



Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
119° (2001), Vol. XXV, pp. 463-476

ALBERTO MATTA * – FRANCESCA CARDINALE *

Possibili strategie per l'ottenimento di piante transgeniche resistenti a funghi e batteri **

Riassunto – Sono descritte nelle linee generali le strategie per la costituzione di varietà di piante transgeniche per resistenze a patogeni fungini e batterici, con specifico riferimento a quelle che si avvalgono di geni dei naturali meccanismi di resistenza delle piante stesse. Tra questi sono separatamente considerati i geni di difesa, con particolare riguardo per quelli codificanti proteine antimicrobiche (PRs = Pathogenesis Related Proteins) ed altre ad azione antimicrobica diretta, ed i geni di resistenza preposti al riconoscimento dei patogeni e quindi all'innescio delle difese postinfettionali tipicamente comprese nella reazione di ipersensibilità. Sono brevemente esaminati i vantaggi ed i limiti di entrambi i tipi di strategie e sottolineato il fatto che un netto salto qualitativo nella lotta genetica contro i patogeni richiederà la costituzione di piante resistenti al complesso dei patogeni di una coltura o, quanto meno, a tutte le razze di patogeni particolarmente distruttivi. Alcune delle più significative strategie a tal fine seguite sono ricordate.

Summary – *Approaches for the production of transgenic plants resistant to fungi and bacteria.* Some of the strategies that have been followed for the production of transgenic plant varieties resistant to fungal and bacterial pathogens are outlined with emphasis on those taking advantage of the natural resistance mechanisms of plants. Advantages and limitations of the use of defence genes, mainly those encoding antimicrobial proteins (PRs = Pathogenesis Related Proteins, among others) directly active on the pathogen, and of resistance genes involved in the plant-pathogen recognition events that trigger the postinfectious expression of the defenses typical of the hypersensitive reaction, are separately considered. It is stressed that a decisive improvement of the genetic control of plant diseases requires the production of plant varieties resistant to most pathogens of a crop or, at least, to all the physiological races of economically important pathogens. A few of the strategies that are followed to this purpose are mentioned.

* Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali, Università degli Studi di Torino.

** Relazione presentata al Primo Convegno Nazionale della U.N.A.S.A. su «Biotecnologie agroalimentari, industriali, ambientali: problemi e prospettive», Roma, 1-2 ottobre 2001.

In confronto alla produzione di piante transgeniche resistenti a insetti e virus, già ampiamente diffuse in coltivazioni extraeuropee, la produzione di piante transgeniche commercialmente sfruttabili resistenti a batteri e funghi patogeni è in sensibile ritardo. Ciò non dipende da disinteresse degli studiosi – questi, anzi, hanno sviluppato in questi ultimi anni un numero straordinario di ricerche sull’argomento – ma, presumibilmente, dalle complicazioni dovute alla maggior complessità molecolare delle interazioni tra le piante e questi patogeni. Tuttavia l’entità delle ricerche e la varietà delle strategie attuate lasciano ben sperare che l’obiettivo finale dell’ottenimento di varietà transgeniche resistenti a patogeni in misura praticamente soddisfacente e presentanti sensibili vantaggi su quelle costituite con metodi tradizionali potrà essere raggiunto entro il primo decennio del duemila.

Le strategie a tal fine esplorate sono diverse e quanto mai eterogenee (Herrera-Estrella *et al.*, 1996) e pertanto, dato il tempo a disposizione, l’attenzione verrà concentrata su quelle che mirano ad avvalersi di geni delle piante stesse, per altro forse meno contestabili sul piano igienico-sanitario ed ecologico, evitando in questa occasione di considerare quelle basate sull’utilizzazione di geni di organismi diversi dalle piante (lisozimi animali, fattori batterici di resistenza a tossine, AHLlattonasi da *Bacillus* sp. capaci di disturbare i segnali di virulenza batterici di tipo «quorum sensing», ecc.).

Le piante dispiegano contro i patogeni difese interamente costitutive, costitutive ma amplificate dallo stimolo infettivo oppure interamente postinfettionali la cui caratterizzazione molecolare potrebbe fornire una fonte molto ampia di geni (di difesa) potenzialmente sfruttabili (Tab. I e II). Ovviamente, ai fini della costituzione di piante transgeniche resistenti queste difese presentano interesse molto diverso. Alcune sono il frutto di meccanismi molecolari molto complessi la cui decodifica-

Tabella I – *Fattori di resistenza preinfettionali (costitutivi) ai patogeni nelle piante.*

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">– Organografia inadatta al contatto con i patogeni o determinante microclimi sfavorevoli– Superfici idrorepellenti– Assenza di stimoli tigmotropici– Stomi impervi o poco numerosi– Disposizione delle brattee gemmarie, fiori e frutti impervi– Robustezza e costituzione chimica della cuticola e delle pareti cellulari; dimensione dei vasi legnosi– Assenza di composti attrattivi e di sostanze nutritive– Assenza di induttori di enzimi– Assenza di recettori di tossine– Inattivatori di tossine o enzimi– Composti antimicrobici (‘proibitine’) |
|---|

Tabella II – *Fattori di resistenza postinfettivi (inducibili) ai patogeni nelle piante.*

- Capsule austoriali
- Papille ed ispessimenti di parete in generale
- Gomme, resine, suberina, lignina
- Materiali granulari invischiati
- Occlusioni vascolari (tille e gomme)
- Lignificazione
- Glicoproteine ricche in idrossiprolina (HPRGP)
- Formazione di tessuti di demarcazione (peridermi)
- Aumento di composti antimicrobici normalmente presenti ('inibitine') e da precursori in seguito a danno cellulare ('postinibitine')
- Sintesi di composti antimicrobici assenti nelle piante sane ('fitoalessine')
- Proteine di patogenesi 'PRs'
- Reazione di ipersensibilità (RI)

zione genetica appare assai improba; altre sono nel contempo fattori di «rusticità» incompatibili con la produttività e le qualità organolettiche dei prodotti. Vale ricordare che la sovraespressione costitutiva di prodotti del metabolismo secondario (composti fenilpropanoidici, terpeni, ecc.) fungenti da fattori di difesa, comportando rischi di aumento di tossicità per l'uomo e gli animali, andrebbe in senso contrario al lungo lavoro di selezione e miglioramento genetico delle piante coltivate operato in passato.

MANIPOLAZIONE DI GENI DI DIFESA

Non a caso, quindi, le vie più facili e inizialmente più seguite – ritenute potenzialmente capaci di dare risultati a breve termine e prive di controindicazioni per la qualità dei prodotti – sono partite dalla clonazione di geni codificanti proteine di difesa dotate di proprietà antimicrobiche, universalmente presenti nei vegetali (Tab. III). Tra queste sono da annoverare in primo luogo alcune proteine di patogenesi (PRs: Pathogenesis Related Proteins) che assieme ad altre proteine di difesa (perossidasi, lipossigenasi, ecc.) si accumulano in seguito ad infezione e stress di varia natura anche in tessuti non direttamente interessati dallo stimolo induttore, ma, si noti bene, anche costitutivamente espresse in particolari organi e tessuti. Le PRs sono state distinte in 5 gruppi in base a dimensione, composizione aminoacidica, affinità sierologica (Bol *et al.*, 1990), ognuno dei quali a sua volta suddiviso nei sottogruppi delle proteine acide extracellulari e basiche vacuolari, la cui espressione è indotta e mediata, spesso in modo differenziato, da stimoli e molecole segnale diversi. Tipicamente, le proteine basiche sono indotte da etilene e metiljasmonato

Tabella III – *Classi di proteine ad accumulo sistemico in seguito a danno localizzato nelle piante* (modificato da Stermer, 1995).

<i>Classe</i>	<i>Possibile ruolo nella difesa</i>
PR-1	Funzione sconosciuta
PR-2 (β -1,3-glucanasi)	Azione sinergica a quella delle chitinasi
PR-3 (Chitinasi)	Antifungine
PR-4	Funzione sconosciuta
PR-5 (simili a Taumatine)	Antifungine; inibizione di α -amilasi e proteasi
SAR 8,2	Funzione sconosciuta
Perossidasi	Rafforzamento della parete cellulare; generazione di radicali liberi tossici
Proteine ricche in glicina	Rafforzamento della parete cellulare
LOX	Generazione di composti a funzione ormonale e di difesa (jasmonati e loro precursori) e volatili antimicrobici
PGIP	Generazione di molecole elicitrici; rallentamento funzione macerante delle poligalatturonasi
Tionine	Generazione di aperture di passaggio per ioni a livello delle membrane cellulari

(Xu *et al.*, 1994) e quelle acidiche da acido salicilico e specie di ossigeno reattive (Ryals *et al.*, 1996). Sono proteine aventi più o meno spiccate proprietà antimicrobiche non sempre associate nella pianta ad altre funzioni note. Il loro meccanismo di azione sui patogeni è conosciuto limitatamente alle PR-2 e PR-3 aventi rispettivamente attività chitinasicca e β -1,3-glucanasica e quindi potenzialmente capaci di degradare i componenti chitini e β -1,3-glucanici delle pareti dei funghi.

Altre proteine antimicrobiche, oltre alle classiche PRs, sono state caratterizzate e clonate: in particolare una ricca famiglia di peptidi di basso p.m. noti come difensine, isolati da semi di svariate piante e tossici per un ampio spettro di funghi patogeni, così come enzimi quali la glucosio ossidasi e la ossalato ossidasi, generatori di idrogeno perossido (García-Olmedo *et al.*, 2001 e suoi riferimenti). L'azione antifungina di questi ultimi è indiretta, legata alla spiccata azione antimicrobica dell'idrogeno perossido. Ancor più indiretta e mediata è l'azione di proteine che inibiscono le poligalatturonasi dei patogeni (PGIP). Queste non arrestano completamente la degradazione delle pectine ad opera degli enzimi esogeni ma determinano l'accumulo di oligogalatturonidi con indice di polimerizzazione compreso tra 9 e 13 che fungendo da elicitori endogeni, determinano accumulo di fitolessine (Cervone *et al.*, 1989). Particolarmente promettente sembra essere lo sviluppo di peptidi sintetici potenzialmente trasferibili in piante, dotati di attività antimicrobica ancor più delle difensine naturali (Powell *et al.*, 1995).

L'espressione in varie piante coltivate (tabacco, carota, pomodoro, colza, patata, riso e grano) di geni di proteine antimicrobiche è effettivamente risultata in aumenti di resistenza nei confronti di patogeni sia necrotrofi come *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* o *Pythium* spp, sia biotrofi come *Peronospora tabacina*, *Phytophthora infestans*, *Erysiphe heraclei* (Tab. IV, Melchers and Stuijver, 2000). Sono stati soprattutto utilizzati geni delle PR2 (glucanasi) e PR3 (chitinasi) ma anche delle PR1, PR5 e SAR8.2. L'accumulo di una fitoalessina, il resveratrolo della vite, ed un conseguente aumento di resistenza sono stati ottenuti trasferendo dalla soia nel tabacco il gene di una stilbene sintasi (Hain *et al.*, 1993).

Nel complesso i risultati ottenuti con l'espressione di una sola proteina antifungina sono stati solo parzialmente soddisfacenti e non migliorabili in misura significativa nemmeno mediante la coespressione di più copie di un medesimo gruppo di geni. Più efficace è risultata la combinazione di transgeni appartenenti a tipi diversi di PR. La coespressione ad es. di chitinasi e glucanasi eterologhe ha prodotto un aumento più che addizionale della resistenza a *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* impartita da ciascun gene singolarmente preso, rispettivamente in pomodoro e in tabacco (Jongedijk *et al.*, 1995; Jach *et al.*, 1995). Tuttavia ciò non sembra solo dipendere da una esaltazione dell'attività litica sulle pareti fungine visto che effetti sinergici di resistenza a *R. solani* sono stati osservati in tabacco per una chitinasi ed una proteina RIP (Ribosome Inhibiting Protein) da orzo (Jach *et al.*, 1995).

Il fatto che, con l'eccezione della PR1, risultino più efficaci i transgeni delle PR basiche, localizzate nel vacuolo, suggerisce che, specialmente contro i biotrofi, le PR intervengano soprattutto dopo decompartmentazione cellulare. Tuttavia, il meccanismo d'azione delle proteine antifungine nelle piante transgeniche non è molto chiaro e non è in particolare dimostrato che esse agiscano direttamente. Di fatto, il transgene della chitinasi impartisce resistenza a oomiceti, la cui parete è notoriamente priva di chitina e, d'altra parte, rivela una selettività di azione verso specie di funghi diversi, tutti chitinici, spiegabile in parte con il diverso tipo di colonizzazione, inter o intracellulare, messo in atto dai patogeni e in parte inspiegabile. Inoltre la resistenza acquisita non è sempre correlata con il livello di espressione del transgene (vedere ad esempio: Alexander *et al.*, 1993).

L'impiego di un tipo di geni come quello delle PRs estremamente conservato nel regno vegetale si configura come una strategia relativamente morbida che se non verranno riscontrati concreti rischi di allergicità, presenterà il vantaggio di prevenire eventuali contestazioni d'ordine igienico ed ecologico (Ebner *et al.*, 2001). D'altra parte, proprio la universale presenza di PRs nelle piante può essere motivo di dubbio sull'efficacia dei loro transgeni. È realistico sperare che il semplice potenziamento di questi fattori di difesa sfoci in aumenti di resistenza praticamente soddisfacenti ed efficaci contro un novero sufficientemente ampio di patogeni? La resistenza indotta da infezioni necrotrofe (SAR: Systemic Acquired Resistance), per quanto solo parziale, dipende dalla coordinata espressione di complessi genici ed è noto che piante esprimenti elevati livelli dell'RNA antisense di uno sin-

Tabella IV – *Piante transgeniche con accresciuta resistenza a funghi*. RIP = ribosome-inhibiting protein; AFP = anti-freeze protein (modificato da Melchers & Stuiver, 2000, e suoi riferimenti).

<i>Pianta</i>	<i>Transgene(i)</i>	<i>Patogeno</i>
Tabacco	PR1a, SAR8.2 Chitinasi di classe III Chi-I Chitinasi (fagiolo - CH5B RIP (orzo) Chi-A (<i>Serratia marcescens</i>) Chi+Glu (orzo) Chi+RIP (orzo) Chi (riso)+Glu (<i>M. sativa</i>) Rs-AFP (ravanello)	<i>Peronospora tabacina</i> , <i>Phytophthora parasitica</i> , <i>Pythium</i> <i>Phytophthora parasitica</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Cercospora nicotianae</i> <i>Alternaria longipes</i>
Carota	Chi-I+Glu-I (tabacco) osmotina (tabacco)	<i>Alternaria dauci</i> <i>Alternaria radicina</i> , <i>Cercospora carotae</i> , <i>Erysiphe heraclei</i>
Pomodoro	Chi-I+Glu-I (tabacco)	<i>Fusarium oxysporum</i>
Barbabietola	Chitinasi (fagiolo) Chitinasi (pomodoro/tabacco)	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Cylindrosporium conc</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Phoma lingam</i>
Patata	osmotina Glu-ossidasi Aly AFP	<i>Phytophthora infestans</i> <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Verticillium dahliae</i> <i>Verticillium</i>
Riso	Chitinasi	<i>Rhizoctonia solani</i>
Grano	Aly AFP	<i>Fusarium sp.</i>

golo di questi geni con conseguente repressione della relativa proteina non perdono la resistenza acquisita (Neuenschwander *et al.*, 1996). E, inoltre, aumentando oltre una certa misura il numero di transgeni non ci sarà il pericolo che la loro sovraespressione costitutiva determini competizione metabolica a scapito dei processi di crescita? Non si dimentichi che le PRs sono normalmente assenti da foglie giovani, in forte crescita, che richiedono rapida sintesi di proteine indispensabili per lo sviluppo (Herms and Mattson, 1992).

COMPLEMENTARIETÀ DEI MECCANISMI DI DIFESA; LA REAZIONE DI IPERSENSIBILITÀ

Le insoddisfacenti prestazioni di singoli transgeni codificanti per proteine di difesa sono una logica conseguenza della complessità della innata resistenza delle piante, che dipende da meccanismi non singoli ma numerosi e tra di loro integrati. L'integrazione può avvenire tra meccanismi difensivi preinfenzionali e postinfenzionali nel loro complesso o tra singoli meccanismi nell'ambito di ciascuna categoria. In particolare, per quanto concerne i meccanismi postinfenzionali, vengono attivati con l'infezione una grande varietà di eventi, morfologici e biochimici, che aldilà delle possibili anche se scarsamente dimostrate sinergie, sono certamente capaci, agendo in parallelo o in serie, di dar luogo ad effetti antimicrobici cumulativi. Ciò appare tanto più vero considerando la complessità della reazione di ipersensibilità (RI), processo di morte programmata (Matta, 1999) associato alla localizzazione del patogeno, certamente l'espressione più completa ed integrata dei meccanismi dinamici di difesa, in cui sono coinvolti diverse decine di geni: 19 solo in concomitanza con lo scoppio ossidativo (Hammond-Kosack and Jones, 1996).

Tutte le piante hanno la potenziale capacità di attivare meccanismi di difesa non espressi in assenza di stress, ma l'efficacia di questi nel localizzare e contenere il patogeno assumendo eventualmente il carattere di una RI, dipende dalla tempestività con cui si producono. Questa a sua volta è il risultato di una pronta percezione di molecole segnale del patogeno (gli elicitori), più precisamente, dell'interazione tra prodotti di geni di resistenza (R) della pianta (recettori) e prodotti di geni di avirulenza (*avr*) del patogeno (elicitori o ligandi) (Fig. 1). La funzionalità ai fini della effettiva estrinsecazione della resistenza di meccanismi di difesa e relativi geni che sono altamente aspecifici ed universali, dipende dunque da un evento di riconoscimento altamente specifico reso possibile dalla coincidenza di geni *R* e *Avr*. L'efficienza metabolica del sistema è elevatissima: 10 molecole di recettore per cellula potrebbero bastare per iniziare risposta piena al ligando (Hammond-Kosack and Jones, 1997).

MANIPOLAZIONE DI GENI DI RESISTENZA

La dimostrazione dell'ereditarietà della resistenza alle malattie nelle piante risale all'inizio del secolo scorso. La successiva individuazione di geni di resistenza

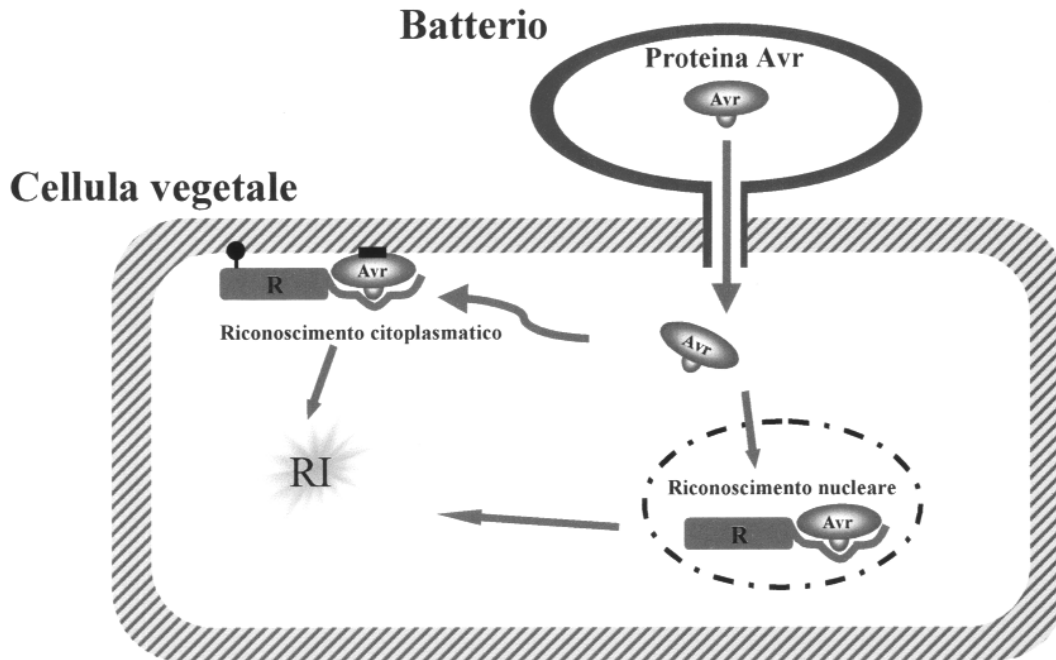


Fig. 1. Modello di interazione tra un batterio avirulento e la pianta ospite. Nell'esempio riportato, una proteina batterica di avirulenza (Avr) è trasferita nella cellula vegetale a mezzo del sistema di secrezione Hrp, dove viene riconosciuta dalla proteina R nel citoplasma, a ridosso della membrana plasmatica o nel nucleo. Il processo di riconoscimento specifico R/Avr sfocia nell'attuazione di risposte di difesa aspecifiche che ostacolano l'infezione. Il riconoscimento intracellulare è caratteristico apparentemente condivisa da modelli pianta/virus e da alcune interazioni pianta/fungo; altri modelli possono prevedere il riconoscimento extracellulare di Avr da parte di R (modificato da Bonas e Ackerveken, 1997).

in numerose varietà e specie non addomesticate ha reso possibile la costituzione mediante incrocio di cultivar, molte tutt'ora valide, resistenti alle specifiche razze di patogeni dotate dei fattori di avirulenza riconosciuti dai prodotti dei geni *R*.

La biologia molecolare si affianca ora alle metodologie convenzionali come strumento innovativo in grado di sfruttare al meglio il patrimonio di geni *R* esistenti in natura. È pregiudiziale a tal fine, oltre all'individuazione, la caratterizzazione e clonazione di tali geni. Il numero dei geni di resistenza a funghi e batteri clonati, di poche unità fino ad alcuni anni addietro, è ora rilevante. Il primo gene *R* clonato è stato il *Pto* (Martin *et al.*, 1993) e ad esso hanno fatto seguito il gene *N* (Whitham *et al.*, 1994) e quindi numerosi altri. Ora con gli approfondimenti avviati sul genoma di *Arabidopsis*, i geni di resistenza clonati cui corrispondono geni *avr* noti ammontano ad alcune decine. Alcuni di essi sono riportati a titolo esemplificativo nella figura 2.


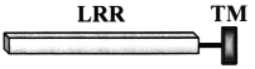

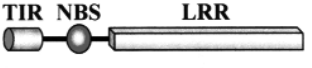


Classe di geni <i>R</i>	Membro rappresentativo ^o	Struttura della proteina*	Omologhi in <i>Arabidopsis</i> [§]
LRR kinasi	Xa21		~174
eLRRs	Cf-9		~30
kinasi	Pto		~100
TIR:NBS:LRR	N		~100
CC:NBS:LRR	RPS2		~65
SA:CC	RPW8.1		5

Fig. 2. Classi di geni *R* clonati e rappresentazione schematica delle strutture proteiche corrispondenti. Non è compresa in questa classificazione il gene *Hm1* per la resistenza del mais a *Helminthosporium maydis* razza 1, che codifica per un enzima detossificante (HC-toxin reductase; Johal *et al.*, 1992). ^o Primo gene clonato della classe * Legenda: LRR = Leucine-Rich Repeats; eLRR = extracellular LRR; TM = TransMembrane sequence; MS = Myristoylation Site; TIR = Toll-Interleukine Receptor; NBS = Nucleotide Binding Site; CC = Coiled Coils; SA = Signal Anchor. [§] Omologia di struttura (non di funzione) dedotta dalle sequenze disponibili (modificato da Jones, 2001).

Il confronto dei geni di resistenza finora clonati rivela una notevole affinità strutturale, in base alla quale è possibile raggrupparli in classi distinte. La maggioranza dei geni *R* clonati appartiene a una tra quattro famiglie conservate, caratterizzate dalla presenza di motivi di sequenza funzionalmente distinti (TIR, LRR, TM, NBS, CC e kinasi; vedere la legenda alla figura 2) ed organizzati in una struttura complessivamente definibile come modulare. La caratterizzazione e clonazione di geni *R* ha consentito di espandere le conoscenze sui meccanismi di resistenza e di valutare come utilizzarli al meglio per la protezione delle piante dalle malattie.

La trasformazione genetica offre notevoli vantaggi rispetto ai metodi di miglioramento classici (Michelmore, 1995). Essa rende possibile *a)* il superamento delle

barriere interspecifiche all'incrocio e quindi, in prospettiva, anche l'utilizzazione di resistenze «nonospite»; *b*) la riunione in un unico costrutto di più geni di resistenza efficaci contro patogeni diversi o più razze diverse di un patogeno; *c*) risparmi di tempo indipendentemente dal numero di geni presenti nel costrutto; *d*) il trattamento di costrutti poligenici come unità mendeliane semplici in programmi di ibridazione classica; *e*) l'inserimento senza guasti di resistenze verticali in piante con resistenza orizzontale. L'impiego di miscele di varietà (nelle multicultivar) simili ma dotate ognuna di diversi geni di resistenza anziché di varietà pure è stato teorizzato e praticato con successo come metodo di lotta contro varie malattie fungine (oidi e ruggini dei cereali, peronospora della patata, ecc.) (Wolfe, 1985), ma uno degli inconvenienti di tale pratica sta nella imperfetta isogenicità delle varietà miscelate che si può tradurre in differenze agronomiche e qualitative. Tale inconveniente può essere evidentemente aggirato utilizzando tecniche di transgenesi, tramite le quali è anche ipotizzabile uno sfruttamento ottimale di quei bacini di polimorfismo genetico che sono le serie alleliche per loci *R* di interesse agronomico, con la creazione di multilinee eterogenee per il solo tratto fenotipico della resistenza ad un dato patogeno, e dunque commercialmente interessanti (Jones, 2001).

In definitiva, la trasformazione con geni *R* sarà preferibile ai metodi tradizionali se sarà almeno altrettanto efficace, se eviterà guasti in genotipi altamente pregiati e se permetterà risparmi in termini di tempo, lavoro e costi. Tra le limitazioni di questa strategia permane l'impossibilità teorica e pratica di rispondere all'obiettivo ottimale di produrre piante individualmente resistenti a molti patogeni (o quanto meno a tutte le razze di un patogeno). Anche nell'ipotesi di poter individuare geni *R* polivalenti, appare altamente improbabile arrivare a piante transgeniche resistenti a composti complessi parassitari di specie e razze diverse dei funghi e batteri patogeni su una determinata coltura.

ALTRE STRATEGIE

Per superare tale limitazione sono ipotizzate e sono in fase di studio più complesse strategie. Si mira ad esempio ad individuare o sintetizzare geni *R* in grado di riconoscere geni *Avr* o comunque ligandi fondamentali per la virulenza o la «fitness» di intere specie patogene e quindi efficaci contro l'intera gamma delle loro razze. Si tratterebbe in definitiva di clonare caratteri indispensabili per la sopravvivenza delle popolazioni del patogeno, farli esprimere nella pianta e con esperimenti di espressione transitoria individuare i geni *R* corrispondenti (Laugé *et al.*, 1998).

Altra strategia che, considerate le difficoltà di una perfetta localizzazione nel tempo e nello spazio dell'espressione della RI e di evitarne l'espressione in presenza di stress abiotici generalizzati, appare peccare di eccessivo ottimismo, prevede la produzione di piante esperimenti coordinatamente un gene *Avr* sotto controllo di un

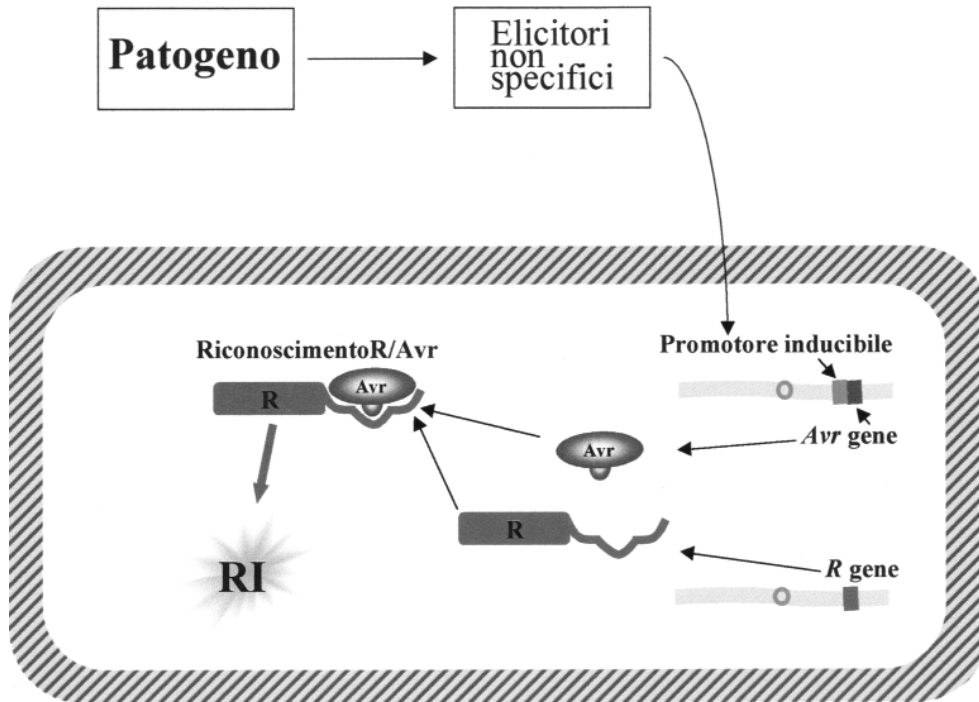


Fig. 3. Applicazione di geni di avirulenza per la lotta contro patogeni vegetali. La strategia proposta da de Wit (1992) prevede che un gene che codifica per una proteina altamente attiva come elicitore sia inserito, sotto il controllo di un promotore funzionale specificamente inducibile da patogeni virulenti, in piante in grado di riconoscere l'elicitore stesso. La produzione di Avr deve essere localizzata e limitata al sito ed al momento della tentata infezione, per evitare morte cellulare generalizzata e dunque danno alla pianta. Tale strategia richiede quindi la generazione di piante transgeniche che producono un elicitore di origine microbica (Avr) in grado di indurre una risposta ipersensibile (RI) all'infezione di patogeni virulenti su piante recanti il corrispondente gene R (inserito naturalmente o per via transgenica).

promotore eterologo inducibile dall'infezione (di qualsivoglia patogeno) ed il corrispondente gene R (Fig. 3) (De Wit, 1992).

In direzione all'opposta punta la costituzione di piante transgeniche in cui la resistenza è legata alla soppressione del processo di morte cellulare tipicamente avviato da patogeni necrogeni. Sorprendentemente, l'espressione transgenica in tabacco dei geni antiapoptotici *Bcl-2* e *Bcl-xl* umani, di *CED-9* del nematode *Caenorhabditis elegans* e di *Op-IAP* di baculovirus è risultata in elevata tolleranza o completa resistenza a patogeni necrogeni quali *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Cercospora nicotianae* e TSWV (Dickman *et al.*, 2001). È possibile che una miglior comprensione del processo di morte programmata nelle piante possa presto consentire l'individuazione di geni di tipo apoptotico vicarianti quelli di origine animale.

CONCLUSIONE

Il quadro complessivo delle manipolazioni genetiche per la costituzione di piante resistenti a batteri e funghi fitopatogeni è in fase di continua evoluzione. Va ribadito che altre strategie, oltre a quelle qui considerate, sono o potranno essere seguite e solo il futuro ci potrà dire quali avranno avuto le migliori ricadute pratiche ed il gradimento socio-politico. Intanto l'elevato numero delle piante sperimentali contenenti caratteri transgenici di resistenza già ottenute è di buon auspicio in vista del traguardo finale della costituzione di piante modificate, agronomicamente superiori, che rappresentino una sostanziale innovazione dei metodi di lotta genetica contro le malattie delle piante sin qui seguiti.

La produzione di piante transgeniche per determinati geni *R*, per quanto importante nell'accelerare il lavoro di miglioramento, non sembra rappresentare un salto di qualità vero e proprio della lotta genetica. Di certo un decisivo cambiamento si otterrebbe con la costituzione di varietà resistenti al complesso delle malattie di una coltura o, quanto meno, di varietà in cui la resistenza ad un singolo patogeno permanesse durevolmente non essendo sopraffatta dalla comparsa di nuove razze del medesimo.

Per aumentare la resistenza con la sovraespressione costitutiva dei geni di difesa delle piante, in teoria ad effetto aspecifico, sarà probabilmente necessario combinare numerose proteine antimicrobiche. È inoltre realistico pensare che risultati migliori siano ottenibili con l'utilizzazione di geni esprimenti proteine antimicrobiche analoghe a quelle delle piante ma provenienti da organismi alieni – come si è ad esempio dimostrato con le chitinasi di funghi antagonisti del genere *Trichoderma* (Lorito *et al.*, 1998) – e forse ancor più con l'utilizzazione di geni esprimenti meccanismi antimicrobici del tutto insoliti per le piante. D'altra parte, con la programmazione artificiale della RI e più in generale della morte cellulare, attraverso la manipolazione dei meccanismi di riconoscimento tipici del rapporto gene per gene o attraverso una più drastica regolazione (negativa o positiva) a valle delle vie di segnalazione, si configurano strategie ancor più sofisticate per il conseguimento dell'obiettivo di una resistenza durevole e, si spera, polivalente.

BIBLIOGRAFIA

- Alexander D., Goodman R.M., Gut-Rella M., Glascock C., Weymann K., Friedrich L., Maddox D., Ahl-Goy P., Luntz T., Ward E. & Ryals J. (1993). Increased tolerance to two Oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *PNAS*, 90, 7327-7331.
- Bol J.F., Linthorst H.J.M. & Cornelissen B.J.C. (1990). Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Ann. Rev. Phytopathology*, 28, 113-138.

- Bonas U. & Van den Ackerveken G. (1997). Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial disease? *Plant J.*, 12, 1-7.
- Cervone F., Hahn M.G., De Lorenzo G., Darvill A. & Albersheim P. (1989). Host-pathogen interactions. XXXIII A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. *Plant Physiol.*, 90, 542-548.
- De Wit P.J.G.M. (1992). Molecular characterization of gene-for-gene system in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathology*, 30, 391-418.
- Dickman M.B., Park Y.K., Ottersdorf W., Li W., Clemente T. & French R. (2001). Abrogation of disease resistance in plants expressing animal antiapoptotic genes. *PNAS*, 98, 6957-6962.
- Ebner C., Hoffmann-Sommergruber K. & Breiteneder H. (2001). Plant food allergens homologous to pathogenesis-related proteins. *Allergy*, 56, suppl. 67, 43-44.
- Garcia-Olmedo F., Rodriguez-Palenzuela P., Molina A., Alamillo J.M., Lopez-Solanilla E., Berrocal-Lobo M. & Poza-Carrion C. (2001). Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence. *FEBS Lett*, 498, 219-222.
- Hain R., Reif H.-J., Krause E., Langebartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmelzer E., Schreier P.H., Stocker R.H. & Stenzel K. (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*, 361, 53-156.
- Hammond-Kosak K.E. & Jones J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8, 1773-1791.
- Hammond-Kosak K.E. & Jones J.D.G. (1997). Plant disease resistance genes, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 575-607.
- Hermis D.A. & Mattson W.T. (1992). The dilemma of plants: to grow or to defend. *Quarterly R. Biology*, 67, 283-335.
- Herrera-Estrella L., Rosale L.S. & Rivera-Bustamante R. (1996). Transgenic plants for disease control. In: Stacey G., Keen N. (eds.), *Plant Microbe Interactions*, Chapman & Hall, N.Y., 1, 33-80.
- Jach G., Gornhardt B., Mundy J., Logemann J., Pinsdorf E., Leah R., Schell J. & Maas C. (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.*, 8, 97-109.
- Johal G.S. & Briggs S.P. (1992). Reductase activity encoded by the *HM1* disease resistance gene in maize. *Science*, 258, 985-987.
- Jones J.D.G. (2001). Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 281-287.
- Jongedijk E., Tigelaar H., van Rockel J.S.C., Bres-vloemans S.A., Dekker I., van den Eltzen P.J.M., Cornelissen B.J.C. & Melchers L.S. (1995). Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica*, 85, 173-180.
- Laugé R., Joosten M.H.A.J., Haanistra J.P.W., Goodwin P.H., Lindhout P. & De Wit P.J.G.M. (1998). Successful search for a resistance gene in tomato targeted against a virulence factor of a fungal pathogen. *PNAS*, 95, 9014-9018.
- Lorito M., Woo S.L., Garcia-Fernandez I., Colucci G., Harman G.E., Pintor-Toro J.A., Filippone E., Nucifora S., Lawrence C., Zina A., Tuzun S. & Scala F. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *PNAS*, 95, 7860-7865.
- Martin G.B., Brommonschenkel S.H., Chunwongse J., Frary A., Ganai M.W., Spivey R., Wu T., Earle E.D. & Tanksley S.D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262, 1432-1435.
- Matta A. (1999). Morte cellulare programmata e reazione di ipersensibilità. *Informatore Fitopatologico*, 2000/6, 5-10.
- Melchers L.S. & Stuijver M.H. (2001). Novel genes for disease-resistance breeding. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 147-152.

- Michelmore R. (1995) Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Ann. Rev. Phytopathology*, 35, 393-427.
- Neuenschwander U., Lawton K. & Ryals J. (1996). Systemic acquired resistance. In: Stacey G., Keen N. (eds.), *Plant Microbe Interactions*, Chapman & Hall, N.Y., 1, 81-106.
- Powell W.A., Catranis C.M. & Maynard C.A. (1995). Synthetic antimicrobial peptide design. *Mol Plant Microbe Interact*, 8, 792-794.
- Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steinre H.-Y. & Hunt M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8, 1809-1819.
- Stermer B.A. (1995). Molecular regulation of systemic induced resistance. In: *Induced resistance to disease in plants*, Hammerschmidt R. & Kuc J. eds., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 111-140.
- Whitham S., Dinesh-Kumar S.P., Choi D., Hehl R., Corr C. & Baker B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 78, 1101-1115.
- Wolfe M.S. (1985). The current status and prospectus of multiline cultivars and variety mixtures for disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathology*, 2, 251-273.
- Xu Y., Chang P.-F.L., Liu D., Narasimhan M.L., Raghothama K.G., Hasegawa P.M. & Bressan R.A. (1994). Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell*, 6, 1077-1085.