



Verdenora



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA

Applicazioni di tecnologie
elettrochimicamente avanzate nella
lotta contro parassiti del melo

Relatore della ricerca:

Prof. Giovanni Bernacchia

Marco Zarattini

Risposte della pianta all'attacco di patogeni

Si parla di stress biotici: esercitati da un organismo vivente (batteri, funghi, invertebrati, virus).

L'immobilità non permette un'evasione dagli attacchi dei patogeni.

Non hanno né un sistema immunitario analogo a quello animale né un sistema di difesa circolatorio.

Il primo step nell'infezione è l'ingresso nei tessuti vegetali:

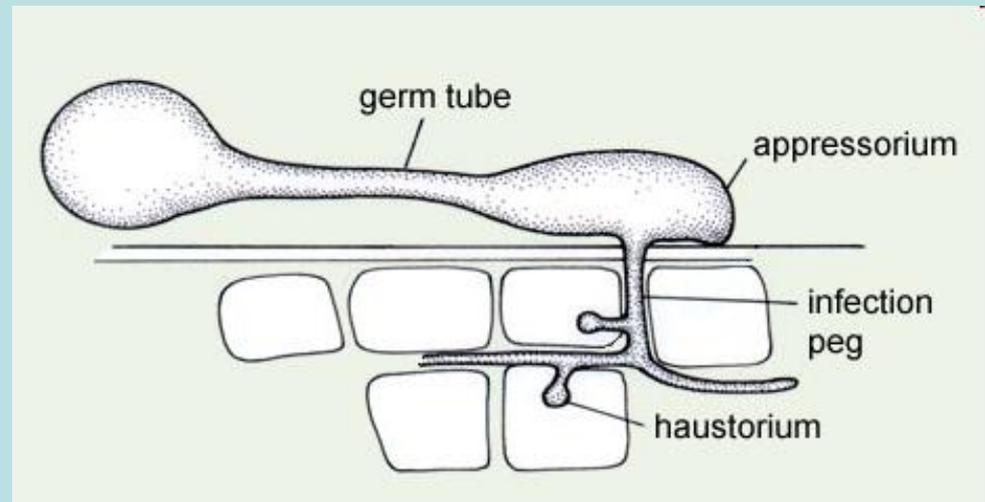
Passivo:

- stomi
- Lenticelle
- Ferite



Attivo:

- azione meccanica (austorio)
- enzimatica

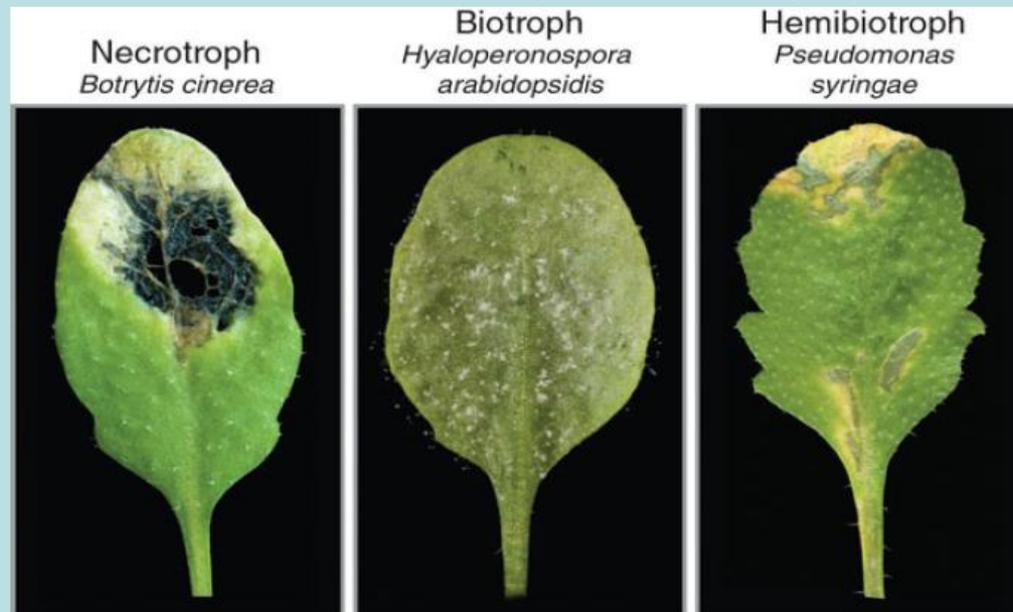


Il secondo step porta allo sfruttamento della pianta da parte del patogeno:

necrotrofico → morte della pianta

biotrofico → rimane in vita

emibiotrofico → inizialmente la pianta vive per poi morire in un secondo tempo.



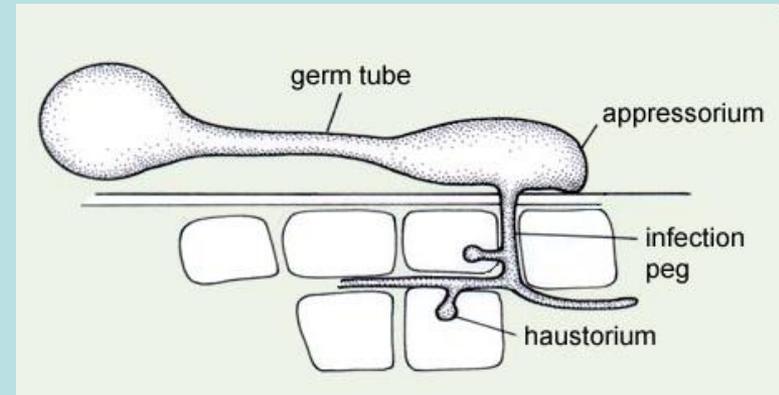
- necrotrofici: letali, producono enzimi idrolitici o tossine specifiche ed hanno ampi spettri d'azione.

Brusone del riso
Pyricularia grisea



Oidio o Mal Bianco (*Uncinula* spp)

- biotrofici: penetrano parzialmente nei tessuti con una struttura specializzata (austorio),



emibiotrofici: *Phytophthora infestans*,
iniziale biotrofia poi necrotrofici

Funghi e oomiceti



Virus: 40 famiglie di virus

Causano clorosi, necrosi, zone di infezione a mosaico e rallentamento della crescita.



Sono di solito Biotrofici

Batteri patogeni per le piante: infestano di solito l'apoplasto causando marcescenza, cancri o essudati.

Vita parassitica negli spazi intercellulari dei vari tessuti dove producono tossine, polisaccaridi ed enzimi idrolitici.

- *Pseudomonas*
- *Xanthomonas*
- *Erwinia*



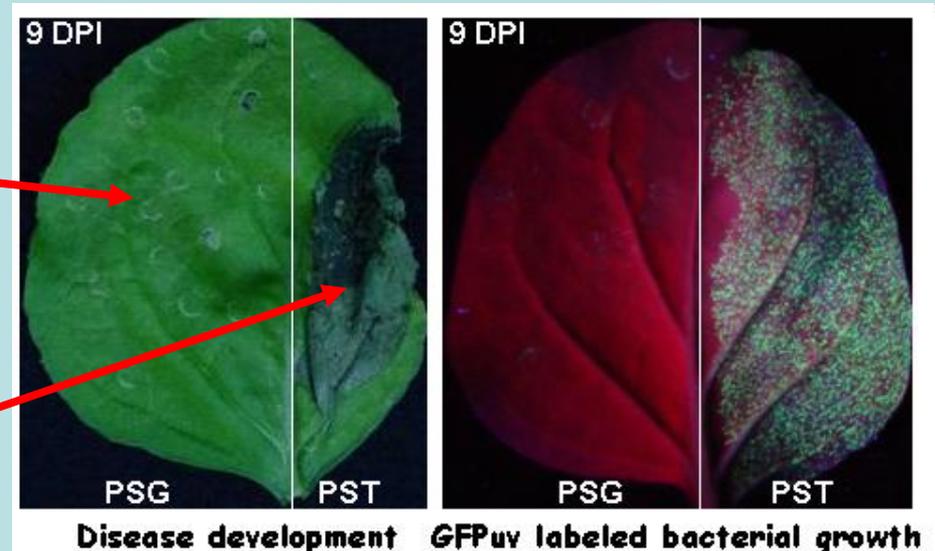
Sistema di difesa delle piante

Solo una piccola percentuale delle infezioni causa una malattia nelle piante:

1- La pianta non è un ospite per quel patogeno (questo è vero per tutte le varietà di una data specie o genere). Presenta delle barriere fisiche o dei composti tossici che limitano l'infezione (resistenza non ospite). Si basa su una incompatibilità genetica. Tale fenomeno è alla base del diverso e limitato spettro d'azione dei vari patogeni.

Pseudomonas syringae pv. *glycinea*

Pseudomonas syringae pv. *tabaci*



2- La pianta è un invece un ospite per il patogeno

L'attacco del patogeno innesca delle risposte difensive nella pianta

Queste difese possono essere inefficaci: malattia



Foglie di pomodoro attaccate da *P. syringae*

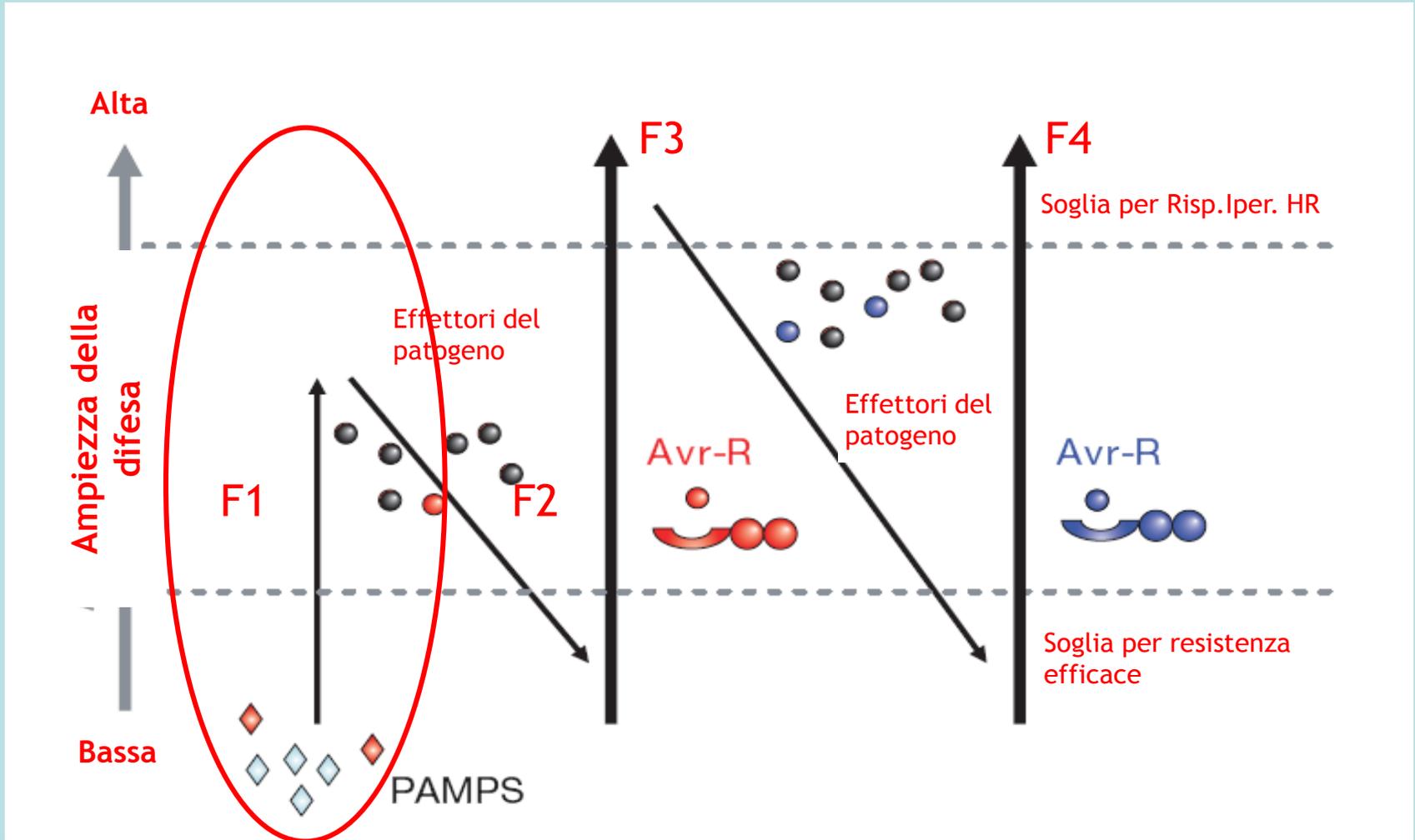
Varietà resistente

Varietà suscettibile

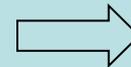


Oppure efficaci: resistenza

Modello di difesa a “Zig-Zag”



F1: riconoscimento dei PAMPS (molecole specifiche dei patogeni) da parte della pianta



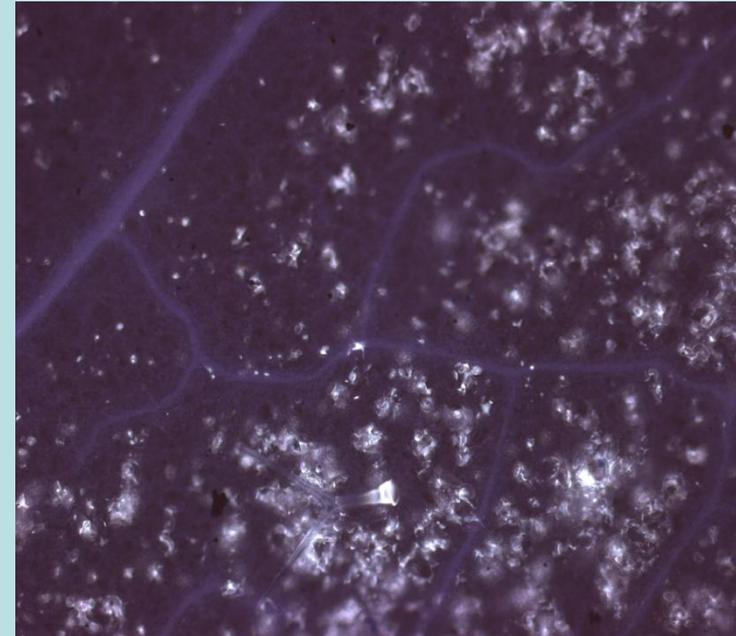
DIFESA
BASALE

La difesa basale prevede generalmente modificazioni:

Strutturali → Fortificazione della parete:

Calloso e lignina

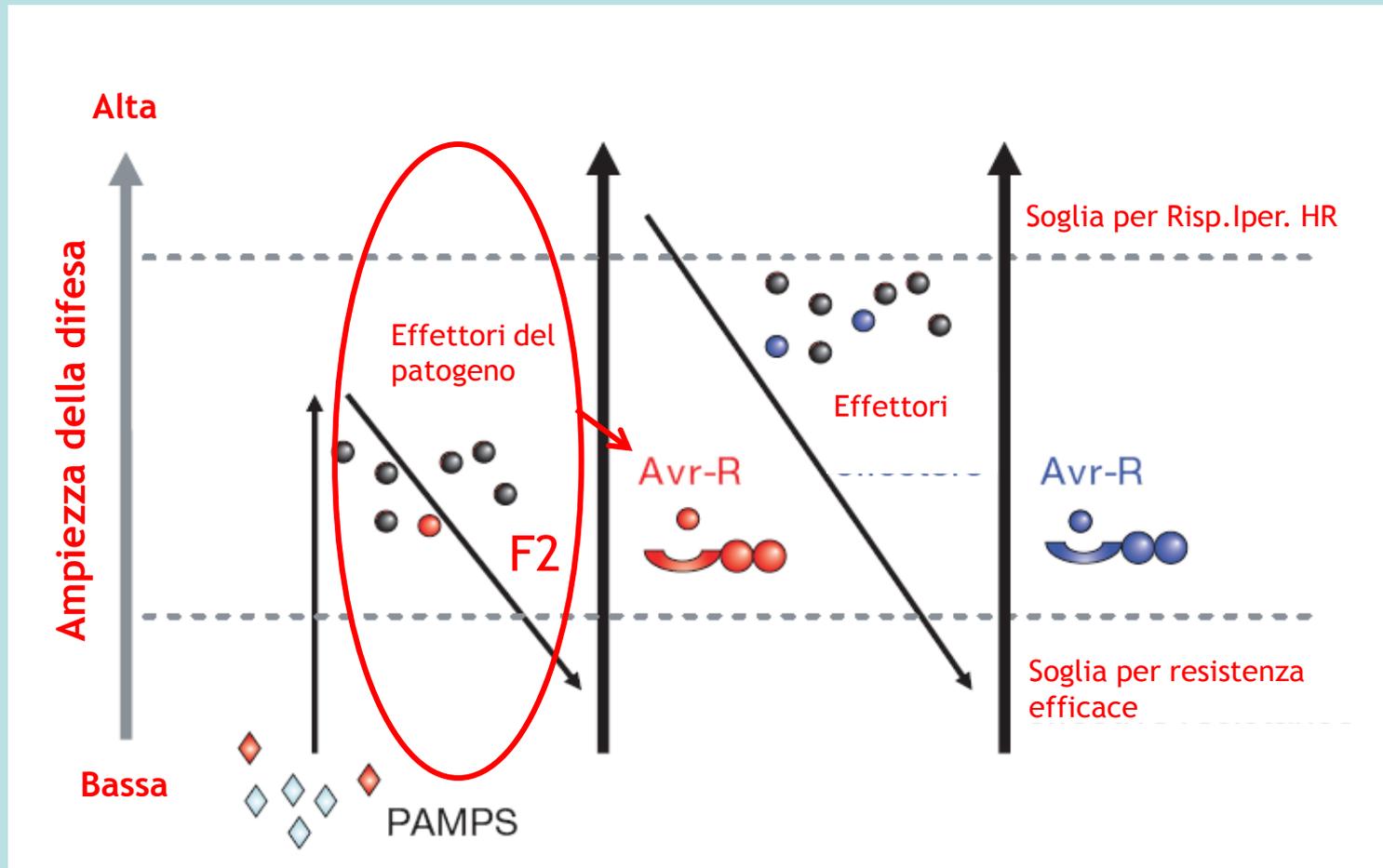
Chimiche → Generazione di
composti
antimicrobici



Autofluorescenza del calloso dopo la colorazione con blu di anilina in foglie di *Arabidopsis* trattate con flagellina

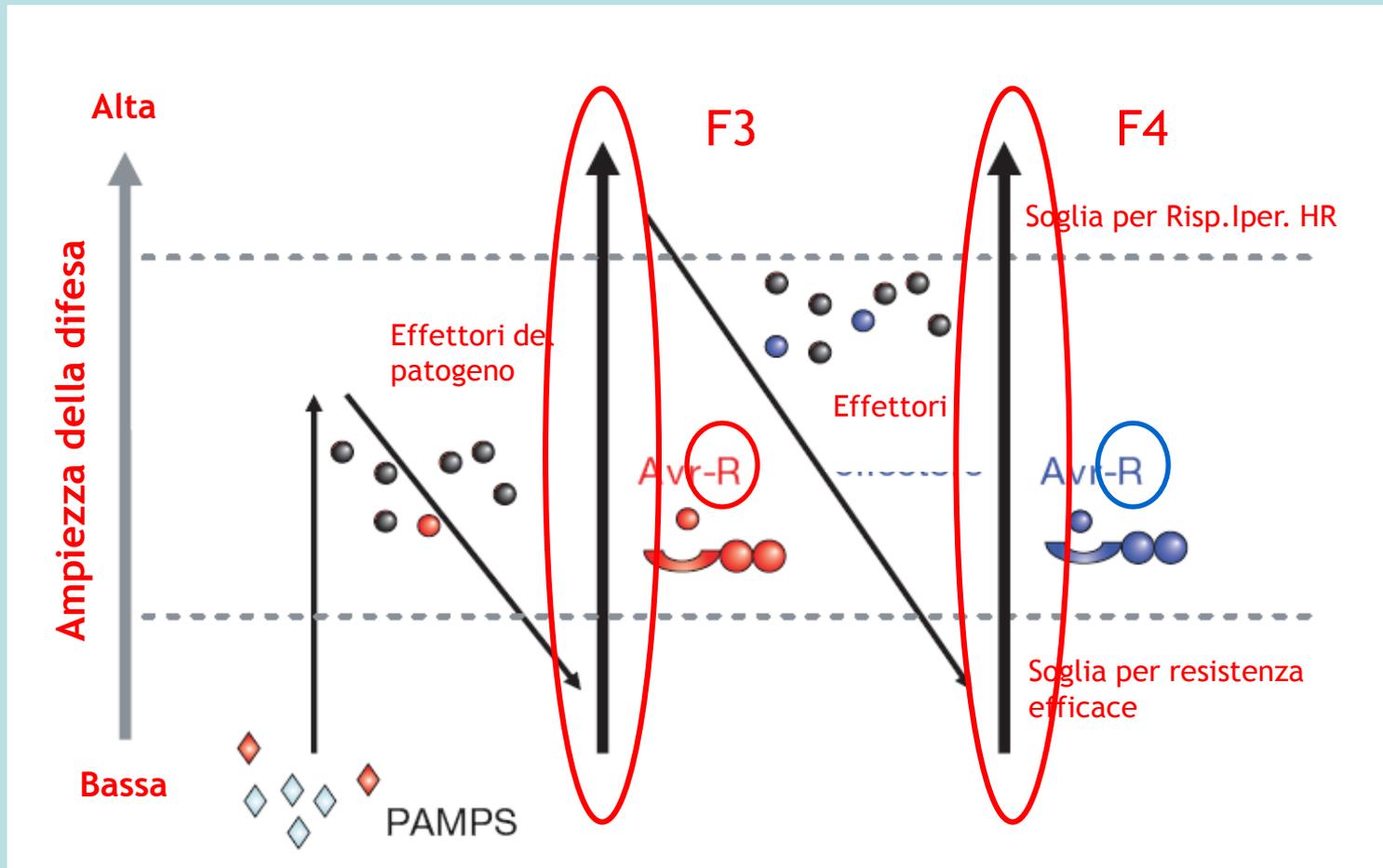
Il tutto garantisce una modesta protezione

F2: Alcuni patogeni riescono a superare questa difesa basale perché producono e iniettano nella cellula vegetale degli 'effettori' che limitano e rallentano la risposta basale. Tali effettori codificati dai geni avr contribuiscono alla virulenza del patogeno e determinano quella che viene chiamata suscettibilità mediata dagli effettori.



F3-F4: le piante resistenti posseggono un particolare recettore (R) capace di riconoscere un particolare tipo di effettore (avr) anche se non necessariamente il riconoscimento tra le due proteine è diretto.

La risposta inducibile è in questo caso veloce e più potente difesa basale e porta spesso alla resistenza al patogeno.

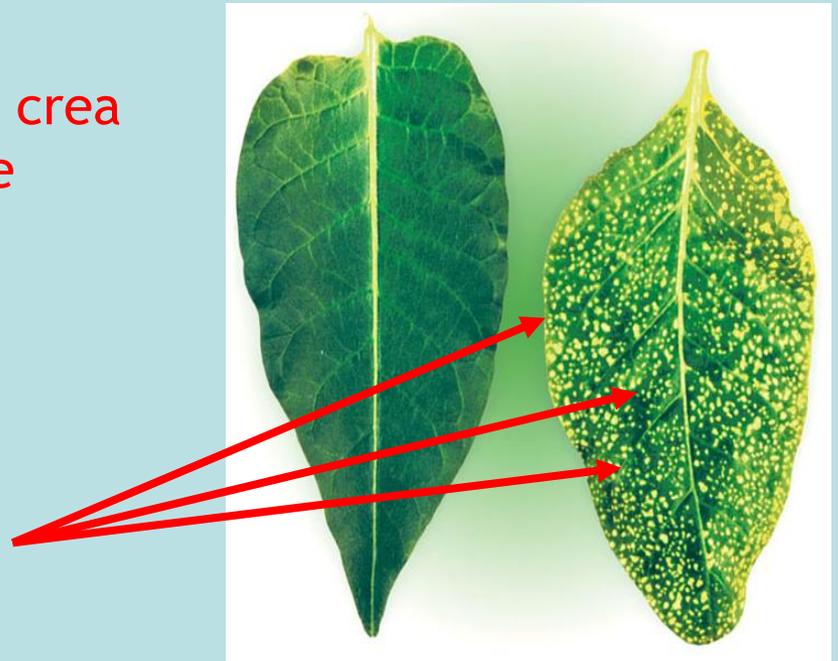


Il secondo livello difensivo si basa sull'induzione di due strategie :

- 1) RISPOSTA DI IPERSENSIBILITÀ (HR): potente risposta rapida
- 2) Sintesi di proteine di resistenza PR

HR: morte cellulare programmata PCD, crea una zona di necrosi nel sito di infezione limitando il diffondersi del patogeno

Siti di ipersensibilità
produzione massiccia di ROS
(specie reattive dell'ossigeno)



Proteine PR, pathogen related: gruppo eterogeneo di proteine, attivate nella fase F3 e F4, implicate nella difesa contro il patogeno e nell'amplificazione della risposta difensiva della pianta.

Attività note:

Inibitori di proteasi

Defensine antimicrobiche e antifungine

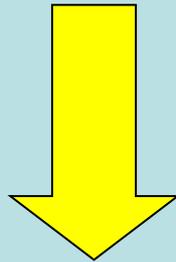
Enzimi degradativi delle pareti fungine e batteriche

Table 1
Main properties of classified families of PR proteins

Family	Type member	Typical size (kDa)	Properties	Proposed microbial
PR-1	Tobacco PR-1a	15	Antifungal	Unknown
PR-2	Tobacco PR-2	30	β -1,3-Glucanase	β -1,3-Glucan
PR-3	Tobacco P, Q	25–30	Chitinase (class I,II, IV,V,VI,VI)	Chitin
PR-4	Tobacco 'R'	15–20	Chitinase class I,II	Chitin
PR-5	Tobacco S	25	Thaumatococcus-like	Membrane
PR-6	Tomato Inhibitor I	8	Proteinase-inhibitor	– ^a
PR-7	Tomato P ₆₉	75	Endoproteinase	– ^a
PR-8	Cucumber chitinase	28	Chitinase class III	Chitin
PR-9	Tobacco 'lignin-forming peroxidase'	35	Peroxidase	– ^a
PR-10	Parsley 'PR1'	17	'Ribonuclease-like'	– ^a
PR-11	Tobacco 'class V' chitinase	40	Chitinase class I	Chitin
PR-12	Radish Rs-AFP3	5	Defensin	Membrane
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	5	Thionin	Membrane
PR-14	Barley LTP4	9	Lipid-transfer protein	Membrane
PR-15	Barley OxOa (germin)	20	Oxalate oxidase	– ^a
PR-16	Barley OxOLP	20	'Oxalate oxidase-like'	– ^a
PR-17	Tobacco PRp27	27	Unknown	– ^a

Attualmente l'uomo in campo agricolo, per contrastare gli attacchi dei patogeni, interviene mediante mezzi chimici i quali presentano alcune problematiche come ad esempio:

- Elevata persistenza nell'ambiente;
- Alterazione della catena alimentare



Un' alternativa potrebbe essere l'utilizzo di soluzioni Elettrochimicamente attivate:

- 1) Effetto antimicrobico testato verso vari patogeni sia in vitro sia in campo
- 2) Non lasciano residui tossici

La soluzione elettrochimicamente attivata è efficace nel trattamento di patologie vegetali: *Nectria galligena*

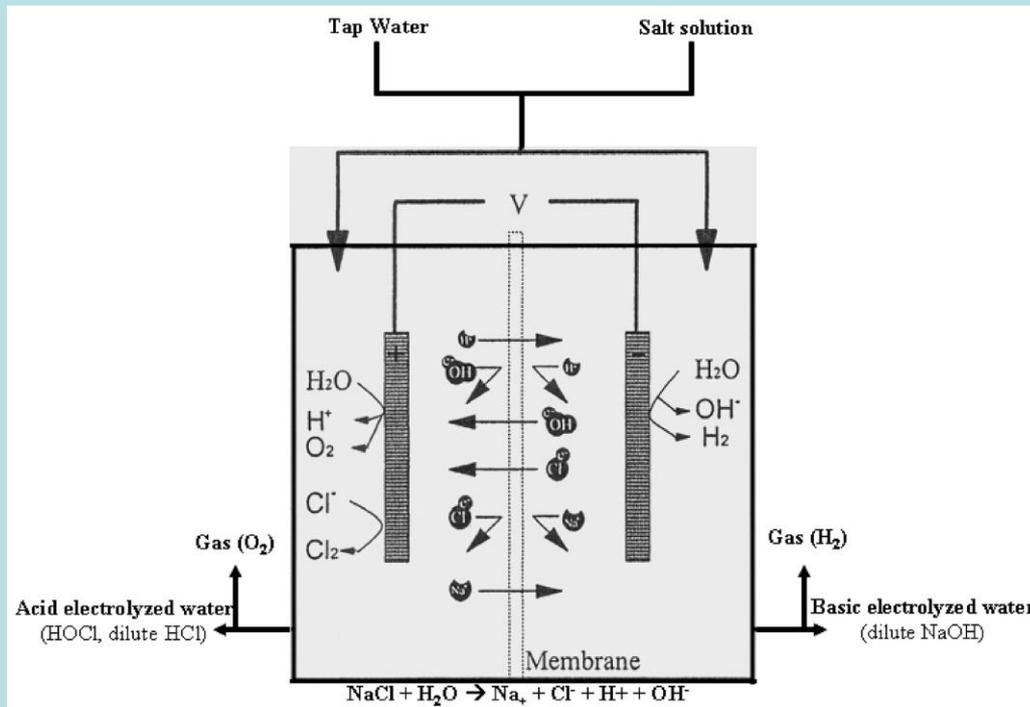


Dopo 1 mese



SEA

(soluzione elettrochimicamente attivata)

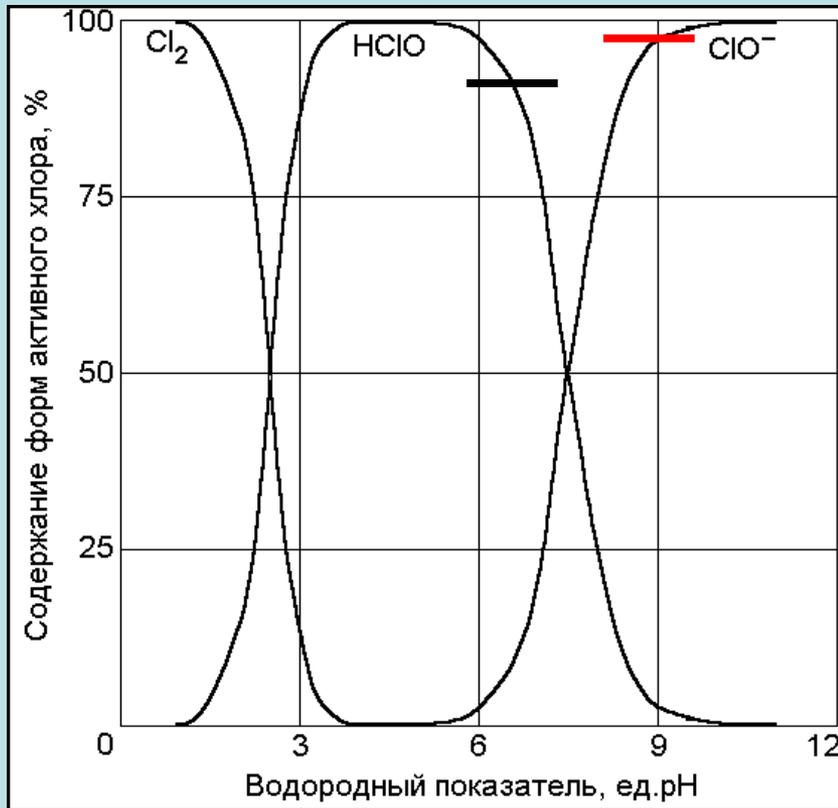


- Soluzione KCl;
- 10' di elettrolisi;



Si ottengono acido ipocloroso **HClO** e ione ipoclorito **ClO⁻**

Contenuto di cloro attivo nell'acqua elettrolizzata



Il contenuto delle forme di cloro attivo dipende dal pH della soluzione :

pH 6,5 \rightarrow \uparrow HClO

pH 9 \rightarrow \uparrow ClO^-

Sperimentalmente testeremo soluzioni a pH 6,5 e pH 9

Scopo della ricerca

Valutare se applicazioni dirette della soluzione SEA sulle piante causano variazioni a livello molecolare di alcuni geni chiave (PR Proteins) implicati nella resistenza ai patogeni e valutare quale è il valore di pH più efficace.

Le prove di laboratorio sono state effettuate su una specie modello, (*Nicotiana tabacum*) per la quale sono noti sia i meccanismi di resistenza sia le sequenze di parecchi geni implicati nelle risposte ai patogeni; e su una specie di interesse agronomico (Melo, var. Fuji).

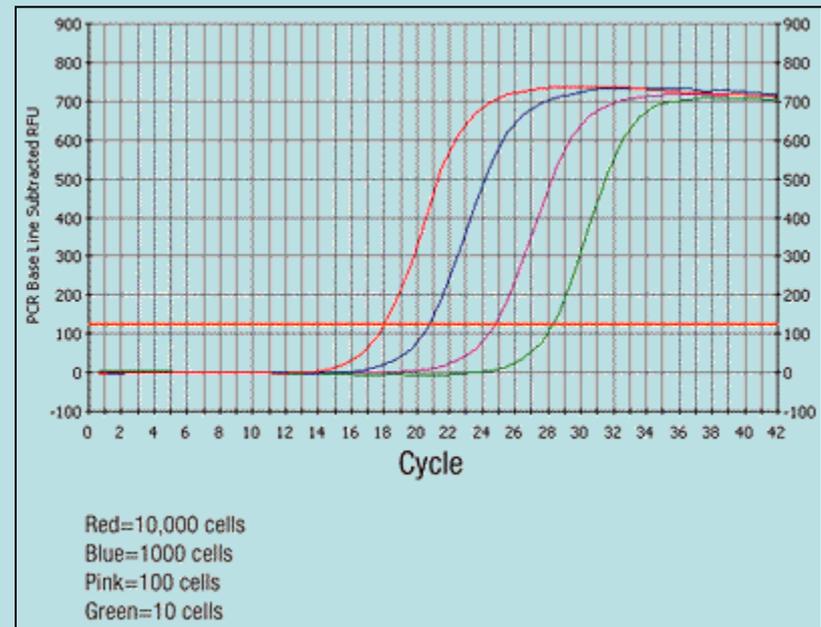


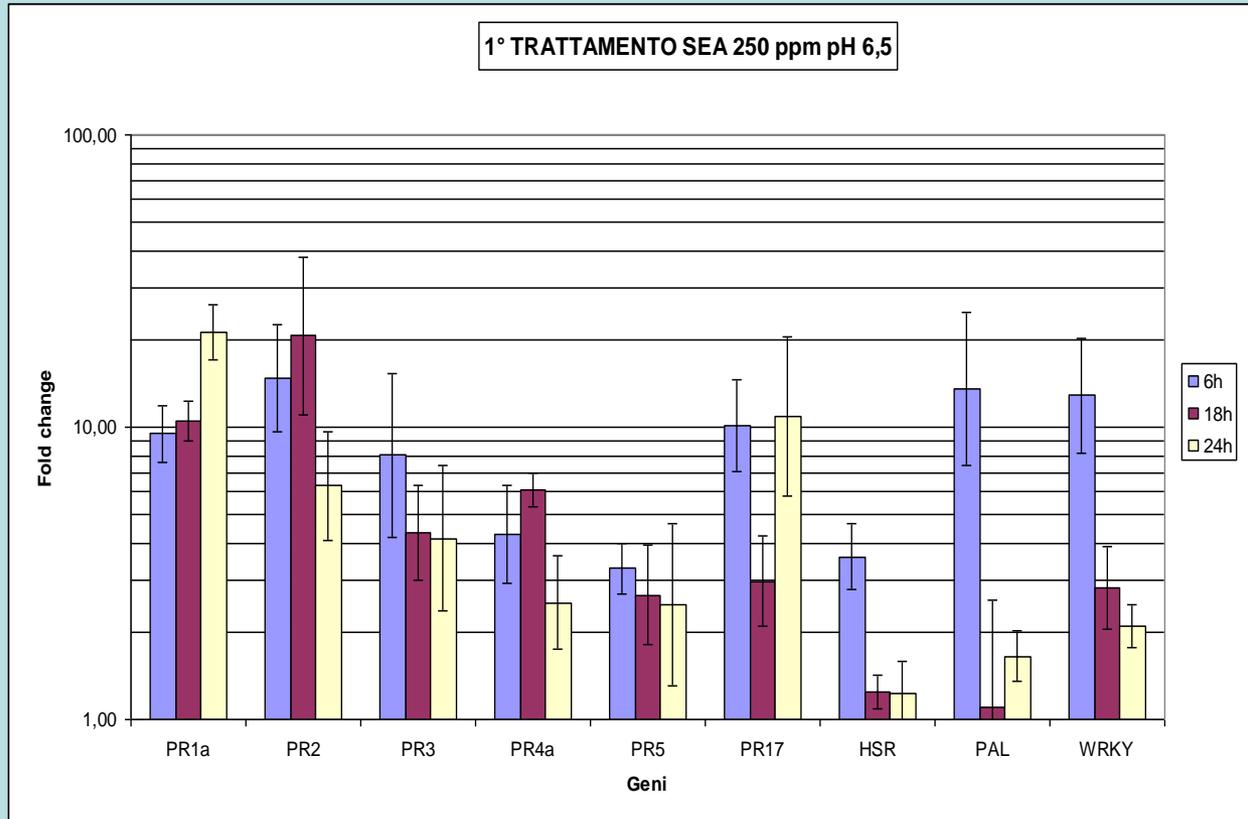
Piano sperimentale:

- 1) Piante di tabacco (~2 mesi) sono trattate con SEA 250 ppm a pH 6.5 e pH 9 e con i relativi controlli (soluzione di KCl non elettrolizzata)
- 2) Prelievi di foglie a tempi successivi (6 - 96 ore)
- 3) Estrazione RNA, retrotrascrizione e amplificazione con *real time* PCR usando *primer* per geni implicati nelle risposte difensive ai patogeni
- 4) Analisi dei livelli di espressione confrontando i trattati con i controlli

I valori ottenuti sono Fold change:

sovraespressione genica del campione trattato (SEA) rispetto al controllo (KCl)



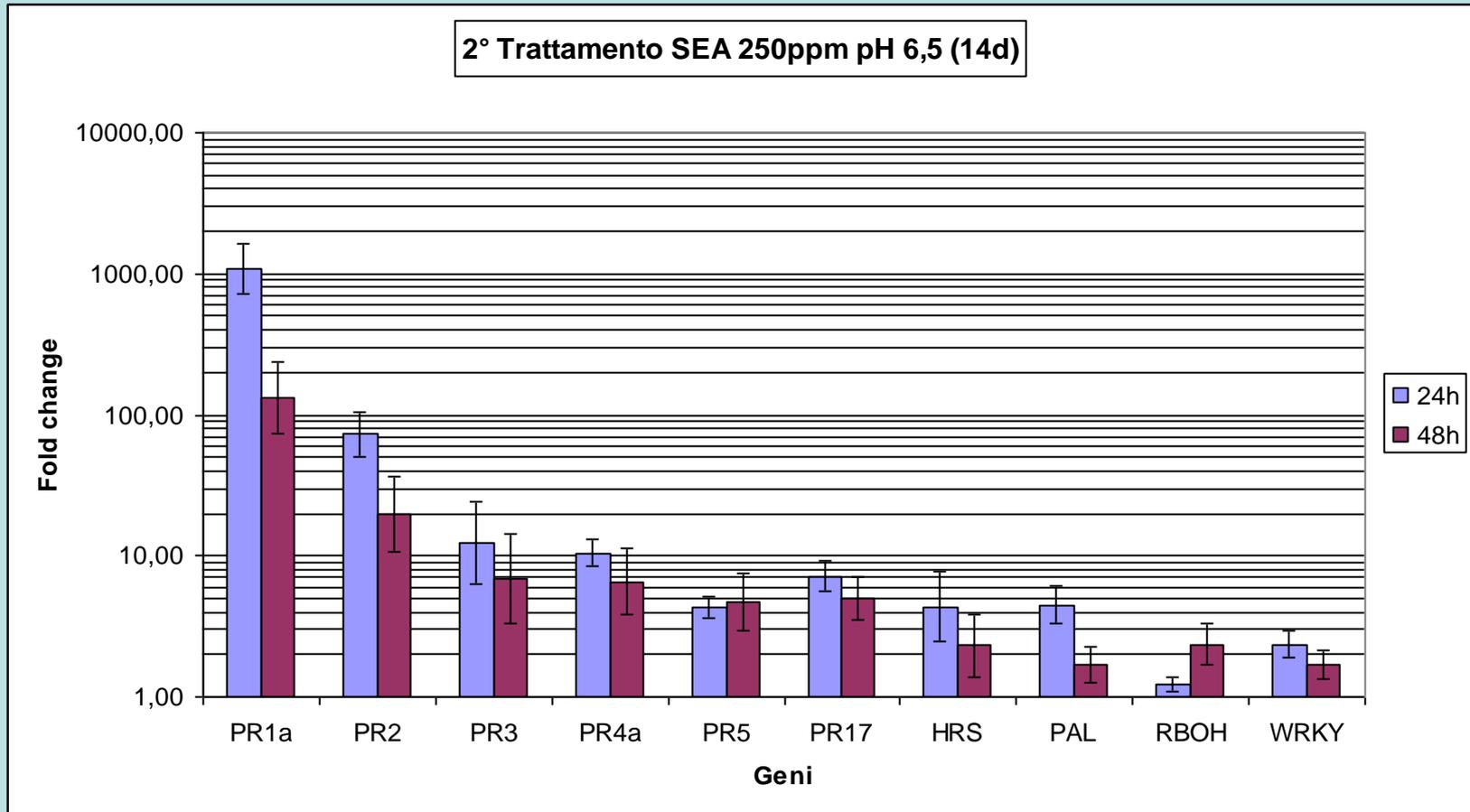


Gene	Function
PR1a	Antifungal
PR2	β -1,3-glucanase
PR3a	Acidic Chitinase
PR4a	DNA-RNAse? (Guevara-Morato et al., 2010)
PR5	Thaumatococin-like, antifungal
PR17	Unknown
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
WRKY3	Transcriptional factor
RBOH	Hypersensitive response-related protein
HSR203J	Hypersensitive response-related protein

-Rapida attivazione genica (6h) di tutti i geni esaminati;

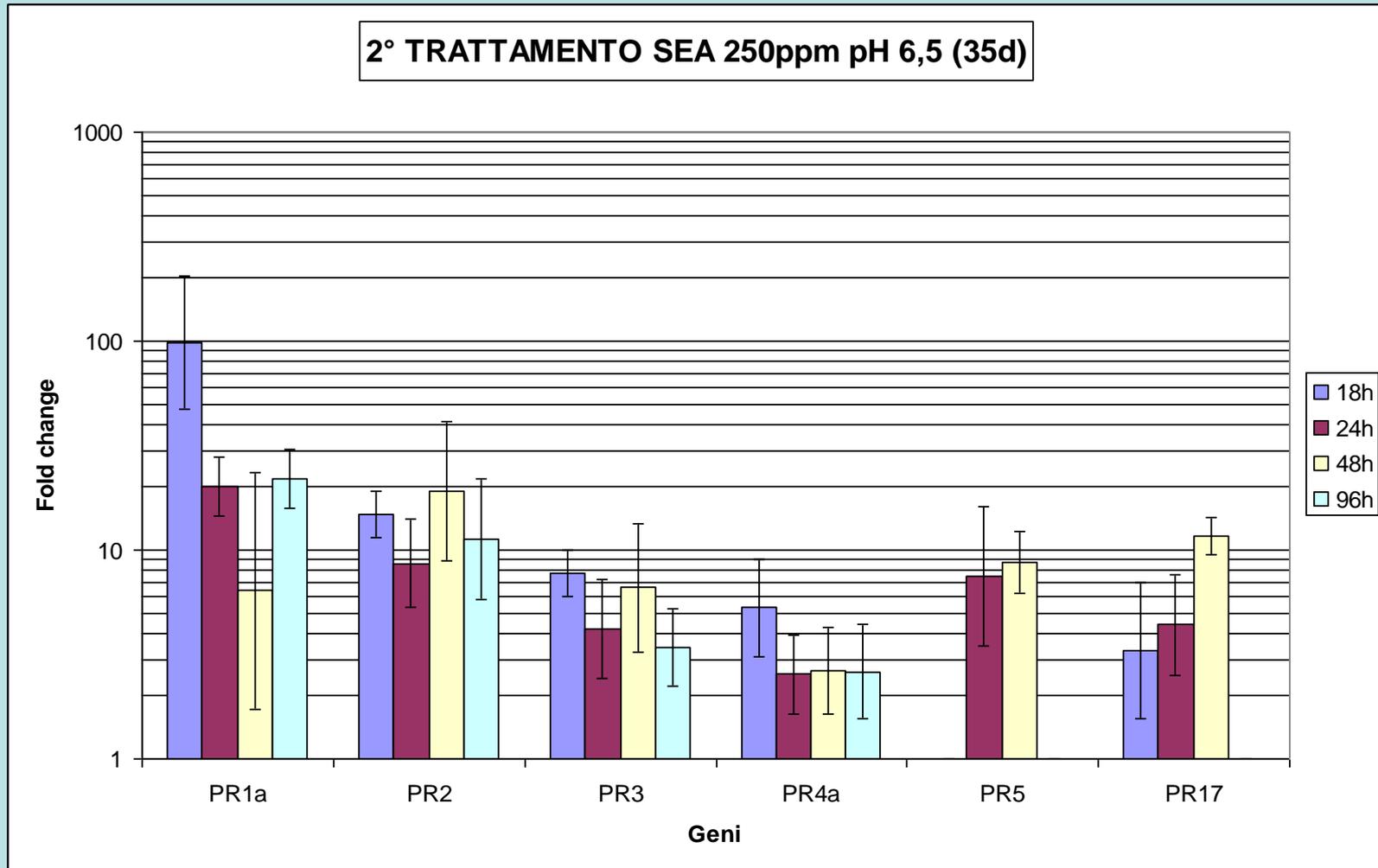
-I geni della HR (risposta di ipersensibilità) vengono attivati rapidamente poi la loro espressione diminuisce nel tempo

2° Trattamento Tabacco pH 6.5 dopo 14d



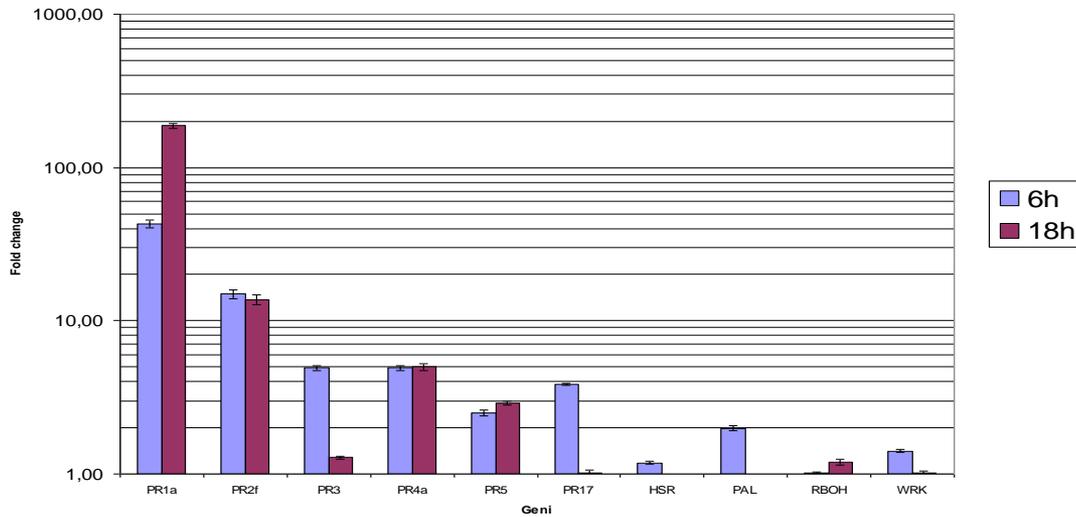
-Risposta più massiccia e duratura di tutte le proteine PR;

-I geni RBOH e WRKY non variano considerevolmente



- Forte attivazione genica anche se inferiore rispetto ai 14d
- l'attivazione riguarda solo i geni PR

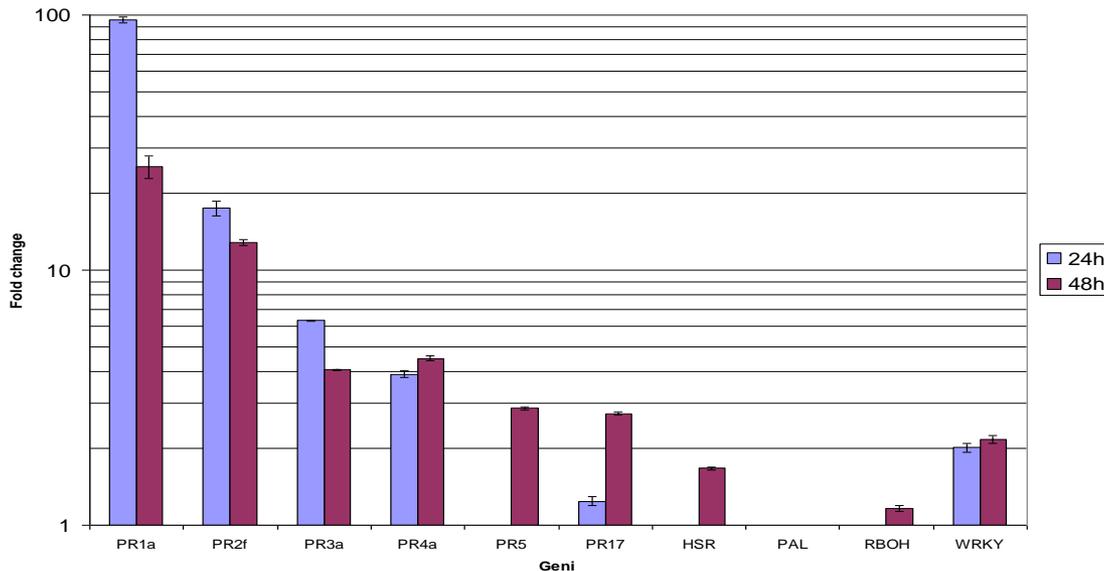
1° TRATTAMENTO SEA 250ppm pH 9



1° e 2° TRATTAMENTO pH 9

- Forte espressione di PR1a ma ristretta espressione genica globale

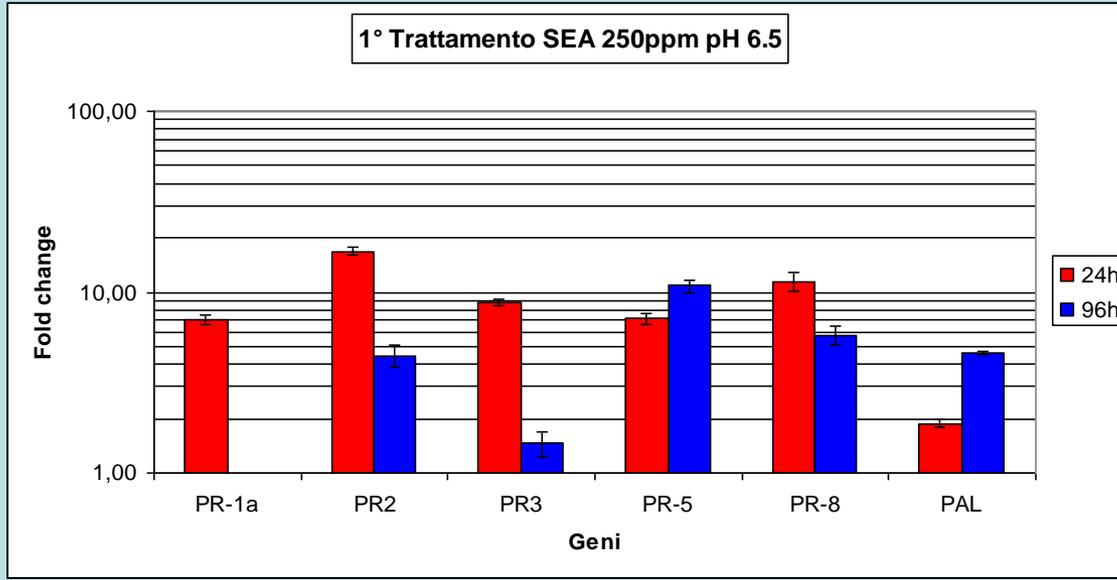
2° TRATTAMENTO SEA 250ppm pH 9 (14d)



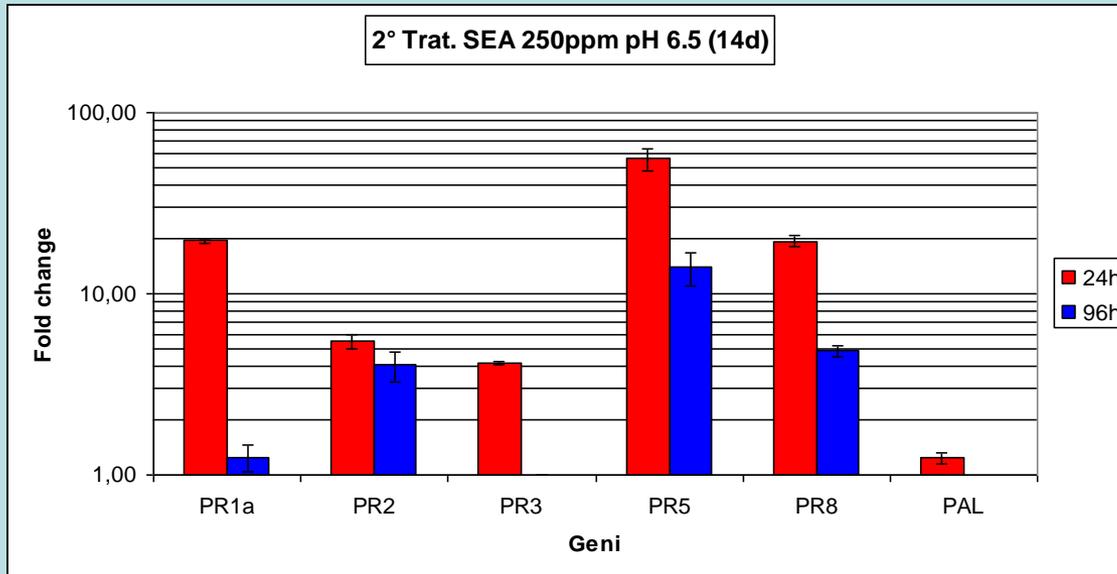
- Forte espressione dei geni difensivi ma minore rispetto al pH 6.5

- A 48 ore l'espressione genica diminuisce più velocemente

TRATTAMENTI SUL MELO pH 6.5



Gene	Function
PR1a	Antifungal
PR2	β -1,3-glucanase
GLU-2	β -1,3-glucanase
PR3a	Acidic Chitinase
PR5	Thaumatococcus-like, antifungal
PR8	Endochitinase
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase



-Entrambi i trattamenti rivelano una discreta attivazione genica

-persistente nel tempo

CONCLUSIONI:

- 1) La SEA (soluzione elettrochimicamente attivata) è capace di innescare le difese molecolari delle piante sia nei confronti della pianta modello *Nicotiana Tabacum* sia in melo cv. Fuji
- 2) Trattamenti ripetuti dopo 14 e 35 giorni sono capaci di re-innescare le difese endogene della pianta dimostrando sia un effetto di “potenziamento genico” sia di “memoria”
- 3) Il confronto fra i due pH (6,5 e 9) ha dimostrato che il pH 6.5 induce una migliore risposta difensiva: probabilmente l'acido ipocloroso HClO ha un maggiore efficacia rispetto allo ione ipoclorito ClO-

Grazie per l'attenzione...

