

**MINISTERO DELLE RISORSE AGRICOLE, ALIMENTARI E FORESTALI**

**Programma Nazionale "Resistenza Genetica delle Piante Agrarie agli Stress Biotici ed Abiotici"**

**Atti del "Workshop":**

**Selezione delle piante per resistenza agli stress biotici: basi fisiologiche e molecolari**

**Monsampolo del Tronto (AP) 19-20 maggio 1994**

**Organizzato da:**

Istituto Sperimentale per l'Orticoltura, Sezione di Ascoli Piceno

**Presentazione**

Fin dalla nascita dell'agricoltura l'istinto, più che la necessità, e il caso sono stati i fattori che hanno portato l'uomo prima ad individuare e moltiplicare le piante spontanee eduli o comunque utili e poi a selezionare, tra le specie addomesticate, quelle più adatte all'ambiente, meno danneggiate dalle avversità, capaci di dare raccolti più abbondanti e qualitativamente migliori. In questa millenaria, ininterrotta ricerca del meglio, che spesso ha voluto dire disponibilità di fonti alimentari se non sopravvivenza, l'agricoltore è riuscito ad agire empiricamente sulla pianta e in qualche modo sull'ambiente; con minor successo, ha operato per evitare o tenere a freno i tanti fattori avversi che sempre hanno devastato i campi e decurtato i raccolti. La natura stessa della maggior parte delle malattie delle piante è rimasta per secoli sconosciuta; e si è arrivati all'epoca dello sviluppo delle Scienze sperimentali, dunque ben avanti nell'Era Moderna, praticamente con le stesse conoscenze dei tempi delle "Robigalia". Dalla fine del '600 a quasi tutto l'800, prima con il perfezionamento dei mezzi ottici e la scoperta del mondo microbico e poi, dopo il rovesciamento delle concezioni sulla generazione spontanea, con lo sviluppo della Biologia, ci si è resi conto che le malattie infettive dei vegetali, così come quelle degli animali e dell'uomo, erano spesso il risultato dell'interazione tra microrganismi e piante. Solo in questo secolo tuttavia, lo studio di tali interazioni è stato condotto in profondità, affrontato con impegno multidisciplinare e visione plurilaterale: pianta e patogeno non sono stati più considerati come due esseri distinti, ma strettamente interdipendenti. È stato così messo nella giusta evidenza il fatto che, se la pianta è un organismo variabile e geneticamente plasmabile, le varie entità fitopatogene sono ancor più variabili; e che tale variabilità non solo è stata alla base della coevoluzione delle specie vegetali con i loro patogeni, ma rappresenta la chiave per l'ulteriore miglioramento delle piante coltivate. La strada del miglioramento genetico delle piante per la resistenza alle malattie e ai fattori avversi dell'ambiente fu preconizzata in Italia all'inizio del secolo da un Fitopatologo, G. Cuboni, lo stesso che forse più di ogni altro fece conoscere in Italia le nuove concezioni della Genetica vegetale e che promosse

l'istituzione della prima Stazione Sperimentale di Genetica agraria, affidandola a un proprio allievo, N. Strampelli. Questa strada, seppure relativamente stretta e lenta da percorrere, perché delimitata dai metodi tradizionali della selezione e dell'ibridazione, ma già alquanto ampliata dal ricorso alle mutazioni artificiali, ha permesso in pochi decenni di moltiplicare e migliorare le produzioni della maggior parte delle specie coltivate, specialmente di quelle erbacee. Nell'ultimo trentennio essa si è allargata a dismisura, divenendo nel tempo stesso rapidamente percorribile, per le inopinate possibilità offerte dal rapidissimo avanzamento delle conoscenze in molti campi dell'indagine biologica, biochimica, fisiologica, molecolare e genetica; soprattutto, per la possibilità di trasferire da un organismo all'altro, attraverso la manipolazione genetica, caratteri utili nel più vasto senso della parola. Con procedimenti paragonabili a quelli dell'Ingegneria, si è riusciti per così dire a "programmare", e in parte a realizzare, nuove varietà e genotipi di piante e piante transgeniche, arricchite cioè con il contributo di genomi estranei. Non si poteva però procedere su questa strada "a tentoni", senza approfondire di pari passo le conoscenze sulla costituzione e il comportamento delle popolazioni degli organismi patogeni, sui meccanismi con i quali sono determinati, regolati ed espressi specificità, patogenicità e virulenza del patogeno da un lato e suscettibilità, sensibilità e resistenza della pianta dall'altro lato; senza capire insomma quali sono, in tale interazione, i metaboliti attivi e i segnali operanti nel "colloquio molecolare" tra pianta e patogeno; insomma, tutto ciò che è all'origine delle risposte difensive delle piante. Al quasi improvviso deflagare di tecniche e di metodi nuovi nell'applicazione al miglioramento delle piante agrarie e forestali, e al loro procedere in modo apparentemente disordinato ma estremamente efficace, nonché al conseguente insorgere di nuovi, complessi e non sempre facilmente risolvibili problemi, non poteva rimanere estraneo il Ministero delle Risorse Agricole, Alimentari e Forestali, erede e depositario, nonostante le recenti gravi limitazioni, di interessi generali che rimangono tali anche dopo la sempre più frequente tendenza centrifuga e settoriale nel campo dell'agricoltura. Con uno sforzo non indifferente date le scarse risorse finanziarie destinate alla ricerca e alla sperimentazione, il MiRAAF ha dato vita a una serie di Programmi nazionali di ricerca, proprio sugli argomenti di cui si è sopra accennato o su argomenti affini. Con il Programma nazionale "Resistenza genetica delle piante agrarie agli stress biotici e abiotici", di carattere multidisciplinare e largamente aperto alle Istituzioni di ricerca del Paese, soprattutto pubbliche ma anche private, si è voluto dare incremento e sostegno agli studi fondamentali, alle ricerche e alle applicazioni che su questo argomento si vanno conducendo in Italia. Proprio per dare a coloro i quali, ognuno per la propria competenza, operano nel miglioramento delle piante per la resistenza alle malattie un'occasione per analizzare e discutere ciò che rappresenta il fondamento stesso del loro lavoro, nell'ambito del "Programma", nato da un'idea di F. Saccardo, cui hanno prontamente aderito gli altri membri del Comitato scientifico, è stato realizzato un convegno-corso ("Workshop") sulla "Selezione delle piante per resistenza a stress biotici: basi fisiologiche e molecolari". Esso è stato tenuto presso la Sezione dell'Istituto Sperimentale per l'Orticoltura, presso Monsampolo del Tronto (Ascoli Piceno); località scelta non solo per le sue accoglienti strutture, ma anche per offrire ai partecipanti un luogo tranquillo, piacevole e sereno. Nei due giorni del convegno, il 19 e 20 maggio 1994, precedute da un indirizzo di saluto del Direttore dell'Istituto ospitante, V. Magnifico, e da un'introduzione del Direttore del Programma,

L. Monti, sono state presentate 24 relazioni suddivise in 6 Sezioni: una generale e le altre tematiche: Patologia vegetale, Biochimica, Fisiologia, Genetica, Miglioramento genetico, che sono state coordinate rispettivamente da A. Graniti, A. Matta, A. Ballio, E. Marrè, M. Buiatti e F. Saccardo. La Sezione generale e quella di Genetica sono state arricchite da contributi di due studiosi stranieri: S. Ouchi (Nara, Giappone) e P. Schülze-Lefert (Aachen, Germania). Nelle pagine che seguono, vengono pubblicate le sintesi della maggior parte delle relazioni. Nel suo insieme, questa raccolta di contributi si spera possa costituire quasi un manuale e comunque un utile riferimento per coloro che da diversi punti di vista operano nel campo forse più complesso del miglioramento genetico delle piante agrarie: appunto, quello per la resistenza ai fattori biotici di stress. Ogni iniziativa come quella di cui vengono qui presentati gli Atti, richiede non poco impegno di persone e di mezzi. È dunque doveroso riconoscere il merito di tutti coloro che hanno contribuito alla sua realizzazione: i componenti del Comitato scientifico, in primo luogo, che hanno curato la preparazione e la realizzazione del convegno, in particolare, M. Schiavi e P. Crinò i quali, con i loro diretti collaboratori, hanno sopportato il maggior peso dell'organizzazione locale, il primo e di quella generale, la seconda. A tutti va dunque il ringraziamento più sincero di tutti coloro che del convegno hanno beneficiato. La pubblicazione degli Atti è stata possibile grazie: a contributi concessi dal MiRAAF e dal CNR, che vengono qui ricordati con gratitudine; alla disponibilità di "Petria"; al lavoro di revisione dei testi, condotto da A. Ballio, M. Buiatti, A. Graniti e F. Saccardo, e a quello di redazione, coordinato da A. Porta-Puglia. A tutti gli altri che, senza essere qui nominati, hanno contribuito in diverso modo al buon successo dello "Workshop", vanno infine l'apprezzamento e la riconoscenza degli Organizzatori.

## Antonio Graniti

---

Petria 6(Suppl.1), 9-15, (1996), Articolo Scientifico/*Scientific paper*

### **Resistance expression in callus cell-aggregates of TMV-resistant line 'CMT-IR03' selected from tobacco tissue culture**

KAZUYUKI CHATANI<sup>3</sup>, HIDEYOSHI TOYODA<sup>1</sup>, YOSHINORI MATSUDA<sup>2</sup> and SEIJI OUCHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture and

<sup>2</sup>Institute for Comprehensive Agricultural Science, Kinki University, 3327-204 Nakamachi, Nara 631, Japan

<sup>3</sup>Present address: Plant Biotech Division, Daiichi Engei Plantech, Shizuoka 410-13, Japan

In order to analyze the resistance expression of the TMV-resistant 'CMT-IR03' line which had been in vitro-selected from axillary bud-derived callus cultures of tobacco plants (cv. Bright Yellow), callus tissues were obtained from this line on a Murashige-Skoog medium supplemented with 0.5 µg/ml 2,4-D and 0.01 µg/ml kinetin. The friable callus tissues were dissociated and separated into single cells and small cell-aggregates. These cells were embedded into an agar-solidified medium and microinjected with TMV under a microscope. TMV was also injected into cells located at the edge of the aggregates to examine the translocation of the virus from injected to non-injected

adjacent cells of the aggregates. The multiplication of the injected virus was specifically detected by staining with fluorescein isothiocyanate-labelled anti-TMV-antibody. The result clearly indicated that callus cell-aggregates obtained from the TMV-resistant 'CMT-IR03' line permitted TMV to multiply in injected cells, but not to translocate to adjacent cells of the aggregates, whereas TMV multiplied and translocate freely to neighboring cells in control parent line calli.

**Key words:** TMV-resistance, TMV-translocation, Tobacco, Callus cell-aggregates.

### **Espressione della resistenza negli aggregati cellulari da callo della linea 'CMT-IR03' resistente al TMV, selezionata da colture di tessuti di tabacco.**

Per analizzare l'espressione della resistenza della linea di tabacco 'CMT-IR03' resistente al TMV, che era stata selezionata in vitro da colture di callo derivato da gemme ascellari della cv. Bright Yellow, colture di tessuti sono state ottenute da questa linea su un substrato di Murashige-Skoog arricchito con 0,5 µg/l di 2,4 D e 0,01 µg/l di chinetina. I tessuti friabili del callo sono stati disaggregati in cellule singole e piccoli aggregati cellulari. Queste cellule sono state incluse in un substrato agarizzato solido e microiniettate con TMV sotto il microscopio. Il virus è stato anche iniettato in cellule poste al margine degli aggregati per seguire la traslocazione del virus dalle cellule iniettate a quelle adiacenti, non iniettate, degli aggregati. La moltiplicazione del virus iniettato è stata specificamente accertata con un anticorpo anti-TMV marcato con fluoresceina isotiocianato. I risultati hanno chiaramente indicato che gli aggregati cellulari del callo ottenuto dalla linea 'CMT-IR03' resistente al TMV hanno consentito al virus di moltiplicarsi nelle cellule iniettate, ma non di traslocare nelle cellule adiacenti dell'aggregato, mentre nei calli di controllo della linea originaria di tabacco il TMV si è moltiplicato e si è facilmente diffuso nelle cellule circostanti.

**Parole chiave:** Resistenza al TMV, Traslocazione del TMV, Tabacco, Aggregati cellulari da callo.

---

Petria 6(Suppl.1), 17-27, (1996), Articolo Scientifico/*Scientific paper*

### **Microrganismi fitopatogeni e metaboliti attivi**

ANTONIO GRANITI

Dipartimento di Patologia vegetale, Università degli Studi, Via G. Amendola, 165/A I-70126 Bari

I microrganismi fitopatogeni sono dotati di un arsenale di strumenti diversi, in particolare "armi" chimiche, che essi usano simultaneamente o alternativamente per creare condizioni di malattia alle piante. Alcuni di questi strumenti permettono al patogeno, con opportuni meccanismi d'azione, di riconoscere l'ospite, di penetrare e colonizzare i tessuti delle piante, di causare sintomi della malattia; sono cioè fattori di patogenicità. Altri, conferiscono al microrganismo la virulenza. Una gran parte delle azioni offensive del patogeno verso le piante sono mediate da prodotti genici, metaboliti secondari biologicamente attivi, che intervengono durante le varie fasi del processo patogenetico. Alcuni di tali prodotti possono però innescare reazioni di difesa delle

piante ed altri prevenirle. Nell'interazione tra microrganismi e piante vi è insomma un continuo scambio di segnali molecolari. Il risultato di tale interazione dipende da fattori intrinseci ai due organismi e da condizioni estrinseche e può portare alla malattia o alla resistenza. Per stabilire il ruolo di un metabolita microbico nella patogenesi e nell'espressione dei sintomi devono essere seguiti criteri rigorosi.

**Parole chiave:** Microrganismi fitopatogeni, Metaboliti microbici, Fitotossine, Interazioni pianta-patogeno.

### **Plant pathogenic microorganisms and active metabolites.**

Plant pathogenic microorganisms are endowed with an arsenal of different tools, chemical weapons in particular, which are used simultaneously or in turn to induce disease conditions in plants. A number of these tools, which can be considered as pathogenicity factors, allow the microorganism to recognise its hosts, to penetrate and to colonise the plant tissues, and eventually to induce disease symptoms. Other factors confer virulence on the pathogen. A great part of the actions of the pathogen resulting in a plant injury are mediated by gene products, biologically active secondary metabolites, having a function in various steps of pathogenesis. Some metabolites are either able to trigger defence reactions in plants or to prevent them. There is a continuous exchange of molecular signals in the interaction between plant and microorganism. The outcome of such communications may be either disease or resistance. The role played by a microbial metabolite in plant pathogenesis and symptom expression has to be defined according to rigorous criteria.

**Key words:** Plant pathogenic microorganisms, Microbial metabolites, Phytotoxins, Plant-pathogen interactions.

---

Petria 6(Suppl.1), 29-38, (1996), Articolo Scientifico/*Scientific paper*

### **Basi generali della resistenza a patogeni**

ALBERTO MATTA

Di.Va.P.R.A., Patologia vegetale, Università Via P. Giuria, 15, I-10126 Torino

Dopo alcune considerazioni sulle strategie generali di difesa delle piante dai patogeni, vengono brevemente esaminati i meccanismi di difesa preinfettivi e postinfettivi, i costi evolutivi che essi presentano per le piante e i connessi, potenziali inconvenienti derivanti da una loro eventuale introduzione in piante transgeniche. Si sottolinea che gli eventi chiave della resistenza dinamica delle piante alle malattie parassitarie risiedono nelle interazioni molecolari tra elicitori del parassita e recettori della pianta che innescano la reazione di ipersensibilità. Vengono ricordati i recenti, promettenti progressi compiuti in alcuni sistemi ospite-parassita nella individuazione di elicitori e recettori specifici e nella clonazione dei relativi geni. Si sottolinea infine come l'obiettivo dell'ottenimento di piante transgeniche resistenti ai patogeni possa essere complicato dall'intervento di svariati prodotti genici nelle reazioni di resistenza e dalle possibili funzioni multiple dei geni di resistenza.

**Parole chiave:** Resistenza ai patogeni, Resistenza preinfettionale, Resistenza postinfettionale.

### **General bases of resistance to pathogens.**

After a few considerations on the general resistance strategies of the plants to the pathogens and some preinfectious and postinfectious resistance mechanisms, their costs in the evolution of the plants and the linked, potential drawbacks of their eventual introduction in transgenic plants have been shortly examined. It has been stressed that the molecular interactions between elicitors of the parasite and receptors of the plant that trigger the hypersensitive reaction are key events in dynamic resistance to parasitic diseases in the plant. Some recent advances in the identification and gene cloning of highly specific elicitors and receptors have been considered and attention has been eventually drawn on the difficulties in the production of transgenic resistant plants that could arise from the involvement of many gene products in resistance responses and from the possible multiple functions of resistance genes.

**Key words:** Resistance to pathogens, Pre-infectious resistance, Post-infectious resistance.

---

Petria 6(Suppl.1), 39-48, (1996), Articolo Scientifico/*Scientific paper*

### **Resistenze costitutive alle virosi delle piante superiori**

SERGIO PENNAZIO

Istituto di Fitovirologia applicata del CNR, Via delle Cacce, 73, I-10135 Torino

Nella breve rassegna vengono presi in considerazione i meccanismi molecolari delle resistenze costitutive alle infezioni virali e cioè: immunità, ipersensibilità e tolleranza. Vengono presentati alcuni ipotetici modelli sulla base dei dati sperimentali più recenti relativi all'interazione tra prodotti genici del virus e della pianta ospite, e viene concluso che esiste un notevole distacco tra quanto realizzato nella pratica di campo e quanto realmente noto in termini di meccanismi interattivi molecolari.

**Parole chiave:** Immunità, Ipersensibilità, tolleranza, virus.

### **Constitutive resistances to plant viral diseases.**

This short review examines the molecular mechanisms of the constitutive resistances to viral infections, immunity, hypersensitivity and tolerance, respectively. Some hypothetical molecular models are presented and discussed on the basis of the most recent experimental evidences on the molecular interactions between gene products of virus and host-plant. In conclusion the remarkable gap existing between the practical application for agricultural purpose and the actual knowledge on the molecular mechanisms of these resistances is stressed.

**Key words:** Immunity, Hypersensitivity, Tolerance, Viruses.

---

## **Meccanismi di resistenza indotti per via sistemica nelle piante: i segnali sistemici**

GIAN GUIDO CONTI e GUIDO VIOLINI

Istituto di Patologia Vegetale, Università, Via Celoria 2, I-20133 Milano

Vengono esaminate e discusse, attraverso un'ampia rassegna della letteratura internazionale in argomento, le più recenti acquisizioni relative ai meccanismi di resistenza indotti per via sistemica nelle piante, con specifico riferimento alla formazione, alla traslocazione, alla ricerca ed alla trasduzione dei "segnali" che potrebbero esser coinvolti nell'induzione di resistenza. In tale ambito si distingue fra resistenza sistemica acquisita (RSA), indotta da un patogeno verso lo stesso o altri patogeni inoculati successivamente in parti diverse della pianta, e resistenza sistemica indotta (RSI) quando, a seguito di un danno causato da artropodi erbivori, le foglie distanti dal sito in cui esso si è verificato accumulano composti tossici per i fitofagi o capaci di impedire che i fitofagi stessi si nutrano. Tra i possibili segnali sistemici si esaminano gli oligogalatturonidi, i derivati degli acidi grassi componenti dei lipidi di membrana, i piccoli peptidi, l'acido abscissico, l'acido salicilico ed i segnali non chimici, considerando per ciascuno di essi i meccanismi che presiedono alla formazione ed alla traslocazione, ed il coinvolgimento nell'induzione di resistenza.

**Parole chiave:** Resistenza sistemica acquisita, Resistenza sistemica indotta, Patogeni, Artropodi, Segnali sistemici.

### **Systemically acquired resistance mechanisms in plants: systemic signals.**

The more recent information concerning the mechanisms of systemic induced resistance in plants, as deduced from a wide survey of the international literature, is examined and discussed. The generation, translocation, reception and transduction of signals involved in the induction of resistance are critically reviewed. The systemic acquired resistance (SAR), induced by a pathogen against a further inoculation with the same or other pathogens is distinguished from the systemic induced resistance (SIR), which occurs after wounds caused by arthropod herbivores, when the leaves distant from the site of injury accumulate compounds toxic or distasteful to the arthropods. Amongst the possible systemic signals, oligogalacturonides, lipid-derived compounds, small peptides, abscisic acid, salicylic acid and non chemical signals are examined. For each of them, the mechanisms involved in their generation and translocation, and the role in the induction of resistance are discussed.

**Key words:** Systemic acquired resistance, Systemic induced resistance, Pathogens, Arthropod herbivores, Systemic signals.

## FELICE SCALA

Istituto di Patologia Vegetale, Università di Napoli "Federico II", Via Università 100, I-80055 Portici, (NA)

Le tossine sono studiate soprattutto come fattori di patogenicità o di virulenza nelle interazioni ospite-patogeno. In questo lavoro, invece, vengono esaminati alcuni casi in cui le tossine inducono nella pianta reazioni di difesa, comportandosi come veri e propri elicitori. È stato osservato, per esempio, che la vittorina, una tossina specifica prodotta da *Cochliobolus victoriae*, induce, a concentrazioni molto basse ( $10 \text{ pg ml}^{-1}$ ), la reazione di ipersensibilità e l'accumulo di fitoalessine nelle cultivar di avena con il gene *Pc-2*. Anche un peptide tossico prodotto dalle razze di *Cladosporium fulvum* con il gene di avirulenza *avr9* causa la reazione di ipersensibilità specificamente nelle cultivar di pomodoro con il gene complementare di resistenza *Cf9*. Il peptide NIP1, prodotto da una razza di *Rhynchosporium secalis*, stimola, invece, la sintesi di proteine correlate alla patogenesi solo nelle cultivar di orzo con il gene *Rrs1*. Alcuni studi indicano che anche tossine coinvolte in interazioni ospite-patogeno non del tipo gene-per gene, possono dar luogo a risposte di resistenza nella pianta. Ad esempio, la cerato-ulmina, prodotta da *Ophiostoma ulmi*, può indurre la sintesi di fitoalessine e la formazione di tulle. Si discute la possibilità di trasformare le piante con geni che codificano per elicitori della reazione di ipersensibilità allo scopo di ottenere una resistenza a largo spettro contro i fitopatogeni.

**Parole chiave:** Tossine, Elicitori, Reazioni di difesa.

### **Toxins and elicitation of plant defense reactions.**

Toxins are studied mainly as determinants of pathogenicity or virulence in plant-pathogen interactions. This paper analyses the possibility that toxins, acting as elicitors, may induce defense responses in plants. Victorin, a toxin produced by *Cochliobolus victoriae*, at very low concentration ( $10 \text{ pg ml}^{-1}$ ) elicits hypersensitive response and phytoalexin accumulation only in cultivars of oat which carry the *Pc-2* gene. A race-specific toxic peptide, produced by *Cladosporium fulvum* races carrying the avirulence gene *avr9*, is directly responsible for the induction of the hypersensitive response in cultivars of tomato with the complementary disease resistance gene *Cf9*. The phytotoxic peptide NIP1 from a race of *Rhynchosporium secalis* induces a specific accumulation of pathogenesis-related proteins in barley cultivars with the resistance gene *Rrs1*. Some studies suggest that toxins involved in host-pathogen interactions other than those of the gene-for-gene type, may also be able to induce plant defense reactions. Cerato-ulmin, for example, a toxin produced by *Ophiostoma ulmi* may cause synthesis of phytoalexin and formation of tyloses. The possibility of transforming plants with genes coding for elicitors of the hypersensitive response to obtain a broad resistance against plant pathogens is discussed.

**Key words:** Toxins, Elicitors, Defense responses.

PATRIZIA ADUCCI<sup>1</sup>, ALESSANDRO BALLIO<sup>2</sup>, VINCENZO FOGLIANO<sup>3</sup>, MARIA ROSARIA FULLONE<sup>2</sup>, MAURO MARRA<sup>1</sup> e DANIELA NASTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biologia, Università di "Tor Vergata", Via della Ricerca Scientifica, I-00133 Roma

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biochimiche "A. Rossi-Fanelli", Università "La Sapienza", P.le A. Moro 5, I-00185 Roma

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienza dell'Alimentazione, Università "Federico II", Parco Gussone, I-80155 Portici (Napoli)

La fusicoccina, una tossina fungina, induce processi fisiologici e patologici conseguenti l'attivazione della H<sup>+</sup>-ATPasi di plasmalemma. La sensibilità alla tossina dipende da recettori specifici presenti nei vegetali, dai muschi alle piante superiori. È stato recentemente dimostrato che tali recettori possono rendere sensibile alla fusicoccina la H<sup>+</sup>-ATPasi del fungo *Neurospora crassa*, un'organismo insensibile a questa tossina. I dati ottenuti sulla sequenza primaria dei recettori della fusicoccina rendono possibile lo sviluppo di nuove strategie di manipolazione genetica per ottenere piante resistenti alla tossina.

**Parole chiave:** Fusicoccina, Recettori, Patogenesi, Resistenza.

### **Resistance to phytotoxins: loss of specific receptors?**

The fungal toxin fusicoccin induces pathological and physiological processes by activating the plasmalemma H<sup>+</sup>-ATPase after the interaction with specific receptors. Sensitivity to fusicoccin parallels the occurrence of its receptors and can be conferred in vitro on the H<sup>+</sup>-ATPase from the insensitive fungus *Neurospora crassa*. The availability of structural data on fusicoccin receptors opens new strategies to develop resistance in transgenic plants.

**Key words:** Fusicoccin, Receptors, Pathogenesis, Resistance.

---

Petria 6(Suppl.1), 87-104, (1996), Articolo Scientifico/Scientific paper

### **Fitormoni e malattie batteriche iperplastiche da *Pseudomonas savastanoi* e *Agrobacterium tumefaciens***

GIUSEPPE SURICO

Istituto di Patologia e Zoologia Forestale e Agraria, P.le delle Cascine, 28, I-50144 Firenze

La capacità di produrre acido indol-3-acetico (IAA) e citochinine è piuttosto diffusa fra i batteri fitopatogeni. Tuttavia, non è sempre chiara l'importanza per l'espressione della malattia della produzione in planta dell'IAA e delle citochinine da parte di questi microrganismi o di cellule trasformate. Nel tumore batterico causato da *Agrobacterium tumefaciens* e in *Pseudomonas savastanoi* la produzione di IAA via indolacetammide è essenziale per lo sviluppo dei tumori e dei tubercoli, rispettivamente. Il ruolo delle citochinine è meno evidente. Ciò che è noto è che la produzione di citochinine determina la cerchia d'ospiti di ceppi di *A. tumefaciens* da vite (*A. vitis*) mentre, nel caso di *P. savastanoi*, la perdita della produzione di citochinine conduce alla comparsa di sintomi attenuati. Inoltre, in entrambe le malattie, le escrescenze, e la cerchia d'ospiti sembra siano il risultato dall'attività combinata di geni nella pianta e dei geni per la sintesi di fitormoni nel patogeno. Accanto ad alcune similarità, diversi importanti caratteri

differenziano i due patogeni. Questa rassegna tratta alcuni aspetti del tumore batterico e della rogna dell'olivo e dell'oleandro. In particolare, viene discusso il ruolo dell'IAA e delle citochinine nella comparsa dei sintomi, cerchia d'ospiti di ceppi di *A. tumefaciens* e *P. savastanoi* e morfologia delle escrescenze causate dai due batteri sui rispettivi ospiti. Sono brevemente discussi altri effetti in planta dell'IAA e delle citochinine.

**Parole chiave:** Rogna dell'olivo e dell'oleandro, Tumore batterico, Fitormoni.

### **Phytohormones and hyperplastic bacterial diseases caused by *Pseudomonas savastanoi* and *Agrobacterium tumefaciens*.**

The ability to produce indole-3-acetic acid (IAA) and cytokinins is widespread among plant pathogenic bacteria. However, the importance of in planta IAA and cytokinin production by these organisms (or transformed plant cells) for the disease process is clear only in a few cases. In crown gall disease and in *Pseudomonas savastanoi* the production of IAA via the indoleacetamide pathway is directly involved in tumor and knot formation, respectively. The role of cytokinins is less clear. What is known is that cytokinin production is an important factor in determining the host range for tumor formation caused by *Agrobacterium tumefaciens* grapevine strains (*A. vitis*), while in *P. savastanoi* the lack of cytokinin synthesis leads to attenuated symptoms. However, for both pathogens it seems that symptom induction and host range for any strain are determined by both bacterial and plant factors. Similarities apart, the two pathogens are differentiated by several important traits. This review covers some aspects of crown gall and olive and oleander knot disease. In particular, it focuses on the role of IAA and cytokinins in symptom induction, the host range of *A. tumefaciens* and *P. savastanoi* strains and the morphology of excrescences caused by the two pathogens on their hosts. Other *in planta* effects of IAA and cytokinins are briefly discussed.

**Key words:** Olive and oleander knot disease, Crown gall, Phytohormones.

---

Petria 6(Suppl.1), 105-114, (1996), Articolo Scientifico/Scientific paper

### **Una ipotesi di sistema immunitario nelle piante**

GIULIA DE LORENZO, BENEDETTO ARACRI, DANIELA BELLINCAMPI,  
CLAUDIO CAPRARI,  
ALESSANDRA DEVOTO, FIONA LECKIE, LAURENCE NUSS, GIOVANNI SALVI  
e FELICE CERVONE

Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Roma "La Sapienza", Piazzale Aldo Moro, I-00185 Roma

La endopoligalatturonasi (PG) è un componente importante dell'arsenale utilizzato da molti microorganismi patogeni durante l'infezione: è infatti indispensabile perché la barriera strutturale costituita dalla parete cellulare vegetale venga degradata. Una proteina, la PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein), capace di regolare l'attività dell'enzima è presente nelle pareti cellulari di tutte le piante dicotiledoni sinora esaminate. La formazione del complesso PG-PGIP favorisce l'accumulo di

oligogalatturonidi attivi come elicitori delle risposte di difesa. Un gene che codifica per la PGIP di fagiolo è stato clonato. I livelli dei trascritti *pgip* aumentano, in modo transitorio, in cellule in coltura trattate con elicitori e in piantine ferite o trattate con acido salicilico. La PGIP ha una struttura modulare ricca di leucina. Sei geni di resistenza da piante diverse sono stati isolati e caratterizzati. Cinque di questi codificano per proteine con motivi modulari ricchi di leucina. Uno di questi geni che codifica per una chinasi sembra determinare resistenza solo in combinazione con una proteina modulare ricca di leucina. Il gene *pgip* di *Phaseolus vulgaris* L. presenta una interessante omologia con i geni di resistenza e in particolare con il gene *Cf-9* di pomodoro. Si ipotizza che la PGIP appartenga a una superfamiglia di proteine modulari ricche di leucina e specializzata per il riconoscimento di numerosi segnali microbici.

**Key words:** Resistenza delle piante ai patogeni, PG (endopoligalatturonasi), PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein).

### **The immune system of plants: a hypothesis.**

Many plant pathogens secrete endopolygalacturonases (PGs) capable of degrading the pectin of the plant cell wall and facilitating entry into the plant tissues. A plant polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) has been isolated and characterized. It inhibits the action of PGs and favours the formation of active oligogalacturonides which elicit plant defense responses. A family of *pgip* genes has been identified in *Phaseolus vulgaris* L. and one gene cloned. Gene expression analyses show induction in cells adjacent to the infection site in incompatible fungus-plant interactions. This evidence points to PGIP being an important player in plant signalling leading to resistance. PGIP is an extracellular protein rich in leucine and displays a modular structure of repeating units (leucine-rich repeats, LRR). LRR proteins are involved in protein-protein interactions and are found in proteins with many diverse functions. Of the six plant resistance genes recently cloned, five exhibit LRR domains. Some of these have receptor-like domains with homology to PGIP and kinase domains for intracellular signalling. The *pgip* genes could belong to a super-family of genes, which include the resistance genes, specialized for recognition of foreign molecules.

**Parole chiave:** Plant resistance to pathogens, PG (endopolygalacturonase), PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein).

---

Petria 6(Suppl.1), 115-120, (1996), Articolo Scientifico/*Scientific paper*

### **Studi sul meccanismo d'azione della fusicoccina in plasmalemma isolato da piante superiori**

FRANCA RASI-CALDOGNO<sup>1</sup> e MARIA IDA DE MICHELIS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro di Studio del Consiglio Nazionale delle Ricerche per la Biologia Cellulare e Molecolare delle Piante,

Dipartimento di Biologia, Università di Milano, Via G. Celoria, 26, I-20133 Milano

<sup>2</sup>Istituto Botanico, Università di Genova, Corso Dogali 1/c, I-16136 - Genova

Vengono riassunte brevemente le conoscenze ottenute, lavorando con frazioni purificate di plasmalemma di piante superiori, circa l'attivazione da fusicoccina della H<sup>+</sup>-ATPasi

del plasmalemma. Viene presentato un nuovo approccio sperimentale basato sull'analisi di mutanti di *Arabidopsis thaliana* selezionati per resistenza a fusicoccina, che potrà essere di grande utilità per la individuazione e lo studio del meccanismo di trasduzione del segnale che intercorre tra legame della fusicoccina al proprio recettore e attivazione della H<sup>+</sup>-ATPasi del plasmalemma.

**Parole chiave:** Fusicoccina, *Arabidopsis thaliana*, Recettori, Trasduzione di segnale, Plasmalemma.

### **Investigations on the mechanisms of action of fusicoccin on plasma membrane of plants**

We briefly summarize the information on the activation by fusicoccin of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase obtained working on plasma membrane fractions purified from higher plants. We also present a new experimental approach based on the analysis of mutants of *Arabidopsis thaliana* selected for resistance to fusicoccin, which is potentially very useful to identify and analyze the mechanism of signal transduction intervening between the binding of fusicoccin to its receptor and the activation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase.

**Key words:** Fusicoccin, *Arabidopsis thaliana*, Receptors, Signal transduction, Plasma membrane.

---

Petria 6(Suppl.1), 121-132, (1996), Articolo Scientifico/Scientific paper

### **Aspetti generali dell'azione di tossine con le caratteristiche di acidi deboli**

MARIA TERESA MARRÈ<sup>1</sup>, FRANCESCO GUAZZO ALBERGONI<sup>2</sup> e PAOLA VERGANI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro di studio del CNR per la biologia molecolare e cellulare delle piante, Via Celoria, 26, I-20133 Milano

<sup>2</sup>Università degli Studi di Milano. Dipartimento di Biologia, Via Celoria, 26, I-20133 Milano

Il problema dell'importanza dei valori intra ed extracellulare del pH ai fini della capacità di tossine con carattere di acido debole di penetrare passivamente nella cellula e di agire in essa è stato affrontato studiando, in foglie isolate di *Elodea densa*, le caratteristiche dell'assorbimento e dell'azione fisiologica dell'acido fusarico (FA), tossina con funzione carbossilica, nonché di un suo analogo privo di attività tossica, l'acido picolinico. È risultato che: 1) FA penetra nella cellula soprattutto nella sua forma indissociata (quindi meglio a pH più acido) e si accumula nel citoplasma soprattutto nella sua forma carica; 2) gli effetti di FA sulla differenza di potenziale elettrico transmembrana (Em) di iperpolarizzazione in un primo tempo, e di depolarizzazione a tempi più lunghi, si spiegano come dovuti il primo all'acidificazione del citosol e quindi all'attivazione della pompa protonica, il secondo come manifestazione di un'azione tossica, specifica, della tossina esplicata a livello delle membrane, tra cui quelle mitocondriali, in cui FA appare fissarsi ed agire soprattutto nella forma carica, quella, cioè, che tende ad accumularsi fino a raggiungere nella cellula livelli molto più alti che nel mezzo esterno.

**Parole chiave:** Tossine con carattere di acido debole, Acido fusarico, Penetrazione cellulare.

### **Weak-acid toxins: general aspects**

Recent work supports the view that the capability of toxins with characteristics of weak acid or base to penetrate into the host cells and to interact with cell structures is strongly conditioned by extracellular and intracellular pH. In this investigation the problem has been approached by measuring the transport and the physiological action of the weak acid toxin fusaric acid (FA). The results of measurements of FA uptake and its effects on transmembrane electrical potential differences ( $E_m$ ) and its toxic action on ion transport, as well as on the respiratory activity of isolated mitochondria converge in showing: that FA transport into *Elodea* leaf cells repeats the behaviour described for non toxin weak acids with entry mainly in the undissociated form (favoured by extracellular acidity); and strong accumulation in the cytosol of the charged form, which seems to bind to and to interact with the membrane more actively than the uncharged one.

**Key words:** Weak-acid toxins, Fusaric acid, Cell penetration.

---

Petria 6(Suppl.1), 133-143, (1996), Articolo Scientifico/Scientific paper

### **Resistance to phytotoxins: developing selection methods based on the physiological action of the toxin**

PIERO MORANDINI<sup>1</sup>, IRENE MURGIA<sup>1</sup>, LUISA CAMPI<sup>1</sup>, STEFANO GOMARASCA<sup>1</sup>, STEFANO VILLANI<sup>2</sup>, NICOLA LUDWIG<sup>2</sup> and CARLO SOAVE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biologia "L. Gorini", Università di Milano, Via Celoria 26, I-20133 Milano

<sup>2</sup>Istituto di Fisica generale applicata, Università di Milano, Via Celoria 22, I-20133 Milano

We describe various methods for the isolation and the characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants resistant to fusaric acid (FC), a toxin which activates the plasma membrane  $H^+$ ATPase. As a consequence of this activation, FC stimulates, among other processes, cation uptake. Plantlets exposed to the toxin and tetraphenylphosphonium (TPP), a lipophilic cation that ultimately causes chlorophyll degradation, bleach faster than those exposed only to TPP, presumably because this cation is taken up faster upon FC treatment. Also hygromycin-B toxicity is strongly dependent on the presence of FC, so that we can easily discriminate between wt strains and a strain 'resistant' to FC previously isolated in this laboratory. Weak organic acids able to permeate membranes can also be used to discriminate between wt and the mutant: hypocotyl elongation is more inhibited in mutant seedlings exposed to isobutyric acid than in wt. Cell sap pH measurement shows that intracellular acidification is presumably responsible for growth inhibition. FC stimulation of the proton pump induces also stomata opening and therefore an increase in transpiration which reduces leaf temperature. Infra-red thermal imaging of toxin treated stems can discriminate between sensitive and resistant plants. We anticipate that several of these selection systems can be applied to other toxins that

activate the plasmalemma proton pump.

**Key words:** Resistance to toxins, Selection methods.

### **Resistenza a fitotossine: messa a punto di metodi basati sull'azione fisiologica della tossina.**

Vengono descritti diversi metodi per isolare e caratterizzare mutanti di *Arabidopsis thaliana* resistenti alla fusicoccina (FC), una tossina che attiva la pompa protonica della membrana plasmatica ( $H^+$ ATPasi). Come conseguenza di tale attivazione la FC stimola, oltre a diversi processi, anche l'assunzione di cationi. Germinelli trattati con la tossina e il tetrafenil fosfonio (TPP), un catione lipofilo che ha come effetto ultimo di distruggere la clorofilla, sbiancano più velocemente di quelli trattati con TPP da solo, presumibilmente perché questo catione viene assunto più velocemente in seguito a trattamento con FC. Anche la tossicità dell'igromicina-B dipende fortemente dalla presenza di FC, così che si possono facilmente distinguere ceppi selvatici da un mutante "resistente" alla FC isolato precedentemente in questo laboratorio. Acidi organici deboli capaci di permeare le membrane possono essere usati per discriminare tra wt e il mutante: l'allungamento dell'ipocotile di germinelli viene inibito dall'acido isobutirrico più nel mutante che nel wt. Misurazione del pH del succo cellulare mostra che l'acidificazione intracellulare è verosimilmente responsabile dell'inibizione della crescita. La stimolazione della pompa protonica da parte della tossina induce inoltre l'apertura degli stomi ed aumenta perciò la traspirazione, che riduce a sua volta la temperatura della foglia; tramite termografia a raggi infrarossi su steli trattati con la tossina si possono distinguere piante sensibili da piante resistenti. Diversi di questi sistemi di selezione sono probabilmente applicabili ad altre tossine capaci di attivare la pompa protonica del plasmalemma.

**Parole chiave:** Resistenza alle tossine, Metodi di selezione.

---

Petria 6(Suppl.1), 145-154, (1996), Articolo Scientifico/*Scientific paper*

### **"Background" fisiologico e resistenza a patogeni**

MARCELLO BUIATTI

Dipartimento di Biologia Animale e Genetica, Università, Via Romana, 17, I-50125 Firenze

Il recente isolamento di geni per la resistenza a patogeni nelle piante ha segnato un passo decisivo nella comprensione delle basi molecolari della resistenza "verticale" (gene per gene) ipotizzata da Flor. Nella presente rassegna si cerca di sintetizzare e discutere i dati esistenti sulla base della tolleranza aspecifica (resistenza "orizzontale") e comunque sui processi che modulano quantitativamente la resistenza. In particolare si mettono in luce il ruolo e l'importanza dei principali fitoregolatori nel determinare la capacità di difesa attiva, sulla base dei loro effetti sulla espressione dei geni coinvolti in questo processo. Vengono quindi riportati i primi, positivi, dati sulla possibilità di modificare la capacità di risposta a patogeni delle piante alterando, mediante trasformazione, contenuto ed

espressione dei geni coinvolti nella sintesi o utilizzazione di fitormoni.

**Parole chiave:** Fitoregolatori, Resistenza, Meccanismi di difesa, Piante transgeniche.

### **Physiologic background and resistance to pathogens.**

The recent isolation in plants of genes conferring resistance to pathogens is a critical breakthrough in the understanding of the molecular basis of Flor "vertical" resistance (gene-for-gene). In the present review, existing data on basic processes of aspecific ("horizontal") tolerance which quantitatively modulate resistance to pathogens are summarized and discussed. Particularly, the role and relevance of several phytohormones for active defense on the ground of their effects on the expression of genes involved in this process is pointed out. Moreover, the first, positive data are reported on the modification of such competence through changes in the complements and expression of genes involved in hormone synthesis and utilization.

**Key words:** Phytohormones, Resistance, Defence mechanisms, Transgenic plants.

---

Petria 6(Suppl.1), 155-166 (1996), Articolo Scientifico/*Scientific paper*

### **Trasformazione di piante con geni virali per induzione di resistenza ai virus**

MARCELLO RUSSO

Centro di Studio del CNR sui Virus e le Virosi delle Colture Mediterranee, Dipartimento di Protezione delle Piante, Università, Via Amendola 165/A, I-70126 Bari

La difesa delle colture agrarie dispone oggi di nuovi metodi di lotta alle virosi basati sull'ingegneria genetica. Piante trasformate con sequenze derivate dal genoma virale sono resistenti all'infezione oppure sono tolleranti, poiché non manifestano sintomi o li manifestano in forma attenuata. Le sequenze utilizzate per l'ottenimento di piante transgeniche resistenti possono derivare dal gene codificante la proteina capsidica oppure una proteina non strutturale quale la replicasi. Il gene virale può essere usato in forma nativa e funzionale oppure modificata ed inattiva oppure, ancora, in direzione antisense. In alternativa alla sequenza virale, le piante possono essere trasformate con RNA satelliti o difettivi interferenti o, infine, con molecole di RNA dotate di attività catalitica (ribozimi). L'uso delle piante transgeniche presenta alcuni rischi ambientali che vanno attentamente valutati sperimentalmente.

**Parole chiave:** Piante transegeniche, Virus, Resistenza

### **Plant transformation with viral genes to increase resistance.**

Increased resistance to plant viruses can be obtained by transforming plants with sequences derived from the viral genome. Transgenic plants are either resistant to infection or tolerant showing attenuation or suppression of disease symptoms. Virus-derived sequences include those encoding structural (coat) or nonstructural (replicase) proteins cloned in native or defective form or in antisense direction. Alternatively, satellite and defective interfering RNAs or ribozymes can be used as source of resistance in transgenic plants. It is suggested that potential environmental risks should carefully be

evaluated prior to any practical use of transgenic plants.

**Key words:** Transgenic plants, Viruses, Resistance.

---

Petria 6(Suppl.1), 167-178, (1996), Articolo Scientifico/Scientific paper

**Identification in *Ceratitis capitata* of the *Drosophila melanogaster* *Sex-lethal* homologous gene: a preliminary comparative study**

GIUSEPPE SACCONI, DORA ARTIACO, IVANA PELUSO, PASQUALE VITO,  
MARIA FURIA and CATELLO POLITO

Dipartimento di Genetica e Biologia Generale e Molecolare, Università di Napoli "Federico II" Via Università, 100, I-80055 Portici, Napoli

Here we report data on the identification of a *Ceratitis capitata* gene *Sex-lethal* homologous to the *Drosophila melanogaster*. Two *C. capitata* cDNA libraries, from female adults and from embryos, were screened in low stringency conditions using as a probe a fragment derived from a *Drosophila Sxl* female specific cDNA. Five clones were isolated from the cDNA female library and three from the embryonic one. The structure and the nucleotide and amino acid sequences of the isolated cDNA clones appeared to be highly conserved with respect to the *Drosophila* probe utilized. Sequence analyses of some embryonic cDNA clones showed that some embryo specific alternative splicing events described in *D. melanogaster* seem to be conserved in *C. capitata*; "Northern blot" analysis of RNA from staged embryos reveals the presence of a specific band in 4 hours embryos. Northern blot analysis of adult female and male RNA revealed the presence of multiple transcripts.

**Key words:** *Ceratitis capitata*, *Drosophila melanogaster*, *Sex-lethal*, Homology, cDNA, Sex-specific.

**Identificazione in *Ceratitis capitata* del gene omologo a *Sex-lethal* di *Drosophila melanogaster*.**

Vengono qui riportati dati relativi all'identificazione di un gene di *Ceratitis capitata* omologo al gene *Sex-lethal* di *Drosophila melanogaster*, che ha un ruolo centrale nella regolazione del processo di differenziamento sessuale di quest'ultimo insetto. Sono state selezionate in condizioni di bassa "stringenza" due "librerie" di cDNA di *C. capitata*, una di femmine adulte ed una embrionale, utilizzando come sonda un frammento derivato da un cDNA femmina specifico del gene *Sxl* di *Drosophila*. Sono stati così isolati cinque cloni dalla "libreria" di femmine adulte e tre da quella embrionale. La struttura e la sequenza nucleotidica ed aminoacidica di questi cloni appaiono altamente conservati rispetto a quella del cDNA usato come sonda. Analisi di sequenza di cloni di cDNA embrionali hanno rivelato che in *Ceratitis* sembrano essere conservati eventi di "splicing" alternativo stadio specifici presenti in *Drosophila*; inoltre esperimenti di "Northern blot" in cui è stato analizzato RNA di embrioni di *Ceratitis*, estratto in diversi momenti dello sviluppo embrionale hanno mostrato la presenza di un trascritto specifico dello stadio di 4 ore. L'analisi di "Northern blot" di RNA estratto da maschi e femmine adulti di *Ceratitis* ha mostrato la presenza di trascritti multipli.

**Parole chiave:** *Ceratitis capitata*, *Drosophila melanogaster*, *Sex-lethal*, omologia, cDNA, Sesso-specifico.

---

Petria 6(Suppl.1), 179-196, (1996), Articolo Scientifico/*Scientific paper*

## **Bioteecnologie nel miglioramento genetico delle piante per resistenza a stress biotici**

FRANCESCO SACCARDO

Dipartimento Produzione Vegetale, Università della Tuscia, Via S.C. De Lellis, 1, I-01100 Viterbo

Il miglioramento genetico convenzionale ha messo in evidenza i suoi limiti in termini di tempi necessari per sviluppare nuovo germoplasma resistente, di difficoltà a trasferire geni da specie incompatibili e a selezionare precocemente genotipi di un certo interesse economico. Le bioteecnologie hanno messo a disposizione nuove metodologie basate sull'uso della coltura *in vitro* e dell'ingegneria genetica e utilizzate in gran parte per ottenere nuove resistenze genetiche non disponibili nel germoplasma naturale. La complessità dei nuovi programmi di miglioramento genetico comporta soprattutto una maggiore conoscenza dell'interazione ospite-patogeno. Collaborazioni tra competenze diverse devono contribuire a fornire conoscenze più avanzate e utili per ottenere nuovo materiale genetico. Negli ultimi 10 anni, sono stati ormai resi disponibili numerosi geni che, utilizzati mediante le tecniche di ingegneria genetica, presentano delle potenzialità per la lotta contro malattie fungine, batteriche e virali e danni da nematodi e insetti. Si è persino assistito ad un aumento di notifiche per il rilascio di piante transgeniche anche in Italia, dove, sino al 15 marzo 1994, sono state presentate notifiche per tre linee trasformate di mais e quattro di pomodoro resistenti a insetti e a CMV. Diverse industrie chimiche e società a carattere biotecnologico hanno investito ingenti capitali nel settore sementiero. Il miglioratore genetico, in collaborazione con altre competenze, deve applicare tali metodologie innovative da associare ai programmi convenzionali. Di fronte ai limiti della trasformazione genetica, l'impiego dei marcatori molecolari è già da considerarsi una realtà per selezionare materiale genetico in stadi precoci e in tempi brevi.

**Parole chiave:** Coltura *in vitro*, Ingegneria genetica, Piante transgeniche, Resistenza a malattie.

### **Biotechnologies in plant breeding for resistance to biotic stresses.**

The conventional plant breeding showed its limitations in terms of a long time necessary to develop new resistant germplasm, of the difficulties to transfer genes from incompatible species and to early select genotypes of economical interest. In order to obtain new genetic resistances not available in the natural germplasm, the biotechnologies allowed to apply new methodologies based on the use of *in vitro* culture and genetic engineering. The complexity of innovative plant breeding programmes implies more studies on the host-pathogen interaction; collaborations among different competences have to contribute in reaching more knowledge useful to develop new genetic material. In the last 10 years, several genes have been made available; they have

potentialities to control fungal, bacterial and viral diseases as well as damages caused by nematodes and insects. An increase of release requests for transgenic plants was observed also in Italy where, up to March 15, 1994, requests were presented for three lines of maize and four of tomato resistant to insects and to CMV. Different chemical industries and biotechnological societies devoted considerable budgets in the field of seed production.

In collaboration with other competences, the breeder must link these innovative methodologies to conventional programmes. Genetic transformation presents some limitations whereas the use of molecular markers is already applied to select genetic material at early stages and in a short time.

**Key words:** *In vitro* culture, Genetic engineering, Transgenic plants, Disease resistance.

---

Petria 6(Suppl.1), 197-217, (1996), Articolo Scientifico/Scientific paper

### **Filtrati colturali e tossine nella selezione di piante resistenti a malattie**

PAOLA CRINÓ<sup>1</sup>, GENNARO CRISTINZIO<sup>2</sup>, ALESSANDRA GENTILE<sup>3</sup>, ANITA HAEGI<sup>4</sup>, EDDO RUGINI<sup>5</sup>, GIAN PIERO SORESSI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>ENEA C.R. Casaccia, Divisione Biotecnologie e Agricoltura, Via Anguillarese, 301, I-00060 Roma

<sup>2</sup>Istituto di Patologia Vegetale, Università di Napoli, Via Università, 100, I-80055 Portici, Napoli

<sup>3</sup>Istituto di Coltivazioni Arboree, Università di Catania, Via Valdisavoia, 5, I-95123 Catania

<sup>4</sup>Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Via C. G. Bertero, 22, I-00156 Roma

<sup>5</sup>Dipartimento Produzione Vegetale, Università della Tuscia, Via S. C. De Lellis 1 - I-01100 Viterbo

<sup>6</sup>Dipartimento Agrobiologia e Agrochimica, Università della Tuscia, Via S. C. De Lellis, 1, I-01100 Viterbo

La selezione *in vitro* con tossine o filtrati colturali prodotti da microrganismi fitopatogeni ha permesso in alcuni casi di migliorare l'efficienza dei programmi di miglioramento genetico contribuendo a isolare piante resistenti a malattie. L'impiego di tossine, ove possibile, è preferibile a quello di filtrati colturali in quanto si tratta di sostanze pure che non causano artefatti e non falsano i risultati della selezione *in vitro*. Nel presente lavoro, sono riportati risultati sperimentali sull'impiego di tossine e filtrati colturali quali agenti selettivi per alcune interazioni ospite-patogeno di interesse agrario. I filtrati colturali di *Ascochyta rabiei* e di *Phytophthora nicotianae* sono in grado di esplicare un effetto differenziale su linee e varietà di cece e pomodoro con diversa reazione ai patogeni. Un simile effetto non è stato osservato per i filtrati colturali di *Phoma tracheiphila* e *Pyrenophora graminea* per i quali sono state isolate rispettivamente una tossina parzialmente purificata e due frazioni tossiche; nella interazione *P. tracheiphila*/limone sono state rigenerate piante insensibili alla tossina da calli embriogenici nucellari, rivelando una buona capacità selettiva di tale sostanza; nell'altro caso non è stato invece osservato alcun chiaro effetto differenziale tra i genotipi di orzo. Il filtrato colturale di *Phytophthora infestans* e gli enzimi pectici purificati dal filtrato colturale di *Rhizoctonia fragariae* si sono rivelati buoni agenti di selezione *in vitro*, in quanto hanno consentito di ottenere cloni di patata e di fragola

resistenti ai relativi patogeni.

**Parole chiave:** Selezione per resistenza alle malattie, Tossine, Filtrati culturali.

### **Culture filtrates and toxins in the selection of disease resistant plants.**

In some cases, *in vitro* selection with toxins or culture filtrates of plant pathogenic microorganisms allowed to improve the efficiency of plant breeding programmes by contributing to isolate disease resistant plants. The use of toxins should be preferred to that of culture filtrates because they are pure substances which do not cause artefacts and do not falsify the results of *in vitro* selection. In the present paper, experimental results on the use of toxins or culture filtrates as selective agents in some host-pathogen interactions of agronomical interest are reported. Culture filtrates of *Ascochyta rabiei* and *Phytophthora nicotianae* are able to express a discriminating effect on lines and varieties with different reaction to the pathogen, respectively in chickpea and tomato. A similar effect was not observed for the culture filtrates produced by *Phoma tracheiphila* on lemon and *Pyrenophora graminea* on barley, for which respectively a partially purified toxin and two toxic fractions were isolated. In the interaction *P. tracheiphila*/lemon, regeneration of plants insensitive to the toxin from embryogenic nucellar calli revealed a good selective ability of the substance, while any clear differential effect was observed among the genotypes of barley. The culture filtrate of *Phytophthora infestans* and the pectic enzymes purified from *Rhizoctonia fragariae* culture filtrate showed to be efficient as *in vitro* selective agents because they allowed to select clones of potato and strawberry resistant to corresponding pathogens.

**Key words:** Selection for disease resistance, Toxins, Culture filtrates.

---

Petria 6(Suppl.1), 219-232 (1996), Articolo Scientifico/Scientific paper

### **Metodologie citogenetiche avanzate per il trasferimento di geni di resistenza a stress biotici in *Solanum* e *Triticum* spp.**

LUIGI FRUSCIANTE<sup>1</sup>, DOMENICO CARPUTO<sup>1</sup>, MARCO BIAGETTI<sup>2</sup> e CARLA CEOLONI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Agronomiche e Genetica Vegetale, Università di Napoli "Federico II", Via Università, 100, I-80055 Portici, Napoli

<sup>2</sup>Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università della Tuscia, Viterbo, Via S. Camillo de Lellis, I-01100 Viterbo

Le tecniche di manipolazione cromosomica che comportano variazioni della struttura dei cromosomi o del livello di ploidia possono essere utilizzate nel miglioramento genetico per resistenza a stress biotici nelle piante agrarie. In questo lavoro vengono discussi i risultati da noi conseguiti in patata e grano duro applicando tecniche di ingegneria cromosomica. In particolare, vengono riportate le metodologie citologiche utilizzate per trasferire i geni di resistenza alla tracheovorticiliosi da specie diploidi di *Solanum* alla patata coltivata tetraploide, utilizzando aploidi di *S. tuberosum* e mutanti meiotici. Sono inoltre descritte le metodologie di ingegneria cromosomica seguite per trasferire in frumento duro segmenti cromosomici derivanti da *Aegilops longissima* ed *Agropyron*

*elongatum*, recanti i geni di resistenza all'oidio ed alla ruggine bruna, rispettivamente.

**Parole chiave:** Specie selvatiche, Mutanti meiotici, Tracheovercillosi, Oidio, Ruggine bruna, Ingegneria cromosomica.

### **Advanced chromosome manipulation techniques to transfer genes for biotic stress resistance in *Solanum* and *Triticum* spp.**

Chromosome manipulation techniques which enable the variation of chromosome structure and/or ploidy level can be used as an efficient method in breeding for biotic stress resistance in crop plants. This paper is concerned with the results we have obtained in potato and bread wheat by using chromosome engineering. We report on the techniques used to transfer the resistance to *Verticillium* wilt from diploid wild *Solanum* to the tetraploid cultivated potato by haploids and meiotic mutants. Furthermore, we describe the methods of genetic engineering used for the transmission in *Triticum durum* of chromosome segments derived from *Aegilops longissima* and *Agropyron elongatum*, which carry genes for resistance to mildew and rust, respectively.

**Key words:** Wild species, Meiotic mutants, Verticillium wilt, Mildew, Rust, Chromosome engineering.

---

Petria 6(Suppl.1), 233-241, (1996), Articolo Scientifico/Scientific paper

### **Selezione delle piante per la resistenza assistita da marcatori molecolari**

LUIGI CONCILIO<sup>1</sup> e AMELIA BARONE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Agra, Società del Seme S.r.l. - Gruppo Eridania Béghin-Say, Viale della Repubblica, 19, I-48024 Massa Lombarda (RA)

<sup>2</sup>Centro di Studio Miglioramento Ortaggi CNR, Via Università, 133, I-80055 Portici Napoli

Sono riportate alcune metodologie molecolari usate nella "selezione molecolare assistita", in particolare per caratteri di resistenza a malattie. Anche se l'applicazione di queste metodologie è al suo debutto, alcune di queste sono ormai ben affermate ed integrate in diversi programmi di miglioramento genetico, ma per la felice riuscita di questa integrazione l'automazione delle analisi avrà un ruolo determinante.

**Parole chiave:** Marcatori molecolari, Mappa di associazione, Mappaggio geni per resistenza, Bulk segregant analysis, Reazione a catena della polimerasi.

### **Molecular assisted selection for disease resistance**

The application of genetic diagnostics and molecular marker systems for resistance gene mapping is described. Although the application of these techniques in plant breeding programs is in its infancy, some of them are already well established. Automation of several diagnostic steps and data handling is nevertheless required to achieve an efficient and cost effective development of molecular technology for plant breeding

**Key words:** Molecular markers, Linkage map, Resistance gene mapping, Bulk segregant analysis, Reverse transcription-PCR.

## **Meccanismi di difesa delle piante da parassiti animali e selezione per la resistenza**

ANDREA SONNINO<sup>1</sup> e MAURO DI VITO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ENEA, Settore Biotecnologie e Agricoltura, CR Casaccia, Via Anguillarese, 301, I-00060 Roma

<sup>2</sup>C.N.R., Istituto di Nematologia Agraria, Via Amendola, 165/A, I-70126 Bari

Le perdite di produzione causate a livello mondiale da nematodi e da artropodi fitofagi sono di notevole entità e la relativa lotta chimica comporta numerosi problemi. L'ottenimento di piante geneticamente resistenti a tali parassiti risulta quindi essere una strategia molto interessante. I meccanismi di difesa delle piante dai nematodi possono espletarsi all'esterno della pianta, mediante escrezioni radicali, o all'interno della pianta, mediante barriere meccaniche alla penetrazione dei fitofagi e di ipersensibilità. La difesa delle piante dagli insetti si esplica attraverso tolleranza, o capacità di sopportare il danno, antixenosi (o perdita delle caratteristiche di ospite), o antibiosi, ossia la capacità della pianta di esercitare effetti negativi sul fitofago. L'efficacia della resistenza ai parassiti animali risulta dalla combinazione del suo grado e dalla sua durata. Le resistenze delle piante esercitano infatti una pressione selettiva sul fitofago, che può originare nuovi biotipi in grado di superare la resistenza stessa. La selezione di piante resistenti deve tener conto del tipo di resistenza che si intende selezionare e può essere effettuata in campo, in serra o in laboratorio. Non è stato fin ad adesso possibile ottenere piante transgeniche resistenti ai nematodi fitoparassiti, ma sono stati isolati alcuni geni che codificano per proteine nematocide che potrebbero essere utilizzati a tale scopo. Un'altra strategia possibile è quella di utilizzare geni che codificano per proteine fitotossiche sotto il controllo di promotori altamente specifici per i siti di infezione. Molti geni che codificano per sostanze tossiche per insetti fitofagi sono stati isolati e sono stati trasferiti o sono in corso di trasferimento in piante coltivate. Piante transgeniche di mais, di pomodoro e di patata sono attualmente in prova in numerosi Paesi e saranno presto commercializzate.

**Parole chiave:** resistenza genetica, nematodi, artropodi, insetti, fitofagi, miglioramento genetico, piante transgeniche.

### **Defence mechanisms of plants from parasitic animals and selection for resistance.**

The production losses provoked world-wide by nematodes and phytophagous arthropods are of high level. Concerns about the chemical control of these pests raise the interest for the selection of genetically resistant plants. Plant mechanisms of defence from nematodes can take place outside the plant, by root exudates, or inside the plant, by mechanical barriers to penetration or by hypersensitivity response. Resistance to insects can be distinguished in the forms of tolerance, or capability of limiting the production losses, of antixenosis, or lack of host characters, and of antibiosis, or the capability of the plant of exercising negative effects on the phytophagous. The efficacy of the resistance is given by the combination of its level and of its duration. Resistance causes in fact a selection pressure on the populations of the pests, that can develop new biotypes capable

of overcoming plant resistance. The methodologies of selection for resistant plants must take into account the type of desired resistance and can be performed in field, greenhouse or in laboratory. Transgenic plants resistant to parasitic nematodes have not yet been obtained, but some genes encoding for nematocide proteins have been isolated and can be used for this purpose. An alternative strategy is represented by the transfer of genes with phytotoxic effect under the control of promoters highly specific for the infection sites. Several genes encoding for compounds toxic for insects have been isolated and transferred to plants. Transgenic plants of maize, tomato and potato are currently tested in field trials in several European countries and will be soon available for the farmers.

**Key words:** genetic resistance, nematodes, arthropods, insects, phytophagous, plant breeding, transgenic plants.