



Relazione scientifica finale - Short term mobility (Anno 2009)

**Valutazione ed impiego di mutanti naturali di specie di *Fusarium* per la lotta biologica a specie infestanti fitoparassite di *Orobanche***

**Fruitore:** Angela Boari

**Proponente:** Maurizio Vurro

**Ente presso il quale è stata realizzata la ricerca:** Department of Plant Sciences and Plant Pathology, College of Agriculture, Montana State University, Bozeman, USA

**Periodo di attività:** 30/09/2009-20/10/2009

**Introduzione**

Il genere *Orobanche* comprende specie oloparassite di importanti colture agrarie, diffuse principalmente nelle zone temperate dell'Eurasia ma anche nel Nord e Sud America, in Africa ed Australia. In Italia, particolarmente dannose risultano *O. ramosa*, specie per le colture di pomodoro, tabacco e cavolfiore, e *O. crenata*, parassita delle principali leguminose. Queste specie producono semi di dimensioni ridottissime e di lunga vitalità che germinano, se stimolati dagli essudati radicali della pianta ospite, formando dapprima un tubulo germinativo e poi un austorio attraverso il quale sottraggono alla coltura acqua ed elementi nutritivi. È nella fase ipogea del ciclo, quella che segue la formazione dell'austorio, che viene perpetuato il danno maggiore alla coltura parassitizzata. Studi effettuati in agro di Foggia per valutare gli effetti dell'infestazione di *O. ramosa*, sulla produzione di pomodoro e cavolfiore hanno evidenziato una sensibile tendenza delle colture attaccate a diminuire sia la vigoria vegetativa che la produttività in relazione al crescere della pressione dell'infestazione e, presumibilmente, alla precocità con cui la pianta parassita inizia a svilupparsi. Interventi tardivi effettuati alla comparsa dei turioni non preservano la pianta dall'attacco parassitario e potrebbero comportare per il pomodoro una perdita in peso delle bacche quantificabile tra 6 e 20 t/ha. Poiché la lotta basata sull'impiego di prodotti chimici di sintesi si è rivelata costosa e difficile da realizzare, anche con l'impiego di erbicidi selettivi, negli ultimi anni si è andata consolidando la ricerca di metodi alternativi, basata fra l'altro sull'uso di microrganismi fitopatogeni e/o loro metaboliti. Considerato che le fasi iniziali del ciclo biologico delle orobanche sono quelle più cruciali appare oltremodo interessante ed innovativo attuare una strategia di lotta mirata, precoce e basata sull'uso di prodotti naturali, funghi e/o metaboliti, la cui attività può interferire con il normale processo di sviluppo della pianta infestante.

L'interesse verso queste tematiche si è concretizzata nell'attuazione di numerosi progetti di ricerca e attività di collaborazione fra varie istituzioni di ricerca.



Le ricerche condotte presso l'ISPA hanno consentito di isolare ed identificare diversi microrganismi, la maggior parte dei quali appartenenti al genere *Fusarium*, con differente grado di virulenza verso orobanche. Particolarmente interessanti come potenziali micorbicidi, e ancora oggetto di studio per valutarne le potenzialità applicative, sono risultati un isolato di *Fusarium oxysporum* (denominato FT2) e uno di *F. solani* (ET4).

Studi successivi sull'uso di alcuni amminoacidi naturali hanno dimostrato che alcuni di essi sono in grado di inibire, in diversa misura, la germinazione dei semi della pianta parassita o di causare malformazioni al tubulo germinativo. In particolare si è visto che l'arginina inibiva la germinazione dei semi di orobanche fino alla concentrazione 1 mM, mentre per la metionina si è osservato, oltre ad una riduzione della percentuale di germinazione, una evidente deformazione del tubulo germinativo.

Sulla base di queste osservazioni e in relazione ai risultati già ottenuti, si è pensato di realizzare un progetto con il fine di migliorare l'efficacia dei due micorbicidi mediante la selezione naturale di funghi iperproduttori di amminoacidi.

La linea di ricerca è stata condotta presso i laboratori del Department of Plant Sciences and Plant Pathology, Montana State University di Bozeman, come prosecuzione di una collaborazione in atto con i proff. David C. Sands e Alice Pilgeram.

#### Attività svolta

Al fine di ottenere mutanti iperproduttori di amminoacidi, gli isolati FT2 ed ET4 sono stati sottoposti all'azione di 30 analoghi specifici di amminoacidi (vedi tabella).

Una sospensione conidica (100 µl con  $10^6$ - $10^7$  conidi per ml) ottenuta facendo accrescere i funghi su un substrato solido ricco (PDA, potato dextrose agar, DIFCO) è stata distribuita sulla superficie di piastre Petri, contenenti un substrato minimale, CUTS (Czapek-Dox broth, uracil, thiamine, complesso vitaminico, agar). Sul margine esterno di ciascuna piastra era stato preventivamente creato un pozzetto in cui erano stati aggiunti 300 µl di una soluzione sterile, a concentrazione 0,1 M, dell'analogo da saggiare.

Le piastre sono state quindi messe ad incubare in camera termostata a 25° C e giornalmente osservate per visualizzare la possibile presenza di un alone d'inibizione della crescita fungina, e l'eventuale comparsa di colonie resistenti.

Lo screening effettuato con i 30 differenti analoghi ha consentito di isolare mutanti iperproduttori di metionina e possibili mutanti iperproduttori di triptofano. Nello specifico, sono stati individuati almeno tre mutanti per *F. solani* (denominati 3C1a, 2A2, 3D2) e due per *F. oxysporum* (2G2 e 4B1) resistenti all'analogo M1.

La determinazione della produzione di metionina è stata quindi condotta utilizzando un lattobacillo auxotrofo, un microrganismo cioè in grado di crescere solo in presenza e in relazione alla quantità di amminoacido presente. Filtrati colturali dei mutanti oggetto di analisi, autoclavati per eliminare resti di spore e frammenti di micelio del fungo, sono stati addizionati ad un substrato selettivo (Methionine Assay Medium, DIFCO) e poi inseminati con il microrganismo indicatore.

L'incremento di crescita del batterio è stato valutato con l'uso di uno spettrofotometro e quindi, indirettamente, il dato correlato alla quantità di metionina presente nel filtrato.

I risultati ottenuti, oggetto di ulteriori verifiche, hanno evidenziato, rispetto al testimone, un minimo incremento di crescita del batterio nel campione 3C1a.

Le ricerche condotte presso il Department of Plant Sciences and Plant Pathology, Montana State University di Bozeman, hanno permesso di continuare la proficua collaborazione già in atto con tale istituto, ha consentito di approfondire la tematica sull'uso delle sostanze naturali, e di programmare analisi per la quantificazione della metionina e saggi biologici per valutare la degli isolati iperproduttori.

**Tabella 1.** Elenco di analoghi di amminocidi utilizzati per lo screening di isolati iperproduttori di aminoacidi.

Numero	Sigla *	Prodotto	Ditta	Codice
1	Y1	$\alpha$ -Methyl-DL- <i>m</i> -tyrosine	Sigma	M8877
2	Y2	<i>m</i> -Fluoro-DL-tyrosine	Sigma	F4505
3	Y3	<i>N</i> -Acetyl-L-tyrosine	Sigma	A2513
4	Y4	<i>N</i> -Acetyl-L-tyrosine ethyl ester monohydrate	Sigma	A6751
5	L1	D-Norleucine	Sigma	N 6627
6	L2	4-Aza-DL-leucine dihydrochloride	MP Biomedicals LLC	100837
7	L3	L-Leucinamide hydrochloride	MP Biomedicals LLC	102151
8	L4	L-Canavanine	Sigma	C1625
9	K1	H-Lys(Z)-OH	Sigma	C7573
10	K2	L-Lysine hydroxamate hydrochloride	Sigma	L9001
11	K3	-(2-Aminoethyl)-L-cysteine hydrochloride	Sigma	A2636
12	M1	L-Selenomethionine	TCI-Europe	S0442
13	M2	$\alpha$ -Methyl-DL-methionine	Sigma	M4252
14	M3	L-Methionine sulfoxide	Sigma	M-1126
15	M4	DL-Ethionine	Sigma	E5139
16	P1	<i>trans</i> -4-Hydroxy-L-proline	Sigma	H5534
17	P2	L-Azetidine-2-carboxylic acid	Sigma	A0760
18	P3	3-Azetidinecarboxylic acid	Sigma	391131
19	V1	DL-Valine hydroxamate	Sigma	V3251
20	V2	L-Norvaline	Sigma	N7627
21	V3	DL-3-Hydroxynorvaline	Sigma	H4002
22	V4	L-Valinol	Sigma	V4127
23	V5	L-Valinamide hydrochloride	Sigma	V0625
24	V6	DL-Penicillamine	Sigma	P5125
25	W1	5-Fluoro-DL-tryptophan	Sigma	F0896
26	W2	L-Tryptophan hydroxamate	Sigma	T1255
27	W3	DL-7-Azatryptophan hydrate	Sigma	A1632
28	W4	4-Fluoro-DL-tryptophan	Sigma	F7376
29	W5	L-Tryptophanamide hydrochloride	Sigma	T0629
30	R1	L-Arginine hydroxamate hydrochloride	Sigma	A7380

**\*Legenda**

Y= tyrosine, L= leucine, K = lysine, M = methionine, P = proline, V = valine, W = tryptophan, R = arginine



### Bibliografia

- BOARI A., M.VURRO, 2004. Evaluation of *Fusarium* spp. and other fungi as biological control agents of broomrape (*Orobanche ramosa*), *Biological Control*, 30, 212-219.
- FRACCHIOLLA M. e A. BOARI, 2003. Effetti dell'infestazione di *Orobanche ramosa* sulla produzione di pomodoro e cavolfiore. *Informatore Fitopatologico*, 2, 52-53.
- THOMPSON BRIAN M., M.M. KIRKPATRICK, D.C. SANDS, 2007. Genetically enhancing the efficacy of plant pathogens for control of weeds. In *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management. NATO Science for Peace and Security Series*, Springer, The Netherlands, 267-275.
- VURRO M., A. BOARI, 2006. Natural compounds for novel strategies of parasitic plant management. In: *Natural Products for Pest Management, ACS Symposium Series 927* (A. Rimando & S. Duke eds.), ACS Press, Washington DC, USA, Chapter 6, 76-87.
- VURRO M., A. BOARI., A.L. PILGERAM, D.C SANDS, 2006. Exogenous amino acids inhibit seed germination and tubercle formation by *Orobanche ramosa* (Broomrape): Potential application for management of parasitic weeds. *Biological control*, 36, 258-265.

Il fruitore  
(Dr. Angela Boari)

Il proponente  
(Dr. Maurizio Vurro)