

Messa a punto di un metodo per l'individuazione di β -1,3- glucanasi e chitinasi attraverso *Native* PAGE su estratti di piante di *Prunus avium* L. inoculate con *Phytophthora* spp.[§]

Anna De Rogatis^{1*}, Serena Guerri¹, Alberto Santini², Luisa Ghelardini²

Accettato il 20 giugno 2008

Riassunto – Utilizzando la *native* PAGE (*poliacrilamide gel elettroforesi*) è stata rilevata la presenza di glucanasi e chitinasi su estratti di piante di alcuni cloni di ciliegio selvatico *Prunus avium* L. inoculate con differenti specie di *Phytophthora* spp.. Il ciliegio da legno risulta infatti suscettibile a questo patogeno che provoca un indebolimento generale della pianta fino a determinarne la morte. Queste due PR (*pathogenesis related*) *proteins* normalmente sono prodotte dalla pianta come prima risposta di resistenza al patogeno. In particolare la loro attività enzimatica è coinvolta nella degradazione della parete e nella inibizione della crescita ifale del fungo. Generalmente le tecniche impiegate per la loro visualizzazione consistono nella colorazione dell'estratto cellulare grezzo o del gel di poliacrilamide attraverso procedure piuttosto lunghe e dispendiose nella quantità di reagenti e nella manodopera. In questo lavoro è stata invece utilizzata una tecnica diretta di colorazione dell'attività enzimatica su substrato di Carboximetil (cm)-Curdlan RBB (Remazol Brilliant Blu) per la glucanasi e su substrato di Glicol Chitosan per la chitinasi. Il protocollo utilizzato è risultato sensibile nell'individuare la presenza delle due proteine oltre che molto semplice, agevole nelle procedure e poco costoso.

Parole chiave: *resistenza, glucanasi, chitinasi, Prunus avium, Phytophthora spp.*

Abstract – Technique to detect on β -1,3- glucanase and chitinase by *native* PAGE, in *Prunus avium* (L.) clones inoculated with *Phytophthora* spp. β -1,3-glucanase and chitinase activities have been detected by native PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) on leaf extracts of wild cherry (*P. avium*) inoculated with different species of *Phytophthora* spp.. These pathogens are aggressive in wild cherry and they can cause wiltings and death of the plant. These two PR (pathogen-related) proteins are normally produced by plants as first resistance strategy towards pathogens. The PR activities are involved in ifal cell wall degradation and growth. Usually, the techniques to detect them are based on colorimetric assay performed with the total protein extracts or in the polyacrylamide gels, through expensive procedures. In this work a direct colorimetric detection on a Carboximetil (cm)-Curdlan RBB (Remazol Brilliant Blu) and Glycol Chitosan substrate, is used to reveal β -1,3-glucanase and chitinase respectively. This protocol resulted to be very sensible in detecting the two proteins, very simply, reliable and cheap.

Key words: *resistance, glucanase, chitinase, Prunus avium, Phytophthora spp.*

F.D.C.: 165.8 : 176.1 Prunus avium : 172.8 Phytophthora

Introduzione

Il ciliegio selvatico (*Prunus avium* L.) è una latifolia nobile a legname pregiato ed ha un'ampia possibilità di impiego in foresta e nell'arboricoltura da legno in tutta Europa (HAMMATT e GRANT 1997). Il miglioramento genetico di questa specie in Italia è finalizzato all'incremento della qualità e della quantità di produzione del legname e alla selezione di cloni resistenti ai patogeni che più comunemente lo colpiscono (DUCCI *et al.* 1987, DUCCI *et al.* 1988, DUCCI e SANTI 1996 e 1997, BARZANTI *et al.* 2004).

Differenti patogeni possono colpire *P. avium* tra i quali numerose specie appartenenti al genere *Phyto-*

phthora, come *P. cambivora*, *P. cactorum*, *P. drechsleri*, *P. megasperma*, *P. citrophthora*, *P. syringae* (ERWIN e RIBEIRO 1996, VAN WEST *et al.* 2003). Questi patogeni causano il marciume del capillizio radicale, microfillia e filloptosi anticipata, appassimento e mancata crescita dei getti terminali, fino alla morte della pianta. Questa malattia può essere controllata con efficacia solamente attraverso l'uso di materiale con un più alto grado di resistenza al patogeno. E' molto importante quindi selezionare ed ottenere genotipi che posseggano tali requisiti di resistenza.

Nelle piante l'induzione alla resistenza ai patogeni è basata sull'attivazione di geni della resistenza che possono sintetizzare e, quindi, accumulare PR *proteins*,

[§] Ricerca sviluppata nell'ambito del Programma Triennale Ri.Selv.Italia- Sottoprogetto 1.1 Biodiversità e produzione di materiale forestale di propagazione.

¹ C.R.A. - Centro di Ricerca per la Selvicoltura - V.le Santa Margherita 80, 52100 Arezzo, Italy.

² C.N.R. - Istituto per la Protezione delle Pianta.- Via Madonna del Piano 50019 Sesto Fiorentino, Italy

* Autore corrispondente anna.derogatis@entecra.it

ovvero proteine correlate alla patogenesi. Le proteine PR sono indotte sia localmente che sistemicamente (SAR *systemic acquired resistance*) (VAN LOON e VAN STRIEN 1999), sono localizzate nella forma base nei vacuoli e nella forma acidica nello spazio intercellulare. Basandosi sulle loro reazioni sierologiche, sulla massa molecolare e sulla sequenza sono suddivise in 5 gruppi. Quelle analizzate in questa indagine sono le glucanasi (β -1,3-glucanasi - EC 3.2.1.39) che appartengono alle PR 2, classe II intracellulare (in particolare 2c) e III extracellulare, e le chitinasi [1,4-(N-acetil- β -D- glucosaminide) glicanoidrolase, EC 3.2.1.14] che appartengono alle PR 3, gruppo III, classe III (KALIX e BUCHENAUER 1995, VAN LOON e VAN STRIEN *op. cit.*, SELITRENNIKOFF 2001).

Indagini sulle proteine coinvolte nella resistenza a *Phytophthora* spp. sono già state condotte su pomodoro (WOLOSHUK *et al.* 1991, NIEDERMAN *et al.* 1995), peperone (KIM e HWANG 1994 e 1997, EGEA *et al.* 1999), soia (GRAHAM *et al.* 2003) e tabacco (PAN *et al.* 1989 e 1991b, WOLOSHUK *et al. op. cit.*, NIEDERMAN *et al. op. cit.*), confermando la presenza di PR *proteins* in risposta all'attacco del patogeno e identificando tra queste β -1,3-glucanasi (PAN *et al. op. cit.*, KIM e HWANG *op. cit.*, EGEA *et al. op. cit.*) e chitinasi (KIM e HWANG *op. cit.*).

Esistono diverse forme isomorfe degli enzimi che possono svolgere differenti azioni nell'espressione del sintomo e nella resistenza, come nel tabacco e nel peperone (PAN *et al. op. cit.*, WOLOSHUK *et al. op. cit.*, KIM e HWANG *op. cit.*, EGEA *et al. op. cit.*, VAN WEST *et al. op. cit.*).

Le glucanasi e le chitinasi nei meccanismi di difesa delle piante contro i patogeni agiscono in differenti maniere: le β -1,3- glucanasi idrolizzano β -1,3-glucano (laminarina), tra i maggiori componenti della parete cellulare dei funghi, liberano oligosaccaridi induttori che provocano la produzione di composti antifungini, le fitoalessine ed inducono la lignificazione (KAUFFMANN *et al.* 1987, PAN *et al. op. cit.*, KIM e HWANG *op. cit.*, EGEA *et al. op. cit.*, DEBORAH *et al.* 2001, SIBLE *et al.* 2004, GOHEL *et al.* 2006). Le chitinasi degradano la chitina, inibiscono la crescita cellulare dei funghi, svolgono un ruolo anche nello sviluppo dell'embrione, nell'impollinazione e nella riproduzione sessuale (WU e BRADFORD 2003, GOHEL *et al. op. cit.*). L'interazione pianta-patogeno è complessa, i due enzimi agiscono in sinergia così che la loro combinazione inibisce la crescita dei funghi in modo molto più accentuato di

quello che possono fare singolarmente. Inoltre tra le cultivar suscettibili e resistenti vengono indotte reazioni di difesa molto diverse (PAN *et al. op. cit.*, EGEA *et al. op. cit.*).

I protocolli proposti dalla letteratura per verificare la presenza delle due PR *proteins* prevedono l'estrazione delle proteine totali dai tessuti inoculati e descrivono due diverse tecniche di visualizzazione dell'attività enzimatica: un saggio colorimetrico sull'estratto (KAUFFMANN *et al. op. cit.*; LEGRAND *et al.* 1987; KIM e HWANG *op. cit.*) ed una separazione delle proteine totali mediante elettroforesi su gel di acrilamide non denaturante, *native* PAGE, e successiva colorazione del gel di acrilammide (COTE *et al.* 1989, PAN *et al.* 1991a, KALIX e BUCHENAUER *op. cit.*, GOHEL *et al.* 2005). PAN *et al. (op. cit.)*, KIM e HWANG (*op. cit.*), EGEA *et al. (op. cit.)* propongono di utilizzare entrambi i metodi.

Obiettivo di questa ricerca è di mettere a punto un metodo di *screening* semplice, veloce e poco costoso che permetta di rilevare la presenza di queste due proteine PR nel ciliegio correlate ai meccanismi di induzione alla resistenza a *Phytophthora* spp..

Materiali e Metodi

Preparazione del materiale vegetale

I genotipi utilizzati in questa ricerca (Tabella 1), prelevati dalle collezioni clonali, fanno parte di un ampio gruppo di cloni in via di selezione del CRA-Centro di Ricerca per la Selvicoltura di Arezzo (DUCCI *et al. op. cit.*).

Le piantine sono state prodotte *in vitro* mediante micropropagazione secondo il protocollo di BARZANTI *et al. (op. cit.)*. Dopo 4 mesi dall'avvenuta radicazione 4 piantine per ognuno dei 7 cloni di ciliegio sono state sottoposte ad inoculazione con diversi specie di *Phytophthora*: *P. cinnamomi* (Ph 17), *P. citrophthora* (Ph 9), *P. megasperma* var. *megasperma* (Ph 78) e *P. alni* spp. *uniformis* (Ph 68), secondo il protocollo di

Tabella 1 - Provenienze e luoghi di collezione dei cloni analizzati.
Provenience and place of collection of analyzed clones.

Clone	Provenienza	Collezione clonale
AP 06	Alpago - Veneto	Pomaio (AR)
VM 02	Valle Metauro - Marche	ISSA (AR)
VTS 02	Val Tiberina - Toscana	ISSA (AR)
VC 04	Valle del Senio - E.Romagna	Pomaio (AR)
ROTI	Val Tiberina Sett. - Toscana	ISSA (AR)
PUZZOLO	Val Tiberina Sett. - Toscana	ISSA (AR)
TO 08	Racconigi - Piemonte	Pomaio (AR)

Tabella 2 - Presenza e assenza dell'attività enzimatica di β -1,3-glucanasi e chitinasi per tutti i cloni inoculati.
Presence and absence of β -1,3-glucanase and chitinase activities in all clones analyzed.

Clone	Inoculazione	Prelievo	Test.	Ph 9	Glu	Chi	Ph 17	Glu	Chi	Ph 68	Glu	Chi	Ph 78	Glu	Chi
VTS0 02	30:03:04	15 gg		V 9-1	x	x	V 17-1	x	x						
		30 gg		V 9-2	x	x	V 17-2	x	x				V 78-2	x	x
VC 04	5:08:04	15 gg		C 9-1	x	x	C 17-1	x	x				C 78-1	x	x
		30 gg		C 9-2	x	x	C 17-2	-	x				C 78-2	-	x
ROTI	5:08:04	15 gg	RC	R 9-1	x	x	R 17-1	x	x				R 78-1	x	x
		30 gg		R 9-2	x	x	R 17-2	x	-	R 68-2	x	x			
AP 06	6:08:04	15 gg	AC	A 9-1	x	x	A 17-1	-	x				A 78-1	x	x
		30 gg		A 9-2	x	x	A 17-2	x	x				A 78-2	x	-
PUZZOLO TO 08	10:08:04	30 gg	PC	P 9-2	x	x	P 17-2	x	x	P 68-2	-	x	P 78-2	x	x
		30 gg	TC	T 9-2	x	-	T 17-2	x	x				T 78-2	x	x
VM 02	5:08:04	30 gg		M 9-2	x	x	M 17-2	x	x				M 78-2	x	x

Legenda - Ph 9: *P.cinnamomi*, Ph 17: *P.cinnamomi*, Ph 68 *Palni* spp. *uniformis*, Ph 78: *P.megasperma* var. *megasperma*.Test.: testimone, Glu: β -1,3-glucanasi, Chi: chitinasi, x: presenza attività enzimatica, -: assenza attività enzimatica.

BARZANTI *et al.* (*op. cit.*). Due piante per ogni clone sono state inoculate con V8 agar sterile come testimone. Dopo un periodo di 15 gg è stato effettuato un primo prelievo delle piantine per i cloni VTS02, VC04, Roti e AP06 per i quali era disponibile una maggiore quantità di materiale, e dopo 30 gg. dall'inoculazione tutti i 7 cloni sono stati raccolti e posti immediatamente a -20°C. In ciascuna data sono state prelevate anche 1-2 piante testimone non inoculate (Tabella 2).

Attraverso una valutazione visiva della percentuale del danno è stata fatta un'attribuzione a 6 classi d'intensità, da 0 (sana) a 5 (morta), è stato calcolato un indice di suscettibilità per ogni clone ad ogni fitoftora come media dei valori ottenuti.

Estrazione delle proteine totali

Le proteine totali sono state estratte triturando in azoto liquido 1 g totale di tessuto radicale e fogliare, data l'esiguità del materiale da analizzare, ed aggiungendo 1 ml del seguente tampone (KIM 1979): 160 mg di Trizma base, 12 mg di EDTA, 500 mg di PVP, 5 mg di DTT e 1% di 2-mercaptoetanolio in 10 ml di H₂O bidistillata, portato a pH 7.4 con HCl o NaOH; gli estratti grezzi sono stati sottoposti a centrifugazione per 15 min. a 15500 rcf e il sovrantante così ottenuto ha subito nuovamente un passaggio in centrifuga per 1 ora a 15500 rcf. I succhi cellulari estratti sono stati conservati a -20°C.

Il contenuto proteico è stato misurato mediante il metodo BRADFORD (1976) utilizzando direttamente 50 μ l dell'estratto puro.

All'estrazione delle proteine totali, per ogni clone, è seguita l'indagine per la presenza di 1,3- β -glucanasi e chitinasi. Per la colorazione sono stati adottati i protocolli, sotto descritti, che si sono dimostrati più sensibili.

A causa della scarsità del materiale disponibile è stata fatta un'analisi qualitativa e non quantitativa. Non è stata ritenuta indispensabile la purificazione delle due proteine, mantenendo così più bassi i costi delle analisi, perché analizzando l'estratto grezzo le bande risultavano comunque ben visibili.

Saggio colorimetrico per la 1,3- β -glucanasi

I campioni sono stati sottoposti ad una *native* PAGE, elettroforesi in condizioni non denaturanti su gel di poliacrilamide di 0.5 mm di spessore, con aggiunta del substrato CM-Curdlan-RBB (Remazol Brilliant Blu) (Loewe Biochimica).

Il protocollo utilizzato è stato quello di KALIX e BUCHENAUER (*op. cit.*) così modificato: per 15 ml di Resolving gel al 10% sono stati usati 4 ml di H₂O bidistillata, 2 ml di CM-Curdlan-RBB, 4 ml di Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 5 ml di acrilamide 29:1 al 30%, 150 μ l di ammonio persolfato al 10% e dopo aver fatto degassare la soluzione sono stati aggiunti 6 μ l di TEMED.

Per 4 ml di Stacking gel al 5% sono stati usati: 2.7 ml di H₂O bidistillata, 500 μ l di TRIS HCl 1.0 M pH 6.8, 670 μ l di acrilamide 29:1 al 30%, 40 μ l di ammonio persolfato al 10% e dopo aver degassato la soluzione sono stati aggiunti 4 μ l di TEMED.

L'elettroforesi orizzontale è stata effettuata su 2117 Multiphor II (Amersham Pharmacia) facendo correre 20 μ l dell'estratto con 4 μ l di *loading dye* a 4°C, 300 V, 30 mA per 4 ore. Come controllo sono stati caricati 20 μ l di 0.4 mgml⁻¹ di 1,3- β -glucanasi da *Helix pomatia* (0.5-1.5 Umg⁻¹) (Fluka) con 4 μ l di *loading dye*.

Una unità dell'enzima di controllo corrisponde alla quantità di enzima in grado di liberare 1 μ mole di glucosio da laminarina per minuto a pH 5.0 e 37°C.

Il gel è stato poi conservato una notte in H₂O bidistillata a 4°C. Per favorire l'attività enzimatica il gel

è stato immerso in acetato di sodio 0.1 M pH 5.0 ed incubato in stufa a 40°C per 5 ore.

Nell'idrolisi enzimatica regolata dalla glucanasi l'RBB, legato covalentemente al substrato CM Curdlan presente nel gel, viene rilasciato e disperso nel tampone acquoso determinando la presenza nel gel di bande più chiare che testimoniano la presenza della proteina. E' possibile verificare la presenza dell'enzima osservando il gel con luce bianca. Il gel è stato poi fotografato e conservato a 4°C in H₂O bidistillata.

Saggio colorimetrico per la chitinasi

Anche per la chitinasi i campioni sono stati sottoposti ad una *native* PAGE su gel di poliacrilamide, di spessore 0,5 mm, con aggiunta del substrato Glycol Chitosan (Sigma-Aldrich). Il protocollo seguito è stato quello di PAN *et al.* (*op.cit.*) modificato. Per 15 ml di Resolving gel al 15% sono stati usati: 6 ml di Glycol Chitosan 0.04% (w/v) in acetato di Na 0.1 M pH 5.0, 4 ml di Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 5 ml di acrilamide 29:1 al 30%, 150 μ l di ammonio persolfato al 10% e dopo aver fatto degassare la soluzione sono stati aggiunti 6 μ l di TEMED.

Per 4 ml di Stacking gel al 5% sono stati usati: 2.7 ml di H₂O bidistillata, 500 μ l di Tris HCl 1.0 M pH 6.8, 670 μ l di acrilamide 29:1 al 30%, 40 μ l di ammonio persolfato al 10% e dopo aver degassato la soluzione sono stati aggiunti 4 μ l di TEMED.

L'elettroforesi orizzontale è stata effettuata su 2117 Multiphor II (Amersham Pharmacia) facendo correre 20 μ l dell'estratto con 2,5 μ l di *loading dye* a 4°C, 300 V, 30 mA per 3 ore.

Come controllo sono stati caricati 20 μ l di 0.1 mgml⁻¹ di chitinasi da *Streptomyces griseus* (200-600 unitàg⁻¹) (Sigma-Aldrich) con 2.5 μ l di *loading dye*; una unità dell'enzima di controllo è in grado di liberare 1 mg di N-acetyl-D- glucosamine da substrato di chitina per ora a pH 6.0, 25 °C in 2 ore di reazione.

Per permettere l'attività enzimatica il gel è stato immerso in acetato di Na 0.1 M pH 5.0 ed incubato in stufa 40°C per 4 ore, e dopo è stato sottoposto a colorazione mediante una soluzione fresca di 0,01% (w/v) Fluorescent Brightener 28 (Sigma-Aldrich) in Tris-HCl 0.5 M pH 8.9, per 5 min. a temperatura ambiente. Allontanata la soluzione colorante, il gel è stato incubato una notte a 4°C al buio in H₂O bidistillata.

L'attività enzimatica della chitinasi è stata rilevata mediante colorazione fluorescente del gel ed illuminazione ai raggi UV (ultravioletti) che permettono di individuare nel profilo elettroforetico la presenza di

zone più scure prive di fluorescenza: queste zone testimoniano l'avvenuta degradazione del Glicol Chitosan presente nel gel ad opera dell'enzima. La presenza della chitinasi è stata perciò verificata ponendo il gel in un transilluminatore a raggi UV dove è stato fotografato. E' stata fatta una valutazione della intensità di fluorescenza confrontandola con il controllo, costituito da proteina pura a concentrazione nota.

Dato che i profili elettroforetici di entrambe le proteine differiscono nella dimensione e nell'intensità delle bande, è stata messa a punto una suddivisione in 6 classi di intensità assegnando il valore 0 all'assenza di proteina fino al valore 5 della proteina pura.

Risultati

Entrambi gli enzimi sono stati trovati nelle piantine inoculate e la loro presenza si può attribuire alla reazione di difesa verso l'attacco fungino, data l'assenza di queste PR proteine nel testimone, costituito da piantine non inoculate.

Come appare nella Figura 1, la concentrazione dell'estratto non sembra influenzare l'intensità delle bande delle due proteine.

I cloni studiati si mostrano tutti suscettibili alle differenti specie di *Phytophthora* (Tabella 3), con un indice di suscettibilità medio-alto (3-5), eccetto i cloni VTS02, AP06, Puzzolo, TO08 e VM02 che presentano per la *Phytophthora* Ph 78 un indice intorno a 2.

La presenza di glucanasi (Tabella 3, Figura 2, Foto 1) è stata riscontrata in tutti i cloni per tutte le specie di *Phytophthora* inoculati, in tutti i prelievi eseguiti, ad eccezione dei campioni AP06 inoculato con Ph 17, primo prelievo, Puzzolo inoculato con Ph 68 e VC04 inoculati con Ph 17 e Ph 78, secondo prelievo, dove vi è assenza di attività enzimatica, pur presentando tutti una suscettibilità tra 3 e 5.

Il numero totale di bande visualizzate sono state 31 su 37 campioni analizzati.

Intensità 5, massima, è risultata nei campioni R9-1, P17-2 ed M9-2. In quest'ultimo campione è inoltre evidente una banda proteica a basso peso molecolare assente in tutti gli altri campioni. Intensità 1, minima, è stata riscontrata nei campioni C9-2, R17-2, R 68-2, R78-1, A9-2, T9-2 e T78-2. Intensità 4 è risultata nei campioni V9-1, V17-1, A9-1, A17-2, P9-2, P78-2, T17-2; il valore 3 è stato trovato in V9-2, V17-2, C9-1, C17-1, R9-2, A78-1, M17-2, M78-2; intensità 2 in V78-2, C78-1, R17-1, A78-2.

Si può notare che nei cloni VTS02, VC04 e Roti

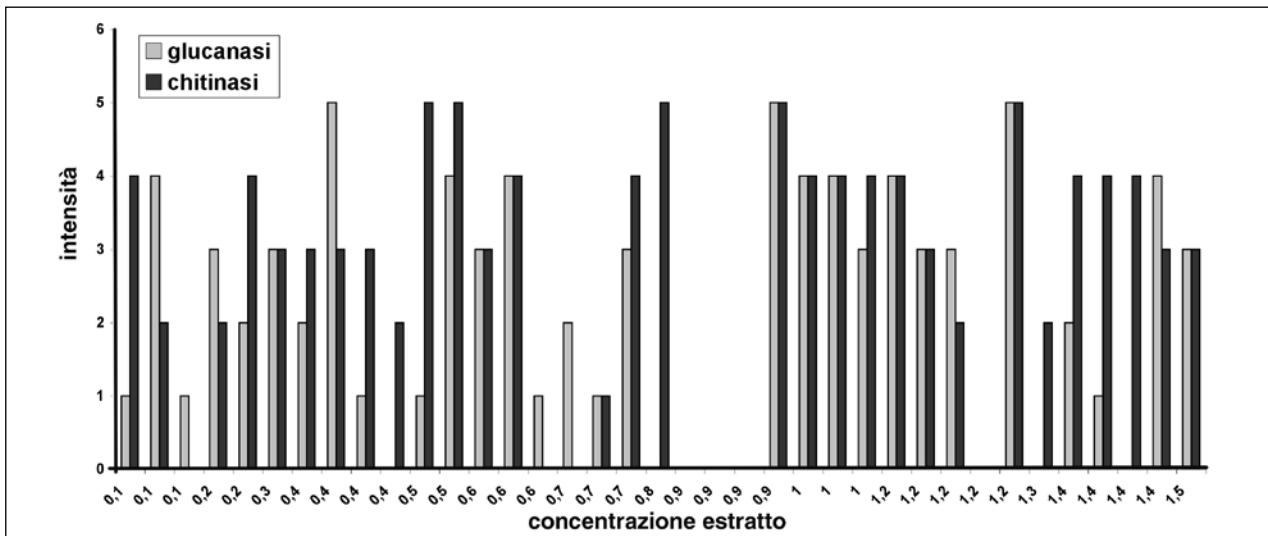


Figura 1 - Andamento dell'intensità in β -1,3-glucanasi e chitinasi rispetto alle concentrazioni di proteine totali estratte nei campioni analizzati.
Intensity proceedings in β -1,3-glucanase and chitinase respect of the total proteins obtained in analysed samples.

Tabella 3 - Intensità attribuite a β -1,3-glucanasi ed a chitinasi nei differenti cloni.
Intensity assigned for β -1,3-glucanase and chitinase activities in different clones.

Clone	Phyto	Indice suscet.	Campione	Conc. mg/ml	Intensità glucanasi	Intensità chitinasi
VTS0 02	Ph 9	4,62	V 9-1	1,2	4	4
			V 9-2	1,2	3	3
	Ph 17	3,35	V 17-1	1	4	4
			V 17-2	1,5	3	3
VC 04	Ph 78	2,16	V 78-2	1,4	2	4
			C 9-1	1,2	3	2
	Ph 9	3,5	C 9-2	1,4	1	4
			C 17-1	0,6	3	3
ROTI	Ph 17	3,37	C 17-2	1,3	0	2
			C 78-1	0,4	2	3
	Ph 78	3	C 78-2	1,4	0	4
			RC	0,9	0	0
AP 06	Ph 9	5	R 9-1	0,4	5	3
			R 9-2	0,2	3	2
	Ph 17	4,4	R 17-1	0,2	2	4
			R 17-2	0	1	0
PUZZOLO	Ph 68	4	R 68-2	0,4	1	3
			R 78-1	0,1	1	4
	Ph 78	3,35	AC	0,9	0	0
			A 9-1	0,1	4	2
TO 08	Ph 9	4,87	A 9-2	0,5	1	5
			A 17-1	0,4	0	2
	Ph 17	4	A 17-2	0,6	4	4
			A 78-1	0,3	3	3
VM 02	Ph 78	2	A 78-2	0,7	2	0
			PC	0,9	0	0
	Ph 9	4,9	P 9-2	0,5	4	5
			P 17-2	0,9	5	5
TO 08	Ph 17	5	P 68-2	0,8	0	5
			P 78-2	1,4	4	3
	Ph 78	2,125	TC	1,2	0	0
			T 9-2	0,6	1	0
VM 02	Ph 9	4,25	T 17-2	1	4	4
			T 78-2	0,7	1	1
	Ph 17	5	M 9-2	1,2	5	5
			M 17-2	0,7	3	4
VM 02	Ph 78	2,59	M 78-2	1	3	4

Legenda - Indice suscet.: indice di suscettibilità (BARZANTI *et al.*, 2004),
Conc.: concentrazione proteica dell'estratto

viene riscontrata una intensità di glucanasi maggiore nel primo prelievo, fatto dopo 15 giorni, mentre nei campioni di AP06, inoculati con Ph 17, l'andamento è inverso.

La presenza di chitinasi (Tabella 3, Figura 3, Foto 2) è stata riscontrata in tutti i cloni per tutti i ceppi di *Phytophthora* inoculati, in tutti i prelievi eseguiti, ad eccezione dei campioni Roti inoculato con Ph 17, secondo prelievo, che tuttavia presenta una suscettibilità elevata (4,4), AP06 inoculato con Ph 78, secondo prelievo, meno suscettibile (2), e TO08 inoculato con Ph 9, secondo prelievo, dove vi è assenza di attività enzimatica, ma alta suscettibilità (4,24). L'analisi elettroforetica dei testimoni ha rivelato assenza di attività di entrambi gli enzimi.

Il numero totale di bande visualizzate sono state 32 su 37 campioni analizzati.

Intensità 5, massima, è stata trovata nei campioni A9-2, P9-2, P17-2, P68-2, M9-2; l'intensità 1, minima, è stata trovata in T78-2 e RC; intensità 4 è stata rilevata in V9-1, V17-1, V78-2, C9-2, C78-2, R17-1, R78-1, A17-2, T17-2, M17-2, M78-2, PC; il valore 3 è in V9-2, V17-2, C17-1, C78-1, R9-1, R68-2, A78-1, P78-2; intensità 2 è stata attribuita a C9-1, C17-2, R9-2, A9-1, A17-1.

Si può osservare che per la chitinasi nei cloni VTS02 e Roti è stata riscontrata una intensità superiore nel primo prelievo, in AP06 l'andamento è inverso, mentre in VC04 l'andamento è vario.

Discussione

Obiiettivo più ampio delle ricerche sviluppate su

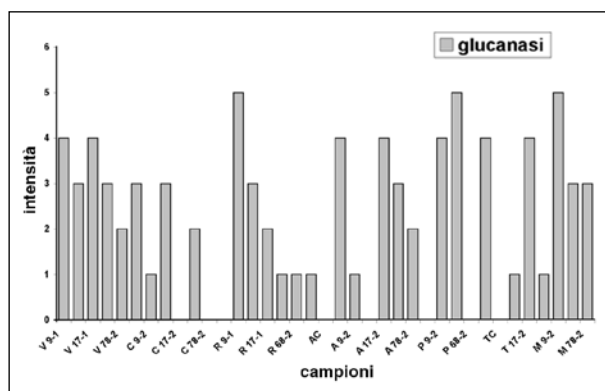


Figura 2 - Andamento dell'intensità nell'attività di β -1,3-glucanasi in tutti i campioni inoculati e nei differenti periodi di prelievo.
Intensity proceedings in β -1,3-glucanase activity in all inoculated samples and in different times of collection.

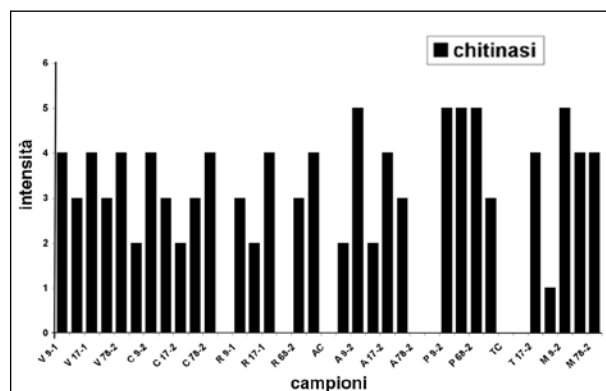


Figura 3 - Andamento dell'intensità nell'attività di chitinasi in tutti i campioni inoculati e nei differenti periodi di prelievo.
Intensity proceedings in chitinase activity in all inoculated samples and in different times of collection.

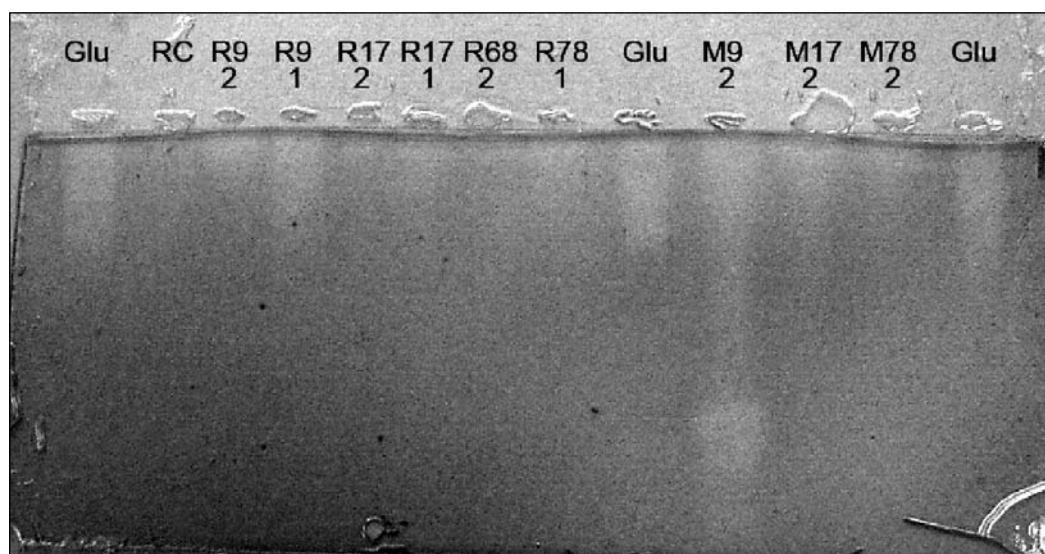


Foto 1 - Profili elettroforetici dell'attività della glucanasi di alcuni campioni nelle differenti fasi di prelievo.
Electrophoretic profiles of β -1,3-glucanase activity in same samples in the different times of collection.

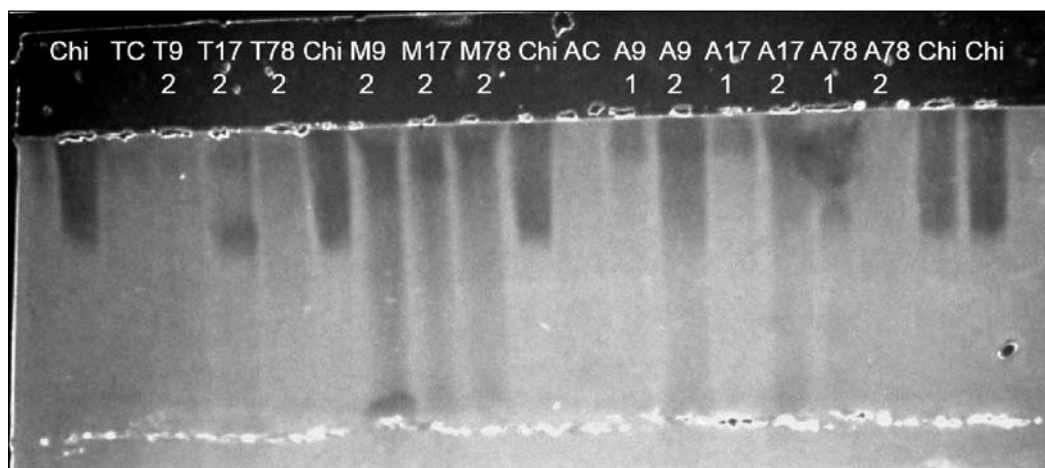


Foto 2 - Profili elettroforetici dell'attività della chitinasi di alcuni campioni nelle differenti fasi di prelievo.
Electrophoretic profiles of chitinase activity in same samples in the different times of collection.

P. avium è di selezionare genotipi con caratteristiche superiori al materiale attualmente diffuso in commercio, da utilizzare nella filiera vivaistica. Devono quindi rispondere anche a requisiti di resistenza ai patogeni più comunemente diffusi. Per tale scopo sono state utilizzate diverse tecniche di indagine, tra le quali la selezione attraverso test precoci *in vitro*, la valutazione della presenza di *PR proteins* normalmente correlate alla resistenza ai patogeni e l'individuazione di geni di resistenza.

Scopo di questo lavoro è stato quello di mettere a punto un metodo di *screening* semplice, veloce ed economico, che permetta di rilevare la presenza di glucanasi e chitinasi, proteine correlate ai meccanismi di induzione alla resistenza a *Phytophthora* spp.

Facendo riferimento ai metodi di analisi presenti in letteratura sono state messe a punto delle modifiche nei protocolli che hanno permesso la rilevazione qualitativa delle due proteine usando *native* PAGE, nonostante l'esiguità dei campioni sui quali è stato possibile lavorare.

La presenza di glucanasi e di chitinasi è stata riscontrata per tutti i ceppi di *Phytophthora* studiati in tutti i cloni di *P. avium* inoculati, mentre queste due proteine sono risultate assenti nelle piante testimone non inoculate.

Le nostre osservazioni mostrano che la produzione di queste proteine è stata indotta dall'infezione di *Phytophthora*, come in altre specie vegetali, dove l'aumento nell'attività di questi due enzimi risulta correlato a patogenesi e svolge un ruolo nella comparsa dei meccanismi di resistenza. Inoltre non è stata osservata una differenza di accumulo delle due proteine tra i genotipi con differenti suscettibilità, ma solamente un aumento di produzione delle proteine dopo l'infezione del patogeno, anche se con tempi diversi.

Queste proteine sono risultate implicate nei meccanismi di difesa contro attacchi fungini in *Capsicum annuum* infettato da *Phytophthora capsici* (KIM e HWANG *op.cit.*), dove l'accumulo della glucanasi era risultato più marcato se si era presentata incompatibilità nell'interazione peperone-*Phytophthora*, mentre non era stata osservata differenza di accumulo di chitinasi tra interazioni compatibili e incompatibili, ma solamente un aumento di quantità dopo l'infezione del fungo. Altri autori hanno dimostrato la relazione tra la glucanasi ed i meccanismi di difesa della pianta alla patogenesi, come PAN *et al. op.cit.* in tabacco inoculato con *Peronospora tabacina* e virus del mosaico, EGEE

et al. op.cit. in due cultivar di peperone infettato da *Phytophthora capsici* ed OELOFSE e DUBERRY (1996) in tabacco inoculato con *Phytophthora nicotianae*. Secondo questi autori resta difficile spiegare la differenza di intensità e più incerto appare il ruolo della chitinasi. In *Brassica napus* la chitinasi risulta molto più elevata nelle cultivar suscettibili (RASMUSSEN *et al.* 1992), nel riso infettato da *Pestalotia palmarum* sono stati osservati accumuli di glucanasi e chitinasi soprattutto nelle interazioni incompatibili. Anche in *Hordeum vulgare* (ANDERSEN *et al.* 1997) e in soia infettata da *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* si nota un aumento di chitinasi più elevato nelle interazioni incompatibili che in quelle compatibili (HABEREDER *et al.* 1989) mentre PUNJA e ZHANG (1993) riportano alti livelli di attività chitinasica in piante infettate sia resistenti che suscettibili.

In questo studio i cloni si mostrano notevolmente suscettibili alle specie di *Phytophthora* studiate ad eccezione alla Ph 78, che risulta meno aggressiva verso la maggioranza dei cloni.

Attraverso i protocolli di analisi messi a punto in questo lavoro non è possibile quantificare le proteine e definire le forme isomorfe presenti, ma dato che i profili elettroforetici differiscono nella dimensione e nell'intensità delle bande si può supporre che questa corrisponda ad una differenza di quantità prodotta.

I profili presentano un andamento dei valori differenti nei due momenti di osservazione. Per la glucanasi l'intensità del primo prelievo, dopo 15 giorni, risulta superiore, eccetto che nel clone AP06. Nel clone VC04 inoculato con Ph 17 e Ph 78 è addirittura assente, quindi il momento di massimo accumulo risulta nelle prime fasi dell'infezione. L'intensità delle bande della chitinasi non segue un andamento costante tra i diversi cloni. Più comunemente mostra un'intensità maggiore nel secondo prelievo. Per questo motivo si potrebbe supporre che l'attività cresce a mano a mano che si manifestano i sintomi della patologia.

Nei cloni con massima suscettibilità, T008 con Ph 9 e Roti con Ph 17 la chitinasi è assente al momento del secondo prelievo, ma presente nel precedente. Si suppone che questi genotipi presentino la massima produzione nelle prime fasi dell'attacco fungino.

Anche EGEE *et al. (op.cit.)* hanno messo in evidenza una notevole differenza di intensità e di velocità di risposta tra le cultivar di peperone. E' stato inoltre osservato da PAN *et al. (op.cit.)* che in tabacco inoculato con *Peronospora tabacina* e virus del mosaico

l'andamento della produzione di proteina è differente nelle piante suscettibili da quelle resistenti ed è condizionato anche dalla fase di insorgenza dei sintomi provocati dal patogeno, anche se non tutte le forme isomorfe degli enzimi sono associate ai meccanismi di resistenza al patogeno, possono comunque essere interpretate come sintomo di stress provocato dall'attacco fungino.

Attraverso questa strada viene rilevata in modo chiaro la produzione delle due proteine in seguito all'infezione fungina. Resta difficile tuttavia individuare con certezza la differenza di suscettibilità/resistenza nei cloni di ciliegio analizzati, se non mettendo a confronto questi risultati con quelli ottenuti attraverso gli *screening* precoci *in vitro*, ampliando il numero di genotipi analizzati e confrontando i risultati con i rilievi dei sintomi della patologia sui cloni delle parcelle comparative in campo ed un successivo studio attraverso marcatori molecolari che permettano di individuare i geni di resistenza (*resistance genes*).

Bibliografia

- ANDERSEN M.D., JENSEN A., ROBERTUS J.D., LEAH R., SKRIVER K., 1997 – *Heterologous expression and characterization of wild-type and mutant forms of a 26 kDa endochitinase from barley (Hordeum vulgare L.)*. Biochemical journal 322: 815-822.
- BARZANTI P., BIANCALANI F., DE ROGATIS A., GHELARDINI L., GUERRI S., SANTINI A., 2004 – *Indagini preliminari per la messa a punto di test precoci di resistenza a Phytophthora sp. in alcuni cloni italiani di ciliegio da legno (Prunus avium L.)*. Forest@ 1 (2): 135-140.
- BRADFORD M.M., 1976 – *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- COTE F., LETARTE J., GRENIER J., TRUDEL J., ASSELIN A., 1989 – *Detection of β -1,3-glucanase activity after native polyacrylamide gel electrophoresis: application to tobacco pathogenesis-related proteins*. Electrophoresis 10 (7): 527-529.
- DEBORAH S.D., PALANISWAMI A., VELAZHAHAN R., 2001 – *Differential induction of chitinase and β -1,3-glucanase in rice in response to inoculation with pathogen (Rhizoctonia solani) and non-pathogen (Pestalotia palmarum)*. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 36.
- DUCCI F., CANCELIANI L., BIONDI S., 1987 – *Prospettive di miglioramento, propagazione e coltivazione del ciliegio da legno (Prunus avium L.)*. Monti e Boschi, XXXVIII 2: 14-19.
- DUCCI F., TOCCI A., VERACINI A., 1988 – *Sintesi del registro del materiale di base di Prunus avium L. in Italia centro settentrionale, Basilicata e Calabria*. Annali dell'Istituto Sperimentale per la Selvicoltura. XIX, Arezzo: 265-303.
- DUCCI F., SANTI F., 1996 – *Cloni naturali di ciliegio selvatico (Prunus avium L.): loro significato in foresta e per l'arboricoltura da legno*. Sherwood 14: 11-16.
- DUCCI F., SANTI F., 1997 – *The distribution of clones in managed and unmanaged populations of wild cherry (Prunus avium L.)*. Canadian Journal of Forest Research 27: 1998-2004.
- EGEA C., DICKINSON M.J., CANDELA M., CANDELA M.E., 1999 – *β -1,3-Glucanase isoenzymes and genes resistant and susceptible pepper (Capsicum annuum) cultivars infected with Phytophthora capsici*. Physiologia plantarum 107: 312-318.
- ERWIN D.C., RIBEIRO O.K., 1996 – *Phytophthora diseases worldwide*. APS Press, St. Paul, Minnesota, 562 p.
- GOHEL V., VYAS P., CHHATPAR H.S., 2005 – *Activity staining method of chitinase on chitin agar plate through polyacrylamide gel electrophoresis*. African Journal of Biotechnology 4 (1): 87-90.
- GOHEL V., SINGH A., VIMAL M., ASHWINI P., CHHATPAR H.S., 2006 – *Bio-prospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms*. African Journal of Biotechnology 5 (2): 54-72.
- GRAHAM M.Y., WEIDNER K., WHEELER K., PELOW M.J., GRAHAM T.L., 2003 – *Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the Phytophthora sojae cell wall glucan elicitor*. Physiological and molecular plant pathology 63: 141-149.
- HABEREDER H., SCHROEDER G., EBEL J., 1989 – *Rapid induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs during fungus infection of soybean (Glycine max L.) roots or elicitor treatment of soybean cell cultures at the onset of phytoalexin synthesis*. Planta 177: 58-65.
- HAMMATT N., GRANT N.J., 1997 – *Micropropagation of mature British wild cherry*. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture 47: 103-110.
- KALIX S., BUCHENAUER H., 1995 – *Direct detection of β -1,3-glucanase in plant extracts by polyacrylamide gel electrophoresis*. Electrophoresis 16: 1016-1018.
- KAUFFMANN S., LEGRAND M., GEOFFROY P., FRITIG B., 1987 – *Biological function of pathogenesis related proteins: four PR proteins of tobacco have β -1,3-glucanase activity*. The EMBO journal 6 (11): 3209-3212.
- KIM Z.S., 1979 – *Inheritance of leucine aminopeptidase and acid phosphatase isozymes in beech (Fagus sylvatica L.)*. Silvae Genetica 28: 2-3.
- KIM Y.J., HWANG B.K., 1994 – *Differential accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of Phytophthora capsici*. Physiological and molecular plant pathology 45: 195-209.
- KIM Y.J., HWANG B.K., 1997 – *Isolation of a basic 34 kiloDalton β -1,3-glucanase with inhibitory activity against Phytophthora capsici from pepper stem*. Physiological and molecular plant pathology 50: 103-115.
- LEGRAND M., KAUFFMANN S., GEOFFROY P., FRITIG B., 1987 – *Biological function of pathogenesis-related proteins are chitinases*. Proceedings of the National Academy of Science USA 84: 6750-6754.

- NIEDERMAN T., GENETTE I., BRUYERE T., GEES R., STINTZI A., LEGRAND M., FRITIG B., MÖSINGER E., 1995 – *Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal*. Plant physiology 108: 17-27.
- OELOFSE D., DUBERRY I.A., 1996 – *Induction of defense responses in cultured tobacco cells by elicitors from Phytophthora nicotianae*. International Journal of Biochemistry and Cell Biology 28: 295-301.
- PAN S.Q., YE X. S., KÜC J., 1989 – *Direct detection of β -1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels*. Analytical biochemistry 182: 136-140.
- PAN S.Q., YE X. S., KÜC J., 1991a – *A technique for detection of chitinase, β -1,3-glucanase, and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing*. Phytopathology 81: 970-974.
- PAN S.Q., YE X. S., KÜC J., 1991b – *Association of β -1,3-glucanase activity and isoform pattern with systematic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with peronospora tabacina or leaf inoculation with tobacco mosaic virus*. Physiological and molecular plant pathology 39: 25-39.
- PUNJA Z.K., ZHANG Y.E., 1993 – *Plant chitinases and their role in resistance to fungal disease*. Journal of nematology 25: 526-540.
- RASMUSSEN U., BOJSEN K., COLLINGE D.B., 1992 – *Cloning and characterization of a pathogen-induced chitinase in Brassica napus*. Plant Molecular Biology 20: 277-287.
- SELITRENNIKOFF C.P., 2001 – *Antifungal proteins*. Applied and environmental microbiology 67 (7): 2883-2894.
- SIBLE G.V., MARIMUTHU T., RABIDRAN R., VELAZHAAN R., 2004 – *Induction of resistance in rice against Xanthomonas oryzae pv. oryzae by foliar application of cow dung water extract*. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 39.
- VAN LOON L.C., VAN STRIEN E.A., 1999 – *The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins*. Physiological and molecular plant pathology 55: 85-97.
- VAN WEST P., APPIAH A.A., GOW N.A.R., 2003 – *Advances in research on oomycete root pathogens*. Physiological and molecular plant pathology 62: 99-113.
- WOLOSHUK C., MEULENHOF J.S., SELA-BUURLAGE M., VAN DE ELZEN P. J. M., CORNELISSEN B.J.C., 1991 – *Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward Phytophthora infestans*. The plant cell 3: 619-628.
- WU C.T., BRADFORD K., 2003 – *Class I Chitinase and β -1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves*. Plant Physiology 133: 263-273.