foglie di piante di patata cv. Desireè ferite. E' stata analizzata la risposta locale 1 (1d) e 2 (2d) giorni dopo il ferimento e quella sistemica 1 (1dS) e 2 (2dS) giorni dopo il ferimento meccanico.

Il gruppo B degli inibitori Kunitz, il gene *PPI2C4* della famiglia P11 e i geni codificanti per le proteine PR1 non sono differenzialmente espressi in alcuno dei genotipi analizzati.



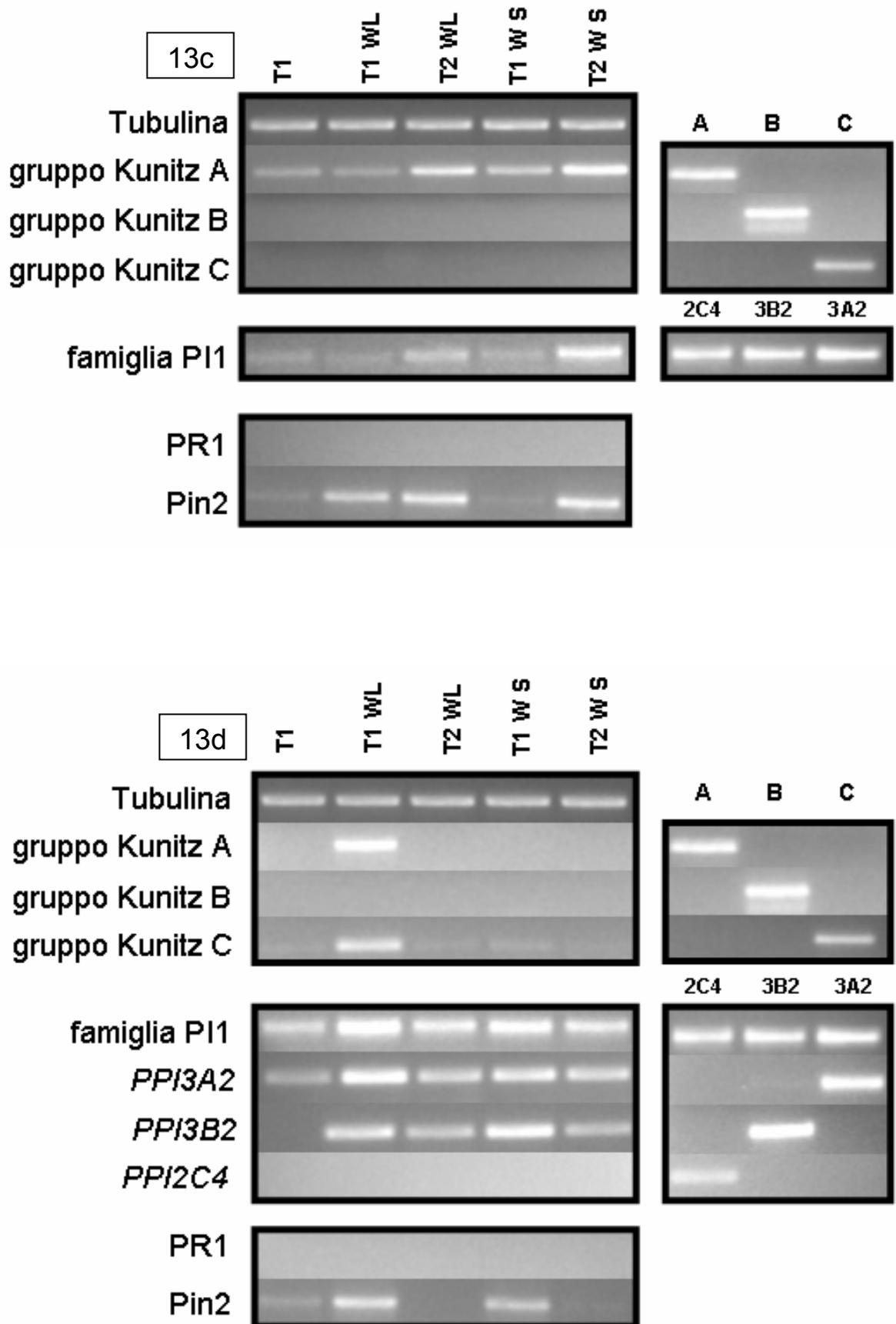


Figura 13a-13d. Analisi mediante RT-PCR semiquantitativa di diversi trascritti bersaglio

in piante di patata ferite, ed analisi mediante PCR della specificità delle reazioni polimerasiche su DNA controllo dei gruppi Kunitz e dei membri della famiglia P11. E' stato analizzato il livello di espressione basale in un controllo non trattato (T1), la risposta locale 1 (T1WL) e 2 (T2WL) giorni dopo il ferimento e quella sistemica 1 (T1WS) e 2 (T2WS) giorni dopo il ferimento in foglie di P38 (13a), P3 (13b), P40 (13c) e *S. tuberosum* cv. Desiree (13d).

6.3 Espressione eterologa del gene *PKI1* in *E. coli*

La predetta proteina chimerica PKI1, sovraespressa nel sistema batterico BL21, è di 23 kDa e contiene una porzione aggiuntiva (2.31 kDa) all'estremità N-terminale costituita da una sequenza His tag e da un sito di taglio per la trombina. L'analisi mediante SDS-PAGE degli estratti proteici ottenuti dal mezzo colturale e dalle frazioni citoplasmatiche solubili ed insolubili ha evidenziato la presenza di una banda differenzialmente espressa (fig. 15), della dimensione attesa, solamente nella frazione insolubile della coltura indotta. Questa frazione, purificata mediante cromatografia d'affinità ed analizzata mediante SDS-PAGE, ha dato un'unica banda di 23 kDa. Questo metodo ha permesso di ottenere per 500 ml di coltura batterica indotta circa 2 mg di proteina purificata in condizioni denaturanti. Era invece impossibile ottenere una stima precisa delle quantità di proteina chimerica purificata in condizioni non denaturanti poiché l'impiego dell'imidazolo (assorbe a 280 nm) durante il procedimento estrattivo disturbava la lettura spettrofotometrica dei campioni proteici.

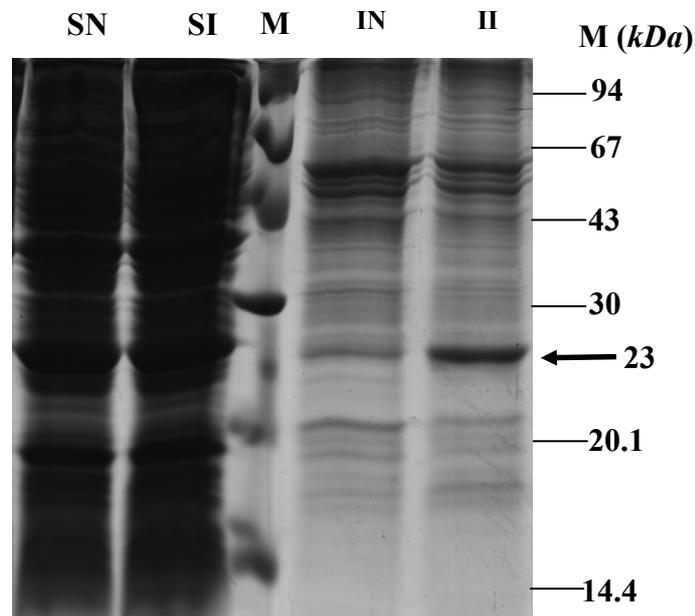


Figura 15: SDS-PAGE della proteina PKI1 overespressa in *E. coli*. Corsia M, standard molecolare; corsia II, proteine estratte dalla frazione insolubile di cellule indotte; corsia IN, proteine estratte dalla frazione insolubile di cellule non indotte; corsia SI, proteine estratte dalla frazione solubile di cellule indotte; corsia SN, proteine estratte dalla frazione solubile di cellule non indotte.

6.4 Inibizione della germinazione delle spore di funghi fitopatogeni

E' stata saggiata l'inibizione della germinazione delle spore dei patogeni *B. cinerea* e *A. alternata* da parte delle frazioni proteiche purificate dal ceppo batterico BL21(DE3)PLYsS di *E. coli* trasformato con il plasmide pET-15b-*PK11*. Un'inibizione del processo di germinazione del 100% e la rottura delle pareti cellulari con conseguente fuoriuscita del succo citoplasmatico è stata osservata quando venivano saggiati 5 e 10 µl dell'estratto proteico purificato dalla frazione citoplasmatica insolubile in condizioni non denaturanti. Risultati simili sono stati ottenuti anche quando si saggiava l'effetto della soluzione tampone (alla concentrazione finale d'impiego) utilizzata durante il processo di purificazione della proteina ricombinante mediante l'His-Bind Purification Kit. Non si è, invece, ottenuta alcuna inibizione delle spore di *B. cinerea* e *A. alternata* né quando si utilizzavano 5 o 10 µl dell'estratto proteico purificato in condizioni denaturanti dalla frazione citoplasmatica insolubile, precedentemente sottoposta a rinaturazione, nè quando si utilizzava il relativo controllo (acqua distillata). Le proteine estratte utilizzando questa seconda metodica si degradavano rapidamente dopo l'estrazione (dati non mostrati).

7. DISCUSSIONE

I complessi meccanismi che regolano l'interazione pianta-patogeno includono la produzione, da parte del patogeno, di enzimi in grado di degradare le pareti cellulari delle piante e, da parte della pianta, di proteine in grado di inibire questi enzimi (Kyung Sik *et al.*, 1997). Tra i vari meccanismi messi in atto dalla pianta in risposta ad una situazione patologica, sia di natura biotica che abiotica, vi è la sintesi delle proteine PR (Pathogenesis-Related proteins) (Bol *et al.*, 1990; Van Loon *et al.*, 1994). La caratterizzazione biologica, strutturale e funzionale di queste proteine ha dimostrato la loro importanza nei processi di difesa biochimica contro diversi microrganismi patogeni (Bowles, 1990; Liu *et al.*, 1994; Garcia *et al.*, 2000). Per alcuni membri delle diverse famiglie di proteine PR è stata dimostrata l'attività inibitoria diretta contro un ampio spettro di patogeni dell'uomo e delle piante (Selitrennikoff, 2001) sia *in vitro* che *in vivo* (utilizzando piante transgeniche superespressanti geni codificanti per proteine PR) (Niderman *et al.*, 1995). Gli inibitori di proteasi di natura proteica (PI), solitamente classificati come PR-6 (Van Loon *et al.*, 1994), hanno massa molecolare variabile tra i 6 ed gli 80 kDa, sono ubiquitari in natura e raggruppati in base alla classe di proteasi (serina, cisteina, metallo o aspartico proteasi) che essi sono in grado di inibire (Ryan, 1990). Nelle piante i PI svolgono diverse funzioni fisiologiche come quelle di proteine di riserva, di regolazione dell'attività proteasica endogena, di modulazione dei processi apoptotici, di stabilizzazione delle proteine e di difesa nei confronti di animali, insetti e microrganismi (Rickauer *et al.*, 1989). L'induzione di questi inibitori a seguito di ferite, infezioni batteriche, applicazioni di elicitori fungini, attacco da parte di insetti e la constatazione della loro potente attività inibitoria sia *in vitro* che *in vivo* contro insetti, nematodi, funghi e virus (Cai *et al.*, 2003; Ussuf, *et al.*, 2001; Valeva and Mosolov, 2004) hanno contribuito alla comprensione del ruolo dei PI nelle risposte di difesa biochimica delle piante. Nonostante siano ben noti i bersagli molecolari sui quali essi agiscono negli insetti e nei nematodi, risulta ancora sconosciuto il meccanismo d'azione mediante il quale essi sono in grado di agire sulla crescita e sullo sviluppo dei funghi (Selitrennikoff, 2001). Tra gli inibitori di proteasi, quelli di maggior interesse sono gli inibitori di serina e cisteina proteasi, in quanto dotati di spiccata attività inibitoria nei confronti di un ampio spettro di patogeni delle piante. Nell'ambito degli inibitori di serina proteasi i potato inhibitor I, inibitori tetramericici costituiti da un miscela eterogenea di iso-inibitori (Melville and Ryan, 1972), e gli inibitori Kunitz, altamente polimorfici e suddivisibili sulla base dell'omologia di sequenza nei gruppi A, B e C (Heibges *et al.*, 2003a), sono codificati da due piccole famiglie geniche i cui prodotti sono particolarmente abbondanti nelle piante di patata. In questo lavoro di tesi sono stati identificati, clonati e caratterizzati geni codificanti per serina PI di patata dotati di notevole attività antifungina ed inibitoria nei confronti delle proteasi prodotte da funghi fitopatogeni. Il clonaggio e l'analisi delle sequenze codificanti tali inibitori è stato utile sia per la successiva caratterizzazione sia per la valutazione del potenziale impiego delle

capacità antimicrobiche di tali geni o dei rispettivi prodotti proteici ottenuti mediante l'espressione eterologa in un sistema batterico.

In esperimenti precedentemente condotti nel nostro laboratorio è stato possibile dimostrare che le proteasi fungine appartengono prevalentemente alla classe delle serina proteasi, della quale fanno parte la tripsina e la chimotripsina, e che le piante usano principalmente inibitori delle serina proteasi nell'interazione con i patogeni. Siamo inoltre riusciti ad identificare, isolare e sequenziare all'interno del complesso sistema di PI vegetali prodotti proteici dotati di un'evidente capacità di bloccare il patogeno ed inibire la malattia (Hermosa *et al.*, 2005). Alla luce di questi risultati, il nostro primo obiettivo è stato quello di sfruttare le sequenze ammininoacidiche DNPLDISFK, EFECKGKQLQWPELIGVP, LFDNILGVVVDMPVV, derivanti dal sequenziamento dei campioni proteici, al fine di individuare e clonare il gene o i geni codificanti per i PI di interesse. L'impiego di diverse coppie di primer per amplificare, da DNA o cDNA di germoglio di patata, i geni bersaglio ha permesso il clonaggio di due geni (*PKI1* e *PKI2*) di 666 bp, codificanti per inibitori Kunitz, e di cinque cDNA (*PPI3B2*, *PPI3A2*, *PPI3A4*, *PPI2C4* e *PPI2C1A*) di circa 300 bp, codificanti per inibitori della famiglia PI1. Dall'analisi Blastx dei geni *PKI1* e *PKI2* è stato possibile evidenziare che entrambe codificano per la sequenza amminoacidica DNPLDIVSFK, altamente conservata tra gli inibitori del gruppo B della famiglia Kunitz, e differente dalla sequenza DNPLDISFK per la presenza di una valina aggiuntiva. L'analisi Blastn del gene *PKI1* ha inoltre mostrato un elevato livello di omologia (99%) con il gene *P1H5* di patata che Heibges *et al.* (2003b) hanno dimostrato essere capace di inibire *in vitro* la crescita del fungo *F. moniliforme*. Per tale motivo, tra i due geni kunitz clonati, abbiamo deciso di studiare *PKI1* in maggior dettaglio. Per quanto riguarda gli inibitori *PPI3B2*, *PPI3A2*, *PPI3A4*, *PPI2C4* e *PPI2C1A*, codificanti per monomeri di 11,98 kDa, l'analisi Blastx delle sequenze dedotte ha evidenziato elevati livelli di omologia di tutti e cinque i cDNA con membri della famiglia dei proteinase inhibitor I (90% di omologia con il gene *POTPIN1B* di patata). Dei cinque cDNA amplificati solamente *PPI3B2* codifica per entrambe le sequenze amminoacidiche EFECKGKQLQWPELIGVP e LFDNILGVVVDMPVV, e per tale motivo abbiamo proseguito con un'ulteriore caratterizzazione di questo gene.

Ishikawa *et al.*, (1994) hanno riportato che il genoma di patata contiene un elevato numero di geni codificanti per membri della famiglia Kunitz, che Heibges *et al.* (2003) hanno stimato essere circa venti. Per quanto riguarda il numero di geni costituenti la famiglia dei Proteinase inhibitor 1, invece, esistono posizioni discordanti. Cleveland *et al.*, (1987), hanno riportato la presenza di sole 6 copie geniche in *S. tuberosum* cv. Russet Burbank, mentre Lee *et al.*, (1986) ne hanno individuate almeno 10 in diverse specie del genere *Lycopersicon*. Per confermare la presenza dei geni *PKI1*, *PPI3B2* e per determinare il numero di copie geniche costituenti la famiglia dei PI1 nel DNA genomico di patata (*S. tuberosum* cv. Desireè) è stata effettuata l'analisi Southern. L'aver ottenuto un'unica banda di ibridizzazione quando il DNA di *S. tuberosum* cv. Desireè è stato digerito con l'enzima *BamH I* ed ibridizzato con la sonda *PKI1* ha indicato la presenza del gene in unica copia nel genoma di patata. Per determinare, invece, il numero di copie di PI1 presenti nel DNA genomico di *S. tuberosum* cv. Desireè, il cDNA del gene *PPI3B2* è stato utilizzato come sonda in condizioni di blanda stringenza. Le nove o più bande di ibridizzazione ottenute hanno provato la presenza nel genoma di patata di una

piccola famiglia genica per i PI1, costituita da almeno nove membri. Per studiare, poi, il profilo di espressione del gene *PKI1* e l'eventuale presenza di un putativo introne è stata effettuata un'analisi Northern. L'unica banda osservata dopo aver ibridato l'mRNA di germoglio sia con la sonda *PKI1* sia con *INT* ha evidenziato l'assenza di un sospetto introne nel gene *PKI1*. Tale dato è poi stato ulteriormente confermato dall'analisi RT-PCR su mRNA estratto da germogli e foglie di patata. Quando invece i cinque mRNA di foglia sono stati ibridizzati con la sonda *INT*, un'unica banda più piccola per dimensioni è stata osservata solo nei quattro campioni precedentemente attaccati da insetti. Inoltre, il livello di espressione era differente nei quattro campioni. Nei campioni corrispondenti all'mRNA estratto a 0 e 5 h dopo l'inoculazione di *B. cinerea* il livello di espressione è stato circa 40 volte più alto di quelli corrispondenti a 20 h dopo l'inoculazione di *B. cinerea* o dopo il ferimento meccanico. Questi risultati hanno suggerito la presenza di uno o più geni omologhi al gene *PKI1* che hanno trascritti maturi inferiori per dimensioni, sono espressi in foglie di patata e sono fortemente indotti dall'attacco di insetti.

Come riportato da Heibges *et al.*, (2003a) nonostante all'interno dei gruppi di omologia A, B e C nei quali può essere suddivisa la famiglia Kunitz, esista una similarità di almeno il 90%, inibitori del gruppo A e B, più simili tra loro che con il gruppo C (A vs. C, 34% di identità; B vs. C, 38% di identità), mostrano in media un'identità del 75%. Per il suddetto motivo non è, quindi, possibile discriminare mediante analisi Northern tra i gruppi di inibitori Kunitz A e B. Per poter risolvere tale problema e studiare il profilo di espressione dei tre gruppi di inibitori Kunitz e dei geni *PPI3A2*, *PPI3B2*, *PPI2C4*, scelti sulla base delle omologie di sequenza in qualità di rappresentanti di tre sottogruppi della famiglia PI1, è stata utilizzata l'RT-PCR semiquantitativa. Tale studio è stato mirato a monitorare l'espressione dei geni Kunitz e PI1 in diversi tessuti di piante non trattate o in radici (risposta locale) e foglie (risposta sistemica) di piante infette con il patogeno terricolo *G. rostochiensis* patotipo *Ro1* o in foglie ferite (risposta locale) e non (risposta sistemica) di diversi genotipi di patata.

L'analisi dei trascritti nei diversi tessuti di patata ha mostrato in quasi tutti i tessuti analizzati, ed in particolare nelle radici, un livello di espressione basale dei gruppi Kunitz più elevato nei tessuti di P40 rispetto alla cv. Desireè. Un più elevato livello di espressione in Desireè rispetto a P40 è invece stato riscontrato per la famiglia PI1, la quale risulta, comunque, espressa a livello costitutivo in tutti i tessuti analizzati dei due genotipi. Per quanto riguarda i geni *PPI3B2*, *PPI3A2*, e *PPI2C4* essi risultano essere espressi solamente nei germogli. Sembra, quindi, probabile, data l'espressione costitutiva dell'intera famiglia PI1 in tutti i tessuti, che alcuni membri di questa famiglia possano avere principalmente una funzione di regolazione dell'attività proteasica endogena, mentre altri solo funzione di riserva o di difesa.

L'espressione degli inibitori Kunitz, PI1, Pin2, marcatori del pathway dell'acido jasmonico (Graham *et al.*, 1985b) e delle proteine PR1, marcatori del pathway dell'acido salicilico (Sobczak *et al.*, 2005) è stata analizzata sia localmente che sistemicamente in piante di patata parassitizzate da *G. rostochiensis*. Tutte le famiglie di inibitori studiati (Kunitz, PI1 e Pin2) ed il gene *PPI3A2*, a differenza delle PR1 e dei geni *PPI3B2* e *PPI2C4*, hanno un ruolo (sia a livello locale che sistemico) nella risposta della pianta all'infezione. Questo risultato rappresenta la prima evidenza che piante di patata attaccate dal nematode *G. rostochiensis* rispondano mediante l'attivazione del "pathway" dell'JA ma non dell'SA, e che

inibitori Kunitz, PI1 e Pin2 siano parte di tale risposta di difesa. Le differenze di espressione riscontrate nella cv. Desireè ed in P40 sono consistite in un aumento di tutti i trascritti sia localmente che sistemicamente, contrariamente a quanto accaduto nel genotipo LB7/4/c-l-7, in cui la trascrizione degli stessi geni è risultata repressa. Tale profilo di espressione ha suggerito che i PI analizzati non avrebbero un ruolo chiave nella resistenza mostrata dal genotipo LB7/4/c-l-7, contenete il transgene *Gro 1-4*, ma ha comunque dimostrato che esistono grandi differenze nella regolazione di geni di PI in diversi genotipi di patata resistenti al nematode (P40 o LB7/4/c-l-7). Un'ulteriore conferma dell'esistenza di una correlazione tra lo spettro di inibitori espressi in pianta a seguito di un evento patologico ed il genotipo analizzato ci è stata fornita dallo studio dei profili di espressione di piante di patata ferite. In questo caso le differenze tra i genotipi P40, P38, P3 e Desireè hanno riguardato principalmente l'intensità d'espressione, lo spettro di inibitori prodotti e la rapidità di induzione dei PI. Per ogni genotipo, inoltre, tutte le famiglie o i gruppi di PI analizzati sono risultati essere indotti a partire dallo stesso punto temporale. In Desireè a differenza di P40, P3 e P38, i geni *PPI3A2* e *PPI3B2*, ma non *PPI2C4* sono indotti dal ferimento meccanico, ed i gruppi A e C sono espressi solo localmente rispetto alla zona del trattamento. Il gene *PPI3B2*, codificante per un PI putativamente attivo nei confronti dei funghi, risulta, quindi, essere espresso costitutivamente nei germogli ed indotto in foglia a seguito di ferimento meccanico, ma non dopo l'attacco del patogeno *G. rostochiensis*. *PPI3A2*, invece, è indotto sia dall'attacco di *G. rostochiensis* che dal ferimento meccanico, diversamente dal gene *PPI2C4* la cui espressione risulta essere inalterata dopo entrambe i trattamenti effettuati. Tali risultati hanno evidenziato differenze di regolazione genica tra membri della stessa famiglia (PI1) dotati di elevati livelli di omologia nucleotidica tra loro.

Il gene *PKI1* è stato, infine, espresso nel sistema di espressione eterologo BL21(DE3)PLYsS di *E. coli* per poter produrre quantità di PI tali da poter essere utilizzate in saggi *in vitro* contro diversi organismi fitopatogeni. L'analisi del profilo proteico effettuata mediante SDS-PAGE ha evidenziato la presenza di una banda differenzialmente espressa solo nell'estratto proteico ottenuto dalla frazione insolubile della coltura indotta. La proteina chimerica (23 kDa) è stata purificata mediante purificazione in condizioni non denaturanti o in condizioni denaturanti. Nel primo caso il protocollo richiedeva l'impiego dell'imidazolo che assorbe a 280 nm (impedendo così la quantizzazione delle proteina purificata) ed inibisce la crescita dei funghi, agendo sulla NO diossigenasi (Helmick *et al.*, 2005). Nel caso in cui, invece, la proteina veniva estratta in condizioni denaturanti era poi necessario rinaturalarla e concentrarla. La proteina PKI1 veniva, però, rapidamente degradata durante questi ultimi due passaggi, dato che non era stato possibile utilizzare PI durante il processo di estrazione, perché avrebbero avuto un effetto inibente nei successivi saggi di attività antifungina. I risultati ottenuti hanno quindi permesso da un lato di caratterizzare singolarmente geni appartenenti a famiglie geniche i cui membri mostrano elevati livelli di omologia tra loro, dall'altro di evidenziare i problemi legati all'espressione di geni codificanti per PI in un sistema di espressione batterico. Tali problemi scaturiscono dalle difficoltà di estrarre i prodotti proteici dai corpi di inclusione senza influenzare negativamente i risultati dei conseguenti saggi di inibizione *in vitro* ed *in vivo* nei confronti di microrganismi fitopatogeni. In conclusione è stato possibile isolare, clonare e caratterizzare i

geni codificanti per i relativi prodotti proteici preventivamente identificati all'interno del complesso sistema di PI perchè dotati di forte attività antifungina. L'identificazione di tali geni permette un loro utilizzo per aumentare transgenicamente, e non, la resistenza di importanti colture nei confronti di diversi organismi fitopatogeni. I geni codificanti per gli inibitori di proteasi possono anche essere utilizzati per la trasformazione di lieviti o altri microrganismi produttori, dai quali i prodotti proteici possano essere estratti in condizioni che mantengano inalterata l'attività antifungina, allo scopo di ottenere quantità a livello industriale di proteine da utilizzare ad esempio come biofitofarmaci o per aumentare l'efficacia e lo spettro d'azione di agenti di biocontrollo contro funghi fitopatogeni in agricoltura.

8. BIBLIOGRAFIA

Anand, A., Tian, Z., Darold, N.T., Bikram, S.G., William, W.B., Muthukrishnan, S. (2002). Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *Journal of experimental botany* 54(384): 1101-1111.

Atkinson, H.J., and Hopher, A. (1996). Nematode control with proteinase inhibitors. Patent US 5,494,813.

Bairoch, A. (1992). Prosite: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Res.* 20: 2013-2018.

Baker, J.E. (1987). Purification of an α -amylase inhibitor from wheat, *Triticum aestivum*, and its interaction with amylases from rice weevil, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Insect biochem.* 18: 107-116.

Belkadir, Y., Subramaniam, R., Dangl, J.L. (2004). Plant disease resistance protein signalling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 391-399.

Birk, Y. (2003). Plant Protease Inhibitors: Significance in Nutrition, Plant Protection, Cancer Prevention, and Genetic Engineering, Springer, New York.

Bol, J.F., Linthorst, H.J.M., Cornelissen, B.J.C. (1990). Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 113-150.

Bowles, D.J. (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 873-907.

Brock, F.M., Forsberg, C.W., Buchanan-Smith, J.G. (1982). Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 561-569.

Cai, D., Thureau, T., Tian, Y., Lange, T., Yeh, K., Jung, C. (2003). Sporamin-mediated resistance to beet cyst nematodes (*Heterodera schachtii* Schm.) is dependent on trypsin inhibitory activity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hairy roots. *Plant Mol. Biol. Apr.*51(6): 839-49.

Campos, R.G., Acosta, J.A.T., Arias, L.J.S., Lim, M.A.G. (1999). A rice cysteine proteinase inhibitor gene induces resistance of transgenic tobacco to Tobacco etch virus and Potato virus Y. *Nat. Biotechnol.* 17 : 1223-1226.

Chand-Goyal, T. and Spotts, R.A. (1997). Biological control of postharvest disease of apple and pear under semi-commercial conditions using three saprophytic yeast. *Biological Control* 10:200-206.

Chen, Z.Y., Brown, R.L., Lax, A.R., Cleveland, T.E., Russin, J.S. (1999). Inhibition of plant pathogenic-fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1320-1324.

Chet, I. and Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 48:37-43.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-9.

Christeller, J.T., Farley, P.C., Ramsay, R.J., Sullivan, P.A. Laing, W.A. (1998). Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. *Eur. J. Biochem.* 254: 160-167.

Cleveland, T.E., Thornburg, R.W., Ryan, C.A. (1987). Molecular characterization of a wound-inducible inhibitor I gene from potato and the processing of its mRNA and protein. *Plant Mol. Biol.* 8: 199-207.

Daly, J.M. (1984). The role of recognition in plant disease. *Annual Review of Phytopatology* 22: 273-307.

De Wit, P.J., Brandwagt, B.F., van den Burg, H.A., Cai, X., van der Hoorn, R.A., de Jong, C.F., van Klooster, J., de Kock, M.J., Kruijt, M., Lindhout, W.H., Luderer, R., Takken, F.L., Westerink, N., Vervoort, J.J., Joosten, M.H. (2002). The molecular basis of co-evolution between *Cladosporium fulvum* and tomato. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81(1-4): 409-412.

Domoney, C., Welham, T., Sidebottom, C., Firmin, J.L. (1995). Multiple

isoforms of *Pisum* trypsin inhibitors result from modification of two primary gene products. *FEBS Lett.* 360: 15-20.

Dropkin, V.H. (1969). Cellular responses of plants to nematode infections. *Annu. Rev. Phytopathol.* 7: 101-122.

Fermi, C., Pernossi, L. (1894) Uber die enzyme. Vergleichende studie. *Z. Hyg.* 18:83

Ffrench-Constant, R.H. and Bowen, D.J. (2000). Novel insecticidal toxin from nematode symbiotic bacteria. *Cell Molecular Life Science* 57: 828-833.

Flor, H.H. (1955). Host-parasite interaction in flax rust – its genetics and other implications. *Phytopathology* 55: 680-685.

Garcia, G., Collada, C., Allona, I., Soto, A., Casado, R., Rodriguez, E., Gomez, L., Aragoncillo, C. (2000). Characterization of an apoplastic basic thaumatin-like protein from recalcitrant chestnut seeds. *Physiologia Plantarum* 110: 172-180.

Glazebrook, J., Rogers, E.E., Ausubel, F.M. (1997). Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defence responses. *Annu. Rev. Genet.* 31: 547-569.

Gomez-Gomez, L., Boller, T. (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trend Plant Sci.* 6: 251-256.

Graham, J.S., Pearce, G., Merryweather, J., Titani, K., Ericsson, L., Ryan, C.A. (1985a). Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves. *J. Biol. Chem.* 260(11): 6555-6560.

Graham, J.S., Pearce, G., Merryweather, J., Titani, K., Ericsson, L.H., Ryan, C.A. (1985b) Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves. II. The cDNA-deduced primary structure of pre-inhibitor II. *J. Biol. Chem.* 260 :6561-6564.

Green, R.T., Ryan, C.A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175: 776-777.

Greenberg, J.T., Vinatzer, B.A. (2003). Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 20-28.

Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent plant defence response. *Plant Cell* 8: 1773-1791.

Heath, M.C. (1991). The role of gene-for-gene interactions in the determination of host species specificity. *Phytopathology* 81: 127-130.

Heath, M.C. (1997). Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal parasites. *G.C. Carroll and P. Tudzynski (Eds.) The Mycota Vol. V. Plant Relationships Part B, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg* pp.257-276.

Heibges, A., Glaczinski, H., Ballvora, A., Salamini, F., Gebhardt, C. (2003a). Structural diversity and organization of three gene families for Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Mol. Genet. Genomics*. 269:526-34.

Heibges, A., Salamini, F., Gebhardt, C. (2003b). Functional comparison of homologous members of three groups of Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Mol. Genet. Genomics*. 269:535-41.

Heitz, T., Geoffrey, P., Stinti, A., Fritig, B., Legrand, M. (1993). cDNA cloning and gene expression analysis of the microbial proteinase inhibitor of tobacco. *J. Biol. Chem.* 268(23): 16987-16992.

Helmick, R.A., Fletcher, A.E., Gardner, A.M., Gessner, C.R., Hvitved, A.N., Gustin, M.C., Gardner, P.R. (2005). Imidazole antibiotics inhibit the nitric oxide dioxygenase function of microbial flavohemoglobin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 1837-1843.

Hermosa, M.R., Turrà, D., Fogliano, V., Monte, E., Lorito, M. (2005). Identification and characterization of novel potato proteinase inhibitors able to inhibit growth and pathogenic effect of *B. cinerea* and *A. alternata*. *In progress*.

Hilder, V.A.; Gatehouse, A.M.R.; Sheerman, S.F.; Barker, R.F., Boulder, D. (1987). A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330: 160-163.

Huynh, Q. K., Borgmeyer, J. R., and Zobel, J. F. (1992). Isolation and characterization of a 22 kDa protein with antifungal properties from maize seeds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182:1-5.

Ishikawa, A., Ohta, S., Matsuoka, K., Hattori, T., and Nakamura, K. (1994). A family of potato genes that encode Kunitz-type proteinase inhibitors: structural comparisons and differential expression. *Plant Cell Physiol.* 35: 303-312.

Irie, K., Hosoyama, H., Takeuchi, T., Iwabuchi, H., Watanabe, H., Abe, M., Arai, S. (1989). Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitory activity against insect gut proteinases. *Plant Mol. Biol.* 30: 149-157.

Jach, G., Gornhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J., Mass, C. (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant Journal* 8: 97-109.

Keen, N.T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics* 24: 447-463.

Kitajima, S., and Sato, F. (1999). Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. *J. Biochem.* 125: 1-8.

Koiwa, H., Bressan, R. A., and Hasegawa, P. M. (1997). Regulation of proteinase inhibitors and plant defense. *Trends Plant Science* 2:379-384.

Kyung Sik, H., Sheng Cheng, W., Darvill, A., Albersheim, P. (1997). Fungal pathogens secrete an inhibitor protein that distinguishes isoforms of plant pathogenesis related endo- β -1,3-glucanases. *The Plant Journal* 11: 169-179.

Kunitz, M. (1945). Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science* 101: 668-669.

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

Laskowski, M. Jr., and Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 49:593-626.

Laskowski, M. Jr., Kato, I., Kohr, W. J., Park, S. J., Tashiro, M., Whatley, H. E. (1987). Positive darwinian selection in evolution of protein inhibitors of serine proteinases. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52:545-53.

Lawrence, P. K., and Koundal, K. R. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 5, no. 1, issue of April 15.

Lee, J.S., Brown, W.E., Graham, J.S., Pearce, G., Fox, E.A. Dreher, T.W., Ahern, K.G., Pearson, G.D., Ryan, C.A. (1986). Molecular characterization and phylogenetic studies of a wound-inducible proteinase inhibitor I gene in *Lycopersicon* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7277-7281.

Lilley, C. J., Urwin, P. E., McPherson, M. J., Atkinson, H. J. (1996). Characterization of intestinally active proteinases of cyst-nematodes. *Parasitology* 113:415-24.

Lin, L., Liu, Y.G., Xu, X., Li, B. (2003). Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:5962–5967.

Liu, D., Kashchandra, G., Raghothama, K. G., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1994). Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 1888-1892.

Liu, G., Chen, N., Kaji, A., Bode, A.M., Ryan, C.A., Dong, Z. (2001). Proteinase inhibitors I and II from potatoes block UVB-induced AP-1 activity by regulating the AP-1 protein compositional patterns in JB6 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(10): 5786-5791.

Lorito, M, Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Tronsmo, A, Woo, S.L., Di Pietro, A. (1993). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.

Lorito, M, Broadway, R.M., Hayes, C.K., Woo, S.L., Noviello, C, Williams, D.L., Harman, G.E. (1994a). Proteinase inhibitors from plant as a novel class of fungicides. *Phytopathology* 4: 525-527.

Lorito, M. (1998). Chitinolytic enzymes and their genes. In *Trichoderma and Gliocladium*. Harman, G.E. and Kubicek, C.P., vol. 2: 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., Del Sorbo, G. and Scala, F. (2002). Molecular approaches for increasing plant resistance to biotic and abiotic stress. *Breeding for ornamentals-classical and molecular approaches*. A. Vainstein ed., Kluwer Academic Publishers.

Matsuoka, K., Matsumoto, S., Hattori, T., Machida, Y., Nakamura, K. (1990). Vacuolar targeting and post-translational processing of the precursor to the sweet potato tuberous root storage protein in heterologous plant cells. *J. Biol. Chem.* 265: 19750-19757.

Melville, J.C., Ryan, C. (1972). Chymotrypsin Inhibitor I from potatoes. *J. Biol. Chem.* 247(11): 3445-3453.

Minami, A. and Fukuda, H. (1995). Transient and specific expression of a cysteine proteinase associated with autolysis during differentiation of *Zinnia* mesophyll cells into tracheary elements. *Plant Cell Physiol.* 36: 1599-1606.

Mur, L.A.J., Xu, R., Casson, S.A., Stoddart, W.M., Routledge, A.P.M., Draper, J. (2004). Characterization of a proteinase inhibitor from *Brachypodium distachyon* suggests the conservation of defence signalling pathways between dicotyledonous plants and grasses. *Mol. Plant Pathol.* 5(4): 267-280.

Narvaez-Vasquez, J., Franceschi, V.R., Ryan, C.A. (1993). Proteinase-inhibitor synthesis in tomato plants: Evidence for extracellular deposition in roots through the secretory pathway. *Planta* 189: 257-266.

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

Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B.F. III, Dangl, J.L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annu. Rev. Genet.* 35: 579-609.

Paal, J., Henselewsky, H., Muth, J., Meksem, K., Menéndez, C.M., Salamini, F., Ballvora, A., Gebhardt, C. (2004). Molecular cloning of the potato *Gro1-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *The plant journal.* 38(2): 285-297.

Peng, J.H., Black, L.L. (1976). Increased proteinase inhibitor activity in response to infection of resistant tomato plant by *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 66: 958-963.

Pernas, M., Lopez-Solanilla, E., Sanchez-Monge, R., Salcedo, G., Rodriguez-Palenzuela, P. (1999). Antifungal activity of a plant cystatin. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 624-627.

Rawlings, N.D., Tolle, D.P., Barrett, A.J. (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* 378: 705-716.

Richardson, M. (1977). The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. *Biochemistry* 16: 159-169.

Rickauer, M., Fournier, J., Esquerré-Tugayé, M.T. (1989). Induction of proteinase inhibitors in tobacco cell suspension culture by elicitors of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Plant Physiol.* 90: 1065-1070.

Ryan, C.A. and Walker-Simmons, M. (1981). Plant proteinases, in *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive treatise* (Vol. 6) (Marcus, A. ed.), pp.321-350, Academic Press.

Ryan, C. A. (1990). Protease inhibitors in plants : genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 425-449.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. N.Y.

Selitrennikoff, C. P. (2001). Antifungal proteins. *Applied and Enviromental Microbiology* 67: 2883-2894.

Sobczak, M., Avrova, A., Jupowicz, J., Phillips, M.S., Ernst, K., Kumar, A. (2005). Characterization of susceptibility and resistance responses to potato cyst nematode (*Globodera* spp.) infection of tomato lines in the absence and presence of the broad-spectrum nematode resistance *Hero* gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 158-168.

Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E., Levine, A. (1999). The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* 11: 431-443.

Strickland, J.A., Orr, G.L., Walsh, T.A. (1995). Inhibition of larval growth by patatin, the lipid acylhydrolase from potato tubers. *Plant physiol.* 109: 667-674.

Taguchi, S., Kojima, S., Kumagai, I., Nakase, T., Miura, K., and Momose, H. (1992). Isolation and characterization of SSI-like protease inhibitors from *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* 99:293-297.

Terras, F. R., Schoofs, H. M. E., Thevissen, K., Osborn, R. W., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A., and Broekaert, W. F. (1993). Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiol.* 103:1311-1319.

Urwin, P.E., Atkinson, H.J., Waller, D.A. and McPherson, M.J. (1995) Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. *Plant Journal* 8: 121-131.

Urwin, P.E., McPherson, M.J., Atkinson, H.J. (1998). Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. *Planta*. Apr 204 (4): 472-9.

Urwin, P.E., Troth, K.M., Zubko, E.I., Atkinson, H.J., (2001). Effective transgenic resistance to *Globodera pallida* in potato field trials. *Molecular Breeding* 8(1): 95-101.

Ussuf, K.K., Laxmi, N.H., Mitra, R. (2001). Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Current Science* 80(7): 847-853.

Valueva, T.A., Mosolov, V.V. (2004). Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry* 69(11): 1305-1309.

Van Loon, L.C. (1985). Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 116: 111-116.

Van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T., Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12: 245-264.

Walsh, T.A., Twichell, W.P. (1991). Two Kunitz-type proteinase inhibitors from potato tubers. *Plant Physiol.* 97: 15-18.

Walton, J. D. (1994). Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* 104:1113-1118.

Williamson, V.M., Hussey, R.S. (1996). Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell* 8: 1735-1745.

Wingate, V.P.M., Ryan C.A. (1991). A novel fruit-expressed Trypsin Inhibitor I gene from a wild species of tomato. *J. Biol. Chem.* 266(9): 5814-5818.

Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, D.T., Wu, R. (1996). Expression of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene, HVA1, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice. *Plant Physiol.* 110: 249-257.

Yeh, K.W., Lin, M.L., Tuan, S.J., Chen, Y.M., Lin, C.Y., Kao, S.S. (1997). Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. *Plant Cell Rep.* 16: 696-699.

Zhu, Q., Maher, E.A., Masoud, A., Dixon, R.A., and Lamb, C.J. (1994). Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase gene in transgenic tobacco. *Biotechnology* 12: 807-812.

PUBBLICAZIONI

Turrà, D., Hermosa, R., Zara, L., Cecere, G., Vinale, F., Marra, R., Abadi, K., Lorito, M. (2003). The use of proteinase inhibitors against plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Pathology*, Sorrento, 85(4 special issue): 301

Turrà D., Cecere, G., Vinale, F., Abadi, K., Senatore, M., Mattiocco, L., Cosenza, C., Pane, F., Lorito, M. (2003). Attività antifungina di inibitori di proteasi di pianta ed espressione in piante geneticamente modificate al fine di controllare la crescita e lo sviluppo di funghi fitopatogeni. *Giornate Scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita*, Università degli Studi di Napoli "Federico II", 6-7 giugno, Napoli, p. 297.

Turrà, D., Hermosa, R., Zara, L., Cecere, G., Vinale, F., Marra, R., Abadi, K., Lorito, M. (2003). Plant proteinase inhibitors to control phytopathogenic fungi. *X Congress Nazionale SIPav*, 1-3 ottobre, Sorrento, p. 53, poster 66.

Hermosa, M.R., Turrà, D., Fogliano, V., Monte, E., Lorito, M. (2005). Identification and characterization of novel potato proteinase inhibitors able to inhibit growth and pathogenic effect of *B. cinerea* and *A. alternata*. *In progress*.

THE USE OF PROTEINASE INHIBITORS AGAINST PLANT-PATHOGENIC FUNGI .

D. Turrà, R. Hermosa, L. Zara, G. Cecere, F. Vinale, R. Marra, K. Abadi, M. Lorito*.

*Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale –Sezione di Patologia Vegetale, Laboratorio di Lotta Biologica, Università di Napoli “Federico II”, Via Università 100, Portici (NA)

Pathological events, either biotic or abiotic, cause the synthesis of PR proteins, such as proteinase inhibitors (PIs), in plants. PIs are able to influence chitin synthesis in fungi, to reduce bug's growth and microbial proteases activity *in vitro*. Since much is already known about PIs activity on insects, we wondered if PI genes overexpression could also increase plant resistance against pathogenic fungi (*Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*). We found considerable proteinase activity only in culture media of fungal pathogens grown on vegetal sources. Using commercial PIs in *in vitro* and leaf bioassays we selected the most active PI family (serine proteinase inhibitor) in controlling both fungi and their proteinases and purified from potato shoots biologically active PIs by affinity chromatography. The purified PIs were sequenced obtaining different aminoacidic sequences corresponding to at least two different PIs. By the use of PCR we amplified a gene of 666 bp, termed *PKI1*, corresponding to the coding region of a serine proteinase inhibitor. BlastP analysis of this sequence showed a 98% of homology with a putative Kunitz-type proteinase inhibitor from *S. tuberosum*. Southern analysis performed at high stringency, with potato DNA and pKI1 probe, indicated that the *PKI1* gene is present in single copy in the *S. tuberosum* cv. Desireè genome. Northern and RT-PCR analysis indicated instead both absence of introns and basal expression of *PKI1* gene also in leaf tissues. *PKI1* gene has now been subcloned into an *Escherichia coli* overexpression vector to test the individual biological activity of its product.

ATTIVITA' ANTIFUNGINA DI INIBITORI DI PROTEASI DI PIANTA ED ESPRESSIONE IN PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE AL FINE DI CONTROLLARE LA CRESCITA E LO SVILUPPO DI FUNGHI FITOPATOGENI.

D. Turrà, R. Hermosa, G. Cecere, F. Vinale, K. Abadi, M. Senatore, L. Mattiocco, C. Cosenza, F. Pane, M. Lorito*.

*Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale –Sezione di Patologia Vegetale, Laboratorio di Lotta Biologica, Università di Napoli “Federico II”, Via Università 100, Portici (NA)

Tra i vari meccanismi messi in atto dalla pianta in risposta ad una situazione patologica, sia di natura biotica che abiotica, vi è la sintesi delle proteine PR. Gli inibitori di proteasi (PIs), solitamente classificati come PR-6, sono spesso correlati con i meccanismi di difesa messi in atto dalle piante, poichè il loro accumulo è stato verificato a seguito di ferite, infezioni batteriche, applicazione di elicitori fungini ed attacco da parte di insetti. Sono in grado di ridurre la crescita e lo sviluppo di insetti e di inibire, *in vitro*, l'attività delle proteasi microbiche purificate nonché di influenzare la sintesi della chitina nei funghi. L'obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di investigare la possibilità di incrementare la resistenza delle piante ai funghi superesprimendo geni codificanti PIs. *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* e *Fusarium oxysporum* sono stati utilizzati come funghi patogeni bersaglio. Piante di tabacco, patata e fagiolo sono state usate come fonti di PIs. Inizialmente l'attività proteasica di differenti filtrati fungini è stata saggiata per selezionare la famiglia di proteasi bersaglio (serina proteasi) negli studi di inibizione. Un set di PIs commerciali è stato, poi, utilizzato *in vitro* ed in saggi su foglia per selezionare la famiglia di PI che mostrava la maggiore capacità di controllare i patogeni fungini e le loro proteasi. Gli estratti proteici di pianta, ottenuti sia da materiale vegetale tal quale che da piante sottoposte a stress abiotici (ferimento meccanico) e biotici (inoculazione con il patogeno), sono stati purificati mediante cromatografia di affinità, sfruttando la capacità dei serino PIs di legare la chimotripsina. Il successivo obiettivo di questo lavoro consisteva nell'ottenimento delle sequenze aminoacidiche dei PIs selezionati sulla base della loro attività antifungina, e nel clonaggio dei rispettivi geni. Quando i due campioni purificati, denominati rispettivamente PI-10 e PI-16, sono stati sequenziati, da questi campioni sono state ottenute diverse sequenze d'interesse tramite PCR, clonaggio e sequenziamento degli ampliconi. E' stato così ottenuto un gene intero di 667 bp (*PK11*), codificante per un PI vegetale dotato di potente attività biologica. L'analisi delle sequenze aminoacidiche dedotte ha rivelato che il prodotto di amplificazione risulta essere altamente omologo ad un gene codificante per un PI. In particolare vi è una chiara omologia con inibitori delle serina proteasi, e cioè con un inibitore di tipo Kunitz di patata. I risultati di questa ricerca hanno permesso di identificare all'interno del complesso sistema di PIs vegetali geni e relativi prodotti dotati di un'evidente capacità di bloccare il patogeno e la malattia.

Donzelli B.G. *et al.* 2001. *Gene* 277:199-208.
Frankowski J. *et al.* 2001. *Archives of Microbiology* 176: 421-426.