

Indice

Riassunto	6
Abstract	8
Introduzione	10
Interazioni microbiche e biocontrollo nella rizosfera.....	11
<i>Plant Growth-Promoting Rhizobacteria</i> (PGPR).....	13
Controllo biologico dei patogeni ad habitat terricolo.....	16
Batteri Gram-negativi agenti di biocontrollo nella rizosfera.....	21
Il genere <i>Pseudomonas</i>	21
<i>Rahnella aquatilis</i>	26
Il genere <i>Fusarium</i>	28
<i>Fusarium oxysporum</i> agente causale del marciume secco (<i>fusarium wilt</i>)	29
Biologia e epidemiologia	30
Ciclo biologico	31
Meccanismi di virulenza	31
Meccanismi di difesa della pianta	32
Metaboliti secondari prodotti da <i>F. oxysporum</i>	33
Ruolo dell'acido fusarico nell'interazione <i>F. oxysporum</i> -pianta-microbioma.....	35
Variabili che influenzano la virulenza di <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	37
Cascate di trasduzione del segnale	42
MAPK in <i>Fusarium oxysporum</i>	42
Scopo della tesi	45

Materiali e metodi	48
Materiale biologico	49
Vettori plasmidici e oligonucleotidi	50
Substrati colturali, buffer e reagenti	50
Substrati.....	50
Buffer e reagenti.....	52
Allevamento e conservazione del materiale biologico.....	52
Ceppi fungini.....	52
Ceppi batterici	53
Piante di pomodoro	53
Prova <i>in vivo</i> su piante di pomodoro.....	54
Interazione <i>in vitro</i> (coltura duale).....	55
Quantificazione del chemiotropismo fungino	55
Produzione e conservazione degli essudati radicali	56
Caratterizzazione <i>in vitro</i> dei ceppi <i>wild type</i> e mutanti di <i>P. fluorescens</i>	57
Valutazione della capacità chelante dei brodi colturali batterici.....	57
Saggio di antagonismo in liquido.....	58
Estrazione dei metaboliti dal brodo colturale del ceppo CHA1242	59
Valutazione delle alterazioni nella rizosfera prodotte dalla proliferazione batterica	60
Produzione e caratterizzazione dei mutanti Δgcd di <i>R. aquatilis</i>	60
Estrazione del DNA genomico.....	60
Estrazione di plasmidi	61

Analisi delle sequenze geniche di <i>Rahnella aquatilis</i> depositate in banca dati.....	62
Realizzazione del costrutto ricombinante.....	62
Preparazione di cellule elettrocompetenti ed elettroporazione.....	63
Saggio di penetrazione di membrane di cellulosa (<i>cellophane</i>) in presenza di <i>R. aquatilis</i>	65
Saggio di adesione alle radici.....	65
Saggio di crescita invasiva su frutti di pomodoro	66
Monitoraggio del pH degli essudati radicali in presenza di <i>F. oxysporum</i> e/o agenti di biocontrollo	66
Caratterizzazione dei brodi colturali di <i>Fusarium oxysporum</i>	67
Produzione dei brodi colturali di <i>Fusarium oxysporum</i>	67
Valutazione della capacità chelante mediante saggio CAS.....	68
Estrazione dell'acido fusarico	68
Analisi dell'acido fusarico mediante TLC	69
Quantificazione dell'acido fusarico in HPLC	69
Valutazione dell'attività inibitoria dell'acido fusarico nei confronti dei ceppi CHH0 e CHA1196 di <i>P. fluorescens</i>	70
Analisi statistica	71
Risultati	72
Caratterizzazione dei mutanti <i>knockout</i> di <i>P. fluorescens</i> ceppo CHA0.....	73
Alterazione del pH e solubilizzazione del fosforo tricalcico.....	73
Analisi del brodo colturale dei ceppi batterici.....	73
Interazione <i>in vitro</i> tra <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> e <i>P. fluorescens</i>	75
Attività inibente delle frazioni estratte dal brodo di coltura del ceppo CHA1241	78

Alterazioni nella rizosfera prodotte dalla proliferazione batterica	78
Prova <i>in vivo</i> su piante di pomodoro	80
Produzione e caratterizzazione di mutanti Δgcd di <i>R. aquatilis</i> ceppo 36	81
Analisi delle sequenze geniche di <i>R. aquatilis</i> depositate in banca dati NCBI	81
Realizzazione del costrutto ricombinante per la produzione di mutanti Δgcd	82
Trasformazione di <i>R. aquatilis</i> e selezione dei ceppi Δgcd	82
Valutazioni fenotipiche dei ceppi <i>wild type</i> e Δgcd di <i>R. aquatilis</i>	83
Monitoraggio del pH nell'interazione <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i> tra <i>R. aquatilis</i> e <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	83
Saggio di penetrazione su membrana di <i>cellophane</i>	85
Saggio di adesione radicale	85
Saggio di crescita invasiva su frutti di pomodoro	86
Interazione <i>in vitro</i> tra <i>R. aquatilis</i> e <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	86
Prova <i>in vivo</i> su piante di pomodoro	86
Caratterizzazione del brodo colturale di <i>Fusarium oxysporum</i>	87
Valutazione del pH e della capacità chelante mediante saggio CAS	87
Quantificazione dell'acido fusarico	89
Valutazione dell'attività inibitoria dell'acido fusarico nei confronti di <i>P. fluorescens</i> ceppo CHA0 e CHA1196	90
Caratterizzazione del brodo colturale dei ceppi di <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i>	91
Discussione	92
Conclusioni	100
Tabelle	104

Figure	109
Bibliografia	168

Riassunto

La capacità di adattamento ambientale mediante variazione del pH è un aspetto fondamentale per il quale sia eucarioti che procarioti investono molto in termini energetici. L'interazione tra *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* e *Solanum lycopersicum* è influenzata dalla reciproca modificazione del pH della rizosfera. Mentre gli essudati radicali tendono ad acidificare l'ambiente extracellulare, la proliferazione di *Fol* produce l'alcalinizzazione dei siti di infezione. Inoltre, le secrezioni radicali creano condizioni che promuovono la proliferazione di differenti microrganismi che a loro volta alterano il pH della nicchia ecologica. I rizobatteri, tra cui anche *Rahnella aquatilis* e *Pseudomonas fluorescens*, condividono gli stessi meccanismi di acidificazione extracellulare, come ad esempio la produzione di acido gluconico grazie all'attività enzimatica della glucosio deidrogenasi (Gcd). In tale ambito, la presente tesi ha avuto lo scopo di valutare il ruolo dell'enzima batterico Gcd, quindi dell'acido gluconico, nel controllo biologico di *Fol*. Sulla base dei risultati ottenuti è possibile affermare che il gene batterico Gcd ha un ruolo chiave nel controllo biologico di *Fol*, ma con implicazioni opposte nei due batteri. In *P. fluorescens* CHA0 la mutazione *knockout* del gene Gcd aumenta l'efficacia dell'attività antagonista nei confronti di *Fol*, dovuta ad una maggiore sintesi di agenti chelanti. Inoltre, analizzando il fenotipo di mutanti *knockout*, singoli e doppi, per geni codificanti per le vie biosintetiche dei composti antifungini, 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) e *pyoluteorin* (PLT), è possibile affermare che queste molecole non hanno un ruolo cruciale nella inibizione fungina. *R. aquatilis* ha una forte attività di acidificazione extracellulare, capacità persa dai mutanti Δgcd . Per quest'ultima specie batterica l'acidificazione della rizosfera può essere considerata la principale modalità di azione di controllo biologico di *Fol*. Infatti, impedendo l'acidificazione della rizosfera, mediante aggiunta di soluzioni tampone oppure per mezzo di mutazioni nel gene Gcd, l'attività antagonista si riduce drasticamente. Come altro analizzato, la produzione di acido fusarico da parte di *Fol*, ha permesso di comprendere meglio l'influenza del pH sulla virulenza di questo patogeno. In generale, i risultati ottenuti hanno evidenziato l'esistenza di una reazione tra produzione di acido fusarico e aumento del pH extracellulare e maggiore capacità chelante del brodo colturale del mezzo di crescita fungina. È stato visto inoltre, come anche la fonte azotata ha influenza sul pH extracellulare e di conseguenza sulla produzione di acido fusarico da parte di *Fol*. Nel ceppo *wild type* di *Fol* la produzione di

acido fusarico è anche risultata alterata da variabili chimiche connesse con la disponibilità di ferro. Infatti, in presenza di agenti chelanti (pioverdina ed EDTA) o pH alcalino tamponato la sintesi di questo metabolita da parte del patogeno aumenta, mentre si riduce drasticamente in presenza di ferro o pH acido tamponato. È stata anche osservata la migliore tolleranza all'acido fusarico da parte del mutante *knockout* Δgcd (ceppo CHA1196) di *P. fluorescens* rispetto al *wild type* (ceppo CHA0), questa tolleranza è stata direttamente proporzionale alla presenza di ferro e / o pioverdina. Infine, analizzando la produzione di acido fusarico in otto ceppi di *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*, è stato possibile associare la secrezione di questo metabolita secondario all'ingiallimento fogliare di piante sintomatiche di cece affette da fusariosi. Sulla base dei risultati ottenuti è possibile concludere che il pH è, al tempo stesso, sia un fattore importante sia per la virulenza di *Fol* sia per il biocontrollo dello stesso da parte di batteri antagonisti. L'alcalinizzazione extracellulare innesca meccanismi di competizione per i cationi (ad esempio il ferro), con conseguente aumento della secrezione di siderofori sia da parte di *P. fluorescens* sia di *Fol*. Considerato il ruolo critico nella di competizione per i cationi di interesse biologico tra il microbioma e la pianta ospite, l'acido fusarico può essere considerato una molecola chelante con attività simile a quella dei siderofori.

In conclusione, il presente studio ha permesso di chiarire il ruolo di alcuni importanti aspetti (pH, siderofori, acido fusarico) coinvolti nei meccanismi di interazione tra patogeno fungino modello e agenti di lotta biologica batterici. I risultati positivi ottenuti aprono la strada a future ricerche volte ad una migliore e più rapida comprensione delle complesse interazioni messe in atto tra microrganismi utili e patogeni fungini ad habitat terricolo, al fine di ottimizzarne il controllo biologico.

Abstract

The main aspect for microbial and plants adaptation is the ability to change the pH in the microenvironment where they are living and this activity require the involvement of additional energy from eukaryotes and prokaryotes. In the trophic interaction between *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (*Fol*) and *Solanum lycopersicum* the influence on the rhizosphere pH is a key factor affecting the results of infection process and disease progress. The root exudates acidify the extracellular environment and, by contrast, *Fol* proliferation alkalinize the infection sites. Roots secretion produce conditions that promotes microbial proliferation, which in turn alter the pH of this ecological niche. The rhizobacteria *Rahnella aquatilis* and *Pseudomonas fluorescens* share the same extracellular acidification mechanisms (i.e. gluconic acid production, glucose dehydrogenase “Gcd” activity). The aim of this PhD thesis was to evaluate the role of the bacterial enzyme Gcd on the biological control of *Fol*. Basing on obtained results it is possible that the Gcd bacterial gene may have a key role in the biological control of *Fol*, but with opposite implication in the two tested bacteria. In *P. fluorescens* strain CHA0 the knockout gene mutation (Gcd) increases the effectiveness in the antagonistic activity against *Fol* by an increase of chelating agents synthesis. Moreover, analyzing the phenotypes of single and double knockout mutants for the antifungal compounds, 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) and pyoluteorin (PLT), it is possible to confirm that these genes don't exert a crucial role in the fungal inhibition. *R. aquatilis* has a strong extracellular acidification activity and such ability is loosed in the Δgcd mutants. For this bacterial species the rhizosphere acidification can be considered the main mode of action in its biological control against *Fol*. Inhibiting the rhizosphere acidification, by using buffer solutions or by Gcd gene disruption, the antagonistic activity is drastically reduced. This finding allowed us to evidence the influence of pH on the virulence of *Fol* by analyzing the fusaric acid production in the pathogen. Collectively the results of this investigation evidence a clear relationship among fusaric acid production, extracellular pH increasing and increasing of chelating agents in the crude cellular culture broth. We also observed how the extracellular pH, and then *Fol* fusaric acid production, can be influenced by the nitrogen sources. In the *Fol*

wild type strain the fusaric acid production is influenced by chemical variables linked with the iron availability. Indeed the presence of chelating agents (pyoverdine and EDTA) or alkaline-buffered pH, the pathogen increases the synthesis of this metabolites, while drastically reduces such compounds in the presence of iron or acid-buffered pH. Furthermore, we observed a better tolerance to fusaric acid by both strains of *P. fluorescens*, CHA0 wild type and CHA1196 Δgcd strain. Finally, analyzing the fusaric acid production in eight strains of *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*, the production of this secondary metabolite can be associated with the yellowing symptom in chickpea plants affected by fusariosis. These results evidenced a crucial role of pH for both *Fol* virulence and biological control of antagonistic bacteria. The extracellular alkalization triggers competition mechanisms for cations (e.g. iron), where *P. fluorescens* and *Fol* increases the siderophores secretion. Fusaric acid can work as a siderophore playing a critical role in the cations competition with microbiome and host plant. In conclusion, the present study clearly evidenced the role of some important factors (i.e. pH, siderophores and fusaric acid) involved in the mechanisms of action between the fungal pathogen (*Fol*, used as a model of study) and two selected antagonistic rhizobacteria. These positive results open the way to future research aimed at a better understanding of the multiple and complex fungal pathogens-bacteria interactions.

Introduzione

Interazioni microbiche e biocontrollo nella rizosfera

Le piante fin dalla germinazione rilasciano dalla radice molecole organiche ad alto valore biologico, questo per mezzo di essudazione, secrezione o deposizione (Cullimore & Woodbine, 1963). La rizodeposizione di composti organici nel suolo attrae, sostiene troficamente e seleziona la popolazione microbica circostante alle radici (rizosfera), creando un'area con condizioni chimico-fisiche peculiari ben distinte dal suolo circostante. In alcune specie la secrezione di molecole organiche nel suolo per mezzo dell'essudazione radicale ammonta a circa il 40 % del carbonio fotosintetizzato. Ciò è possibile grazie a cellule specializzate con una quantità maggiore di mitocondri e il complesso di Golgi più sviluppato, indice di un'intensa attività di secrezione (Hawes *et al.*, 2000, Vité *et al.*, 2005). La rizodeposizione è composta di cellule vegetali che si sfaldano durante l'accrescimento della radice, mucillagini ed essudati radicali (Nguyen, 2003). Gli essudati radicali sono la parte più attiva della rizodeposizione, hanno una composizione molto variabile che dipende dalla specie e varietà vegetale, dallo stadio fenologico, dal substrato di crescita e da eventuali fattori di stress. Da analisi condotte su piante di pomodoro, peperone e mais allevate in condizioni gnotobiotiche, è stata dimostrata la presenza di alte concentrazioni di acidi organici (acido citrico, succinico e malico) e zuccheri (glucosio e fruttosio) (Kamilova *et al.*, 2006, Fan *et al.*, 2012). Le componenti dell'essudato radicale possono distinguersi in due categorie: a) molecole a basso peso molecolare tra cui carboidrati semplici, aminoacidi, acidi organici, ormoni vegetali, vitamine, polifenoli, fosfati, esteri, ioni ed altri metaboliti secondari (Farrar *et al.*, 2003, Bais *et al.*, 2006); b) molecole ad alto peso molecolare costituite da enzimi, proteine e polisaccaridi. Queste ultime sono più significative in termini di massa totale ma meno eterogenee rispetto alla prima classe di molecole (Bais *et al.* 2006). La composizione degli essudati radicali è fortemente influenzata dalla componente microbica che popola l'apparato radicale, tanto che in piante di pomodoro la presenza di *Pseudomonas fluorescens* comporta il globale incremento del contenuto in acidi organici (Kamilova *et al.*, 2006), mentre la presenza del patogeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* ne provoca il

decremento (Kamilova *et al.*, 2006). Un'altra classificazione distingue gli essudati radicali in passivi o attivi a seconda delle modalità di secrezione. L'alta densità microbica nell'area circostante alle radici prende il nome di effetto rizosfera (Prashar *et al.*, 2014). La rizosfera viene distinta in tre regioni: 1) endorizosfera comprende l'endoderma e lo strato corticale; 2) rizopiano è la superficie radicale in cui aderiscono i microrganismi e le particelle di suolo, comprende l'epidermide, il *cortex* e lo strato di polisaccaridi mucilluginosi che circondano la superficie radicale; 3) ectorizosfera comprende il suolo immediatamente adiacente alla radice. A queste tre stratificazioni se ne possono aggiungere altre, ad esempio l'interazione pianta-micorrize determina un ampliamento del volume di suolo ispezionato dall'apparato radicale e quest'area prende il nome di micorrizosfera. Il suolo che non subisce l'influenza della rizosfera prende il nome di *bulk soil* (Prashar *et al.*, 2014). L'entità della popolazione microbica che popola la rizosfera è tale che la densità delle cellule microbiche supera quella delle cellule vegetali. Inoltre il numero di geni microbici oltrepassa di gran lunga il numero dei geni vegetali (Mendes *et al.*, 2013). Coerentemente con la terminologia usata per i microrganismi che popolano il corpo umano (Qin *et al.*, 2010, Zhao, 2010, Gevers *et al.*, 2012) la collettività microbica associata alla pianta è chiamata microbioma, mentre in termini di complessità genetica si definisce *plants' other genome*. I microrganismi influiscono fortemente sulla fisiologia vegetale tanto che le piante possono essere considerate dei super-organismi che basano specifiche funzioni sul microbioma. In alcuni casi gli essudati radicali possono essere fonte di inibizione per il microbioma, infatti è noto come la vulnerabilità di alcune specie o varietà vegetali nei confronti dei patogeni fungini scaturisce dall'influenza (positiva o negativa) degli essudati sulla germinazione conidica (Scheffknecht *et al.*, 2006). La presenza e l'accumulo di molecole antimicrobiche negli essudati radicali può scaturire dall'interazione della pianta con un patogeno come meccanismo di difesa. A tal riguardo ad esempio, alcune ricerche scientifiche descrivono come l'interazione di *Pythium ultimum* con piante di basilico determina l'aumento del contenuto di molecole antimicrobiche nell'essudato radicale, come acido rosmarinico o acido caffeico, con effetti sull'intero microbioma (Bais *et al.*, 2002). Gli essudati radicali inoltre sono un importante strumento di comunicazione pianta-pianta (allelotropie) o pianta-microbioma generando fenomeni di attrazione o repulsione (Walker *et al.*, 2003) (figura 1). La composizione degli essudati radicali, che varia da specie a specie, condiziona la proliferazione microbica selezionandola, al punto da generare un microbioma specie specifico. Studi condotti su fragola, colza e patata dimostrano una chiara e stabile associazione pianta microrganismi (Smalla *et al.*, 2001).

Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)

Nel microbioma e/o tra il microbioma e la pianta si instaurano complesse interazioni. Queste variano da interazioni neutrali o benefiche, fino a deleterie quando sono coinvolti microrganismi fitopatogeni (Lugtenberg *et al.*, 2002, Singh *et al.*, 2004). Diversi batteri non fitopatogeni ad habitat terricolo hanno la capacità di promuovere la crescita delle piante e vengono chiamati *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)* (Kloepper *et al.*, 1980, van Loon, 2007). E' stato stimato che il 2-5% dei rizobatteri sono PGPR (Antoun & Prévost, 2006) e questi possono essere distinti in PGPR extra-radicali o PGPR intra-radicali a seconda della localizzazione nella rizosfera (Gray & Smith, 2005). Il numero di specie di rizobatteri annoverate tra i PGPR è in continua crescita e attualmente i generi maggiormente studiati sono *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Streptomyces*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhodococcus* e *Serratia* (Prashar *et al.*, 2014). La fitostimolazione ad opera dei PGPR è il risultato di diversi meccanismi, infatti è possibile distinguerli in meccanismi diretti e indiretti. La promozione della crescita per mezzo di meccanismi diretti scaturisce dalla produzione di molecole benefiche per la pianta o il miglioramento dell'assorbimento di nutrienti. La promozione per via indiretta è basata invece sulla riduzione o prevenzione dell'influenza deleteria di fitopatogeni o di stress di natura abiotica (Glick, 1995). Altra distinzione all'interno dei PGPR tiene conto dei meccanismi d'azione e degli effetti sulla pianta, distinguendo quattro categorie: biofertilizzazione, fitostimolazione e biocontrollo dei patogeni (Bloemberg & Lugtenberg, 2001, Martínez-Viveros *et al.*, 2010).

- **Biofertilizzazione.** L'attività *plant growth promoting* di alcuni rizobatteri scaturisce dalla capacità di aumentare la disponibilità dei nutrienti nella rizosfera. Elementi come azoto, fosforo, potassio e ferro pur essendo abbondanti nel suolo molto spesso non sono adoperabili direttamente dalla pianta in quanto presenti sotto forma insolubile. L'attività metabolica di numerosi batteri nella rizosfera trasforma queste molecole nelle forme assimilabili. Gli apporti per biofertilizzazione possono essere suddivisi in: azotofissazione, solubilizzazione di fosforo, potassio e ferro. E' stato stimato che la biofertilizzazione apporta alle colture circa il 60% dell'azoto necessario, questo è possibile grazie alla fissazione dell'azoto atmosferico in azoto organico. L'azoto in forma molecolare (N₂) costituisce il 78% dell'atmosfera, benché sia così abbondante

le piante non riescono ad utilizzarlo come fonte di azoto. L'azoto atmosferico è trasformato nelle forme molecolari utilizzabili grazie all'attività di alcune specie batteriche per mezzo del complesso enzimatico conosciuto come *nitrogenase*. La fissazione biologica dell'azoto atmosferico ad opera batterica può seguire due meccanismi: simbiotico e non simbiotico. Il meccanismo più efficace è quello simbiotico operato dai batteri appartenenti al genere *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Allorhizobium*. La peculiarità di questi generi batterici è la capacità di instaurare interazioni simbiotiche con le leguminose (Spaink, 2000), producendo i noduli entro i quali si creano le condizioni biochimiche ottimali per il processo di azotofissazione (Oldroyd & Downie, 2008). Non va trascurata l'azotofissazione prodotta da batteri non simbiotici per questo chiamati azotofissatori liberi. Si tratta sostanzialmente di batteri appartenenti ai generi *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Diazotrophicus*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Rahnella* (Vessey, 2003, Bhattacharyya & Jha, 2012). Il fosforo è un elemento chiave nella nutrizione vegetale, ha un ruolo importante in diverse attività metaboliche. Nel suolo è presente sia in forma organica che inorganica, ma circa il 95-99% non è assimilabile dalle piante in quanto insolubile, immobilizzato o precipitato. Alcuni rizobatteri riescono a mineralizzare il fosforo organico oppure solubilizzare il fosforo grazie alla produzione di acidi organici e quindi di pH acido (Kim *et al.*, 1997, Kim *et al.*, 1998, Rodríguez & Fraga, 1999). La solubilizzazione del fosforo nella rizosfera avviene ad opera dei batteri appartenenti ai generi *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Serratia* e *Rahnella* (Vessey, 2003). Il potassio, dopo azoto e fosforo, è il terzo nutriente maggiormente assorbito dalle piante. Anche questo elemento è poco presente nella forma assimilabile, mentre abbonda nelle forme insolubili come rocce o silicati (Meena *et al.*, 2015). Alcuni PGPR sono capaci di solubilizzare il potassio grazie alla produzione e secrezione di acidi organici, i batteri per i quali è stata descritta questa capacità sono *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Bacillus edaphicus*, *Bacillus mucilaginosus*, *Burkholderia*, *Paenibacillus* e *Pseudomonas* (Liu *et al.*, 2012). Il ferro è un micronutriente essenziale per tutti gli organismi della biosfera. Nonostante sia il quarto elemento più abbondante sulla terra, in terreni aerobi il ferro non è facilmente assimilabile dalle piante, questo perché il ferro ferrico, la forma predominante in natura, è scarsamente solubile e quindi poco disponibile. Questo

fenomeno è strettamente legato al pH del suolo, infatti il decremento di pH ne aumenta la solubilità (Colombo *et al.*, 2014). La capacità dei batteri di solubilizzare il ferro è legata alla produzione di siderofori, molecole organiche caricate negativamente capaci di legare stabilmente cationi tra cui il ferro. Mediante l'utilizzo di ferro radioattivo è stato dimostrato come la pianta sia capace di utilizzare il ferro solubilizzato e trattenuto dai siderofori batterici. Nella rizosfera i principali produttori di siderofori sono i generi *Aeromonas*, *Azadirachta*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* e *Streptomyces* (Zhang *et al.*, 2009). Il metabolismo batterico nella rizosfera inoltre aumenta la disponibilità di numerosi altri micronutrienti come ad esempio lo zinco (Prashar *et al.*, 2014).

- **Fitostimolazione.** La fitostimolazione ad opera batterica scaturisce dalla capacità di alcune specie di produrre molecole ormonosimili. Tra i fitormoni l'acido indol-3-acetico, o più comunemente chiamato auxina, ha un'attività fitostimolante con effetto positivo sull'accrescimento radicale. Circa l'80% dei rizobatteri è capace di sintetizzare l'auxina durante la colonizzazione della spermosfera o rizosfera. L'ormone di biosintesi batterica interagendo con quello endogeno della pianta stimola la proliferazione delle cellule vegetali, migliora l'assorbimento radicale di minerali e sostanze nutritive, stimola l'accrescimento radicale e la produzione di radici laterali (Miransari & Smith, 2014). I batteri durante il processo biosintetico dell'auxina adoperano il triptofano come precursore molecolare, questo amminoacido è particolarmente abbondante negli essudati radicali. I generi particolarmente attivi nella produzione dell'auxina sono *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (Shilev, 2013). Alcuni batteri sintetizzano anche citochinine e gibberelline ma con livelli di fitostimolazione inferiori rispetto ai produttori di auxine, in particolare le gibberelline influenzano processi importanti come la crescita del meristema sub-apicale fin dalla germinazione dei semi (Asghar *et al.*, 2002). L'etilene promuove una serie di processi biologici legati alla senescenza della pianta. Il diretto precursore dell'etilene è il 1-amminociclopropanocarbossilato (ACC), attualmente è riportato che alcuni PGPR sono in grado di abbassare il livello di etilene nella pianta attraverso la deaminazione del ACC mediante l'enzima ACC-deaminase ottenendo come risultato un livello più basso di etilene, che si traduce in un minore effetto repressivo di questo ormone sull'accrescimento radicale. (Glick *et al.*, 2007).

- **Biocontrollo dei patogeni.** La repressività del suolo, o di altra matrice destinata alla coltivazione della piante, è definita come la capacità di controllare la proliferazione dei patogeni quindi l'insorgenza della malattia. Questo fenomeno è vero quando in un suolo è presente sia il patogeno che l'ospite suscettibile e ciò nonostante non si verificano manifestazioni sintomatiche. La diversità microbica è uno dei migliori indicatori della sanità del suolo ed è uno dei principali componenti della repressività dello stesso. La repressività può essere generale quando la biomassa microbica totale riduce fino a sopprimere la crescita o gli effetti deleteri di organismi patogeni, mentre la repressività specifica generalmente dipende da un singolo microrganismo con attività antagonistiche nei confronti di un specifico genere o specie di patogeno (Weller *et al.*, 2002). I meccanismi attraverso i quali gli agenti di lotta biologica interferiscono sul processo di patogenesi sono molteplici e nella maggior parte dei casi agiscono in combinazione.

In alcuni PGPR come ad esempio *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter asburiae*, *Rahnella aquatilis* e alcune specie del genere *Rhizobium* è stata riscontrata la capacità di ridurre la fitotossicità di erbicidi o altri di pesticidi, promuovendo la crescita specialmente in terreni particolarmente contaminati da queste molecole (Peng *et al.*, 2012).

Controllo biologico dei patogeni ad habitat terricolo

La coesistenza di un ospite suscettibile, vegetale o animale, con un patogeno non comporta sistematicamente l'insorgenza di una malattia, affinché ciò accada sono necessarie una serie di condizioni che aumentano la vulnerabilità dell'ospite e che siano favorevoli alla proliferazione e/o virulenza del patogeno. In linea generale in un ecosistema maggiore è la complessità biologica e minore è la gravità di eventi perturbanti quali l'attacco di un patogeno o danni da fitofagi. Nell'interazione ospite patogeno il microbioma è una delle variabili che maggiormente ne influenza il risultato. Infatti gli ecosistemi naturali presentano una stabilità maggiore rispetto agli agroecosistemi, più poveri in biodiversità microbica. La complessità della popolazione microbica varia molto tra gli agroecosistemi e la gestione degli stessi condiziona notevolmente questo aspetto. Infatti trattamenti fitosanitari eccessivi e poco selettivi, monocoltura, riduzione della sostanza organica sono tutti aspetti che da un lato selezionano ed impoveriscono la biodiversità microbica dall'altro favoriscono la proliferazione dei patogeni. Nella rizosfera la popolazione microbica esplica un importante

funzione di controllo della proliferazione di patogeni *soilborne*, i microrganismi attivi in tal senso sono chiamati antagonisti. Un antagonista è un microrganismo, batterio o fungo, in grado di contrastare un patogeno, andando ad interferire con il suo ciclo vitale (Baker & Cook, 1974). I meccanismi d'azione degli antagonisti possono essere distinti in diretti ed indiretti. I meccanismi diretti sono quelli che operano nell'ambito dell'interazione antagonista-patogeno, e comprendo il parassitismo, l'antibiosi e la competizione per spazio e nutrienti. Tra i meccanismi indiretti, invece, vengono incluse tutte le alterazioni morfologiche e biochimiche indotte nella pianta ospite dall'antagonista e che si traducono in una maggiore resistenza al patogeno. Una specie microbica molto raramente agisce mediante un solo meccanismo d'azione e molto spesso nelle comunità microbiche sono presenti più specie antagoniste con differenti modalità d'azione. I principali meccanismi di azione dei rizobatteri antagonisti sono i seguenti:

- **Antibiosi.** Spesso l'attività di biocontrollo dei rizobatteri antagonisti è attribuita alla produzione di molecole antibiotiche. Si tratta di metaboliti secondari a basso peso molecolare con effetto deleterio sul metabolismo e la crescita di altri microrganismi (Doornbos *et al.*, 2012). Il coinvolgimento di molecole antibiotiche nel controllo biologico di fitopatogeni nella rizosfera viene verificato prima con saggi *in vitro* e successivamente *in vivo*. La discrepanza dei risultati tra gli effetti *in vitro* e gli effetti *in vivo* rende necessario un ulteriore approfondimento, attualmente si ricorre ad un ulteriore conferma per via genetica producendo mutanti incapaci di sintetizzare il metabolita oggetto di studio e si verificano gli effetti sulle capacità di biocontrollo (Handelsman & Stabb, 1996). Le molecole antibiotiche prodotte dai batteri antagonisti Gram-negativi possono essere distinte in composti derivanti dall'acido cianidrico e le fenazine (Chin-A-Woeng *et al.*, 1998, Schnider-Keel *et al.*, 2000, Mavrodi *et al.*, 2006). Di queste le molecole più importanti sono *phenazine-1-carboxylic acid*; *phenazine-1-carboxamide*; *2,4-diacetyl phloroglucinol*; *pyoluteorin* e *pyrrolnitrin*. (Schnider-Keel *et al.*, 2000, Haas & Keel, 2003, Haas & Defago, 2005) *Zwittermycin A* (Emmert *et al.*, 2004) e *kanosamine* (Milner *et al.*, 1996) sono due antibiotici caratterizzati in *Bacillus cereus*. Di recente scoperta sono l'acido d-gluconico (Kaur *et al.*, 2006) e il *2-hexyl-5-propyl resorcinol* (Cazorla *et al.*, 2006). Anche molecole volatili possono essere coinvolte nella protezione delle piante dai patogeni *soilborne*; tra queste ad esempio il *2,3-butanediol*, che insieme ad altre molecole volatili, viene prodotto da *Bacillus* spp. Infine i lipopeptidi biosurfattanti prodotti dal genere *Bacillus*

e *Pseudomonas* sono implicati nel controllo biologico di numerosi patogeni fungini (de Bruijn *et al.*, 2007, Ongena *et al.*, 2007, Vitullo *et al.*, 2012, Romano *et al.*, 2013).

- **Interferenze nei segnali di attivazione dei geni di virulenza.** Molti batteri fitopatogeni esprimono i geni di virulenza/patogenicità quando la popolazione raggiunge elevate concentrazioni, percependo le molecole legate al *quorum-sensing*, come *homoserine lactones*, che si accumulano nell'ambiente di crescita. Il patogeno batterico *Erwinia carotovora*, agente causale del marciume molle di organi ipogei in numerose colture, esprime i geni codificanti gli enzimi responsabili per la degradazione dei tessuti vegetali solamente quando la concentrazione di *homoserine lactones* raggiunge determinati livelli. Alcune specie di batteri antagonisti sono capaci di degradare l'*homoserine lactones* reprimendo l'espressione dei geni di virulenza. E' il caso di alcuni ceppi di *Bacillus thuringiensis* capaci di idrolizzare l'anello lattonico di questa molecola. Recentemente è stato scoperto il ruolo di questa molecola nella formazione dei biofilm, ed è noto come queste strutture aumentano la resistenza della popolazione batterica ad elementi perturbanti e in alcuni casi sono considerate fattori di virulenza. L'assenza di biofilm aumenta l'efficacia di trattamenti chimici o di organismi antagonisti (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Nei funghi è stata verificata l'importanza dei biofilm nella virulenza nei confronti degli animali (Nucci & Anaissie, 2007), al momento non ci sono pubblicazioni scientifiche che ne dimostrano tale ruolo nell'interazione con le piante. Sicuramente numerosi antagonisti batterici nella rizosfera esplicano la loro attività interferendo con l'espressione di geni di virulenza.
- **Competizione per il ferro.** Come già detto in precedenza il ferro ha un ruolo chiave in numerosi processi metabolici in tutti i viventi. In alcuni contesti, tra cui il suolo, si riscontrano carenze che spingono gli organismi a sviluppare strategie per il mantenimento dell'omeostasi di questo elemento. Per questo motivo si instaurano nel microbioma della rizosfera delle competizioni per il ferro. I batteri a tale scopo hanno sviluppato dei meccanismi di cattura del ferro basati sulla produzione di siderofori, queste molecole una volta inglobato il catione lo scambiano con dei recettori di membrana raggiungendo il citoplasma. Le piante possono beneficiare del ferro legato ai siderofori batterici (Loper & Henkels, 1999) mentre i funghi fitopatogeni no. In *F. oxysporum* la carenza di ferro ne riduce fortemente l'accrescimento attenuandone la virulenza, la presenza di agenti di biocontrollo capaci di secernere siderofori, quali *P. putida* e *P. fluorescens* esaspera questa condizione (López-Berges *et al.*, 2012). La presenza di siderofori inoltre riduce germinazione dei propaguli di *F. oxysporum*

diminuendo la concentrazione fungina nella rizosfera (Simeoni *et al.*, 1987). I siderofori batterici possono essere distinti in *hydroxamate-types*, *thiohydroxamate-types* oppure *catecholate-types* a seconda della molecola dalla quale derivano (Lacava *et al.*, 2008).

- **Competizione per nutrienti e nicchia.** In un ecosistema la competizione per spazio e nutrienti è il principale fattore che regola le dinamiche delle popolazioni microbiche. Questo meccanismo è particolarmente rilevante nel controllo dei patogeni ad habitat terricolo. Alcuni autori definiscono la competizione come “*il tentativo di due o più microrganismi di utilizzare quantità adeguate di un fattore vitale, nella forma e nelle condizioni specifiche in cui il fattore è presente, quando la quantità disponibile non è sufficiente per entrambi*” (Cook & Baker, 1983). Come descritto in precedenza la rizosfera è un importante fonte di carbonio per il microbioma attirando una grande varietà di microrganismi compreso i fitopatogeni. Numerose ricerche scientifiche hanno studiato la natura chimica di questa attrazione individuando le molecole coinvolte nell’attrazione chemiotropica (Currier & Strobel, 1976, Gaworzewska & Carlile, 1982, De Weger *et al.*, 1987, Turnbull *et al.*, 2001, de Weert *et al.*, 2002, Bacilio-Jiménez *et al.*, 2003, Nelson, 2004). L’interazione del microbioma con gli essudati radicali comporta importanti alterazioni nei microrganismi, infatti studi condotti su *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 hanno evidenziato che quest’interazione altera l’espressione nell’8,2% dei geni nel batterio, la maggior parte dei quali sovra espressi. I geni maggiormente espressi attivano vie metaboliche, hanno un ruolo nel funzionamento dei flagelli quindi la motilità e chemiotassi, regolano sintesi di molecole antimicrobiche (Fan *et al.*, 2012). La colonizzazione della rizosfera è strettamente correlata con la capacità degli antagonisti di adattarsi alle condizioni ambientali (pH, temperatura e umidità), capacità che favorisce la rapida colonizzazione dei potenziali punti di accesso del patogeno e la sottrazione di nutrienti, con la conseguente formazione di una vera e propria barriera biologica all’invasione da parte dei patogeni (Cook, 1988).
- **Produzione di enzimi litici.** Una grande varietà di rizobatteri sono capaci di secernere enzimi litici che aggrediscono le strutture cellulari dei fitopatogeni fungini. La produzione di chitinasi è alla base dell’attività antagonistica di *Serratia plymuthica* contro *Botrytis cinerea*, *S. marcescens* contro *Sclerotium rolfsii*, *Paenibacillus* sp. e *Streptomyces* contro *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, *P. stutzeri* contro *F. solani*. Altri componenti delle pareti cellulari fungine sono i β -glucani e l’enzima

responsabile della degradazione di questi polimeri è la β -1,3-glucanase. Questo enzima è responsabile dell'attività antagonistica di *Burkholderia cepacea* contro *Rhizoctonia solani*, *S. rolfsii*, e *P. ultimum* (Compant *et al.*, 2005).

- **Detossificazione e degradazione dei fattori di virulenza.** L'esito positivo nell'interazione ospite patogeno è il risultato dell'espressione di tutti i fattori di virulenza che il patogeno ha a disposizione. L'attività antagonistica, oltre ad interferire sull'espressione dei geni codificanti per i fattori di virulenza, in alcuni casi ne annulla le proprietà deleterie. In numerose specie di funghi fitopatogeni, ed in particolare nel genere *Fusarium*, i metaboliti secondari con attività fitotossiche sono degli importanti fattori di virulenza. Queste molecole hanno degli effetti anche sul microbioma, che può più o meno tollerarle ed in alcuni casi può degradarle. L'attività antagonistica di alcuni PGPR è il risultato della capacità di degradazione o detossificazione dei fattori di virulenza che il fitopatogeno produce durante l'interazione ospite patogeno (Toyoda *et al.*, 1988, Kosawang *et al.*, 2014). Alcuni PGPR, come *P. fluorescens*, riescono a minimizzare la fitotossicità di fitotossine attraverso la produzione di composti chelanti senza agire enzimaticamente sulla molecola (Ruiz *et al.*, 2015).
- **Induzione di resistenza.** L'interazione di alcuni batteri con l'apparato radicale induce l'incremento della resistenza dell'ospite nei confronti di funghi, batteri e virus fitopatogeni. Questo fenomeno è chiamato *Induced Systemic Resistance* (ISR) ed ha numerose caratteristiche in comune con la *Systemic Acquired Resistance* (SAR), ma differiscono in quanto l'ISR è il risultato dell'interazione della pianta con dei rizobatteri non patogeni mentre la SAR scaturisce dall'interazione con dei fitopatogeni. Sia la SAR che ISR aumentano la resistenza a differenti fitopatogeni, però mentre l'ISR non induce sintomi sulla pianta la SAR nella maggior parte dei casi induce la risposta ipersensibile nell'ospite (van Loon *et al.*, 1998). A livello molecolare l'ISR innesca nell'ospite una serie di alterazioni nel *pathway* dell'acido jasmonico e dell'etilene, mentre la SAR in quello dell'acido salicilico. In *Arabidopsis thaliana* la SAR attiva l'espressione delle *pathogenesis related proteins* (PR *proteins*), mentre l'ISR quella dei *priming of defense related genes* (Pieterse *et al.*, 1998). L'ISR è stata descritta per la prima volta in garofano (*Dianthus caryophyllus*) con la riduzione della suscettibilità a *Fusarium* sp. e in cetriolo (*Cucumis sativus*) con la riduzione della suscettibilità a *Colletotrichum orbiculare* (Compant *et al.*, 2005). Attualmente si conoscono diverse specie batteriche capaci di indurre l'ISR, le più importanti appartengono ai generi *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Serratia*, delle quali si

conoscono anche le molecole capaci di indurre tale risposta nella pianta (Van Loon & Bakker, 2006).

Batteri Gram-negativi agenti di biocontrollo nella rizosfera

L'adattamento all'ecosistema suolo e alla rizosfera, nonché la capacità di colonizzare abilmente il capillizio radicale e le strutture dei patogeni fanno dei batteri Gram-negativi degli ottimi agenti di biocontrollo ai patogeni ad habitat terricolo. L'approfondimento scientifico in merito ha fatto di alcune specie batteriche dei modelli di studio per la comprensione dell'interazione microbioma-patogeno e microbioma-pianta. Nel presente paragrafo introduttivo verranno descritte in maniera approfondita le caratteristiche più salienti delle due specie batteriche utilizzate nelle attività sperimentali.

Il genere *Pseudomonas*

Il genere *Pseudomonas* comprende un gran numero di specie di batteri Gram-negativi, caratterizzati da una grossa variabilità metabolica, aerobi (fatto eccezione per alcuni ceppi anaerobi che adoperano il nitrato come accettore di elettroni oppure svolgono la fermentazione dell'arginina). Le cellule batteriche sono dotate di motilità grazie ad uno o più flagelli disposti a livello polare, il genoma di questo genere è ricco in guanine e citosine (59 – 68%) (Haas & Defago, 2005). Procarioti afferenti a tale genere sono stati rinvenuti in tutti i principali ecosistemi e non mancano pseudomonadi che stabiliscono rapporti di varia natura con piante e animali. La rilevanza e la complessità di questo genere hanno fatto sì che più volte fosse sottoposto ad un profondo riesame dal punto di vista tassonomico. Attualmente il genere *Pseudomonas* viene considerato come un'entità multigenerica che può essere suddivisa in cinque gruppi di specie abbastanza distanti tra loro, di cui soltanto uno può propriamente essere chiamato *Pseudomonas*". Infatti il gruppo I comprende quelle specie che sono poi state rinominate *Pseudomonas "sensu stricto"* (Palleroni, 2003). Si tratta di batteri non sporigeni, dotati di metabolismo chemioeterotrofo strettamente aerobio. Le cellule batteriche presentano una forma bastoncellare con dimensioni di 0,5-1,0x1,5-5,0 µm, mobili in quanto flagellate a livello polare. Gli *Pseudomonas "sensu stricto"* sono organismi

mesofili con optimum di sviluppo ad una temperatura compresa tra i 25°C ai 35 °C. Non tollerano temperature elevate mentre sopravvivono a temperature al di sotto di 0 °C. All'interno di questo gruppo è possibile distinguere le specie in funzione della patogenicità, della produzione dell'arginina deidrolasi, dell'utilizzazione del glucosio e della produzione di pigmenti fluorescenti. Il gruppo degli pseudomonadi fluorescenti comprende specie molto interessanti viste le loro peculiari caratteristiche e le specie più importanti sono *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens* e *P. syringae* (Haas & Defago, 2005).

Pseudomonas fluorescens

P. fluorescens è una specie di batteri saprofiti non patogeni che colonizza acqua, suolo e superfici vegetali. Com'è deducibile dal nome questa specie batterica sintetizza e secerne un pigmento fluorescente conosciuto come fluoresceina che è particolarmente abbondante in contesti carenti in ferro. Questa specie batterica ha semplici esigenze nutrizionali, cresce bene in mezzi minimi con differenti fonti di carbonio. La capacità di proliferare nel suolo e nella rizosfera fanno sì che questa specie batterica venga ampiamente studiata, infatti è particolarmente nota per le proprietà antagonistiche nei confronti di numerosi fitopatogeni ad habitat terricolo e non. I ceppi di biocontrollo di *P. fluorescens* colonizzano in maniera efficace il rizopiano e i solchi tra le cellule dell'epidermide. Alcuni ceppi colonizzano i tessuti interni dei vegetali pertanto chiamati endofiti, occupando gli spazi intercellulari del *cortex* e dell'epidermide. Questi batteri sono in grado di utilizzare in maniera efficace gli essudati radicali tanto da costituire il 10 % delle cellule batteriche che colonizzano la rizosfera. I ceppi di biocontrollo di *P. fluorescens* sono piuttosto aspecifici nella loro capacità di proteggere le specie vegetali dai fitopatogeni, agendo in maniera efficace in più patosistemi. Infatti numerosi studi scientifici descrivono l'efficacia di questo batterio nel controllo di oomiceti fitopatogeni (*Pythium* spp.), di funghi (*F. oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis*, *R. solani*, etc.), in misura minore di batteri fitopatogeni (*Pectobacterium carotovorum*) e nematodi (*Meloidogyne* spp.). L'efficacia di questo microrganismo nel controllo di fitopatogeni scaturisce dalla moltitudine di meccanismi di azione di cui dispone (Couillerot *et al.*, 2009). L'attività di biocontrollo dei vari ceppi di *P. fluorescens* nei confronti di funghi fitopatogeni deriva dalla produzione di metaboliti secondari con attività antifungina. Le principali molecole antibiotiche prodotte da questa specie batterica sono: 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG), pyrrolnitrin, e pyoluteorin, tre molecole fenoliche con attività antifungina ad ampio spettro. Queste molecole sono ben caratterizzate nell'attività d'inibizione *in vitro*,

mentre risulta difficile stabilirne il ruolo *in vivo*. Attualmente l'approccio consiste nella produzione di mutanti nei geni coinvolti nella biosintesi e valutazione della capacità antagonistiche *in vitro* ed *in vivo*. Ciò è possibile grazie alla disponibilità di genomi sequenziati con le rispettive annotazioni geniche. I ceppi di *P. fluorescens* CHA0 e Pf5 sono quelli maggiormente utilizzati come modello nello studio della biosintesi dei metaboliti secondari attivi e del ruolo che questi hanno nel biocontrollo (Baehler *et al.*, 2005). La sintesi di queste molecole avviene mediante geni disposti in *cluster* e ad oggi si hanno numerose informazioni in merito al ruolo di queste tre molecole nel controllo di patogeni fungini *soilborne*:

- *2,4-diacetyl phloroglucinol* (2,4-DAPG) è un composto fenolico con attività antifungina, antibatterica e ad alte concentrazioni fitotossica. La biosintesi di questa molecola è regolata da un *cluster* conservato in numerosi pseudomonadi. La prova del ruolo di questo metabolita secondario nel controllo di numerosi fitopatogeni viene dallo studio di mutanti di *P. fluorescens* che non sintetizzano il 2,4-DAPG. Le prime evidenze sono state ottenute nei confronti di *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* e *Thielaviopsis brassicola*, l'inserzione Tn5 nel *cluster* della biosintesi del 2,4-DAPG comportava la riduzione sia *in vitro* che *in vivo* dell'attività inibente di *P. fluorescens* ceppo CHA0 nei confronti di questi due patogeni fungini (Keel *et al.*, 1992). Lo stesso approccio ha dimostrato attività di questa molecola anche nei confronti di *P. ultimum* (Fenton *et al.*, 1992). La biosintesi del 2,4-DAPG è autoindotta, infatti l'espressione del primo gene del *cluster* (*phlA*) è repressa in presenza di elevate concentrazioni della molecola stessa o del precursore *monoacetylphloroglucinol*. Anche la presenza di acido fusarico comporta la repressione dell'espressione del gene *phlA*, mentre è stimolata dalla presenza del glucosio come fonte di carbonio e di cationi come Zn^{++} e NH_4Mo^{++} . A reprimere la sintesi del 2,4-DAPG è anche il gene *glucose dehydrogenase*, infatti l'acido gluconico prodotto dal batterio stesso reprime l'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi.
- *Pyrrrolnitrin* è un metabolita secondario prodotto oltre che dai pseudomonadi anche da *Burkholderia* sp., questa molecola presenta una forte attività antifungina. La produzione della *pyrrrolnitrin* è correlata con la capacità di questi batteri di controllare patologie fungine come il *damping-off* prodotto da *R. solani*. Mutanti Tn5 di *P. fluorescens* Pf5 nella via biosintetica di questa molecola perdono la capacità antagonistica nei confronti di *Pyrenophora tritici-repentis* (Weller, 2007).

- *Pyoluteorin* (PLT) ha attività antibiotiche nei confronti di *P. ultimum*, infatti la delezione dei geni responsabili alla sintesi di questa molecola nel ceppo CHA0 determina una perdita d'efficacia nel controllo del *damping-off* (Maurhofer *et al.*, 1994).

L'interazione di *P. fluorescens* con l'apparato radicale innesca nella pianta delle risposte biochimiche che accrescono il livello di resistenza all'attacco dei patogeni. L'induzione di resistenza sistemica è una caratteristica comune per numerose specie di rizobatteri e in *P. fluorescens* è un aspetto abbastanza studiato del quale si conoscono le basi molecolari e sono stati identificati numerosi elicitori capaci di innescare questa risposta nella pianta. Il ceppo batterico CHA0 è capace di innescare in *A. thaliana* una parziale resistenza agli attacchi dell'*oomycete Peronospora parasitica*. Questa protezione si riduce significativamente quando viene adoperato il mutante batterico per la produzione del 2,4-DAPG. Approfondimenti sulla pianta circa il *pathway* metabolico coinvolto nell'innescamento dell'ISR hanno dimostrato che quest'interazione segue necessariamente la via dell'acido jasmonico e dell'etilene (Iavicoli *et al.*, 2003). Numerose altre molecole riescono ad innescare meccanismi di resistenza agendo sull'equilibrio di questi due fitormoni, tra cui l'acido salicilico prodotto da diversi ceppi di *P. fluorescens* nella rizosfera che riescono ad elicitarne piante di cece aumentandone la resistenza a *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (Saikia *et al.*, 2003), oppure in piante di riso contro *Magnaporthe oryzae* (De Vleeschauwer *et al.*, 2008). Altra classe di elicitori prodotti da *P. fluorescens* sono liposaccaridi per i quali è stata descritta attività in piante di radicchio contro *F. oxysporum* f.sp. *raphani* oppure in piante di pomodoro contro *Phytophthora infestans* (Leeman *et al.*, 1995, Tran *et al.*, 2007). L'ISR induce risposte molto complesse ed articolate nella pianta che accrescono la resistenza ai patogeni, ad esempio in piante di banano è stato verificato che il trattamento con *P. fluorescens* aumenta il contenuto fenolico nelle foglie e l'attività degli enzimi *phenylalanine ammonia-lyase*, *peroxidase*, *chitinase*, β -1,3-*glucanase*, alterazioni che rendono la pianta più resistente ad attacchi di *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (Thangavelu *et al.*, 2003). La flagellina batterica, la componente proteica dei flagelli, può fungere da elicitore attivando le risposte di difesa nella pianta. Questo fenomeno è stato descritto in *P. putida* ceppo WCS358 capace di innescare l'ISR in piante di *Arabidopsis*, proprietà che viene persa nei mutanti privi di flagello. *P. fluorescens*, così come molti altri pseudomonadi, sintetizzano e secernono molecole organiche capaci di legare in maniera stabile cationi tra cui il ferro. Questo elemento, benché sia abbondante nella biosfera, spesso non sufficientemente disponibile e la rizosfera non fa eccezione a queste dinamiche. In numerose interazioni pianta *P. fluorescens* è stato descritto il ruolo dei siderofori

nell'induzione dell'ISR (Höfte & Bakker, 2007). *P. fluorescens* è capace di alterare profondamente l'espressione genetica nella pianta, infatti analisi *microarray* sul trascrittoma di *Arabidopsis* hanno dimostrato l'alterazione dell'espressione di circa 200 geni di cui meta sovra-espressi e meta sotto-espressi (Wang *et al.*, 2005). Gli Pseudomonadi in generale ed in particolare *P. fluorescens* devono buona parte dell'attività antagonistica alla produzione di siderofori. Queste molecole vengono sintetizzate ed espulse nella matrice extracellulare dove formano il complesso ferro/sideroforo. Questo complesso viene captato da recettori di membrana che fungono da porine facendo entrare il ferro. La produzione di siderofori e dei rispettivi recettori è finemente regolata dalle esigenze della cellula. Questo per evitare sprechi di energia ma soprattutto per evitare accumulo di ferro nella cellula in quanto tossico per la formazione di radicali liberi. La maggior parte dei siderofori sono peptidi non ribosomiali più o meno complessi, in alcuni casi legati a cromofori. Tutti gli *Pseudomonas* "sensu stricto" producono in contesti carenti di ferro una classe di siderofori giallo/verdi fluorescenti chiamati pioverdine (*pyoverdines*). Questa classe di siderofori hanno una composizione molto variabile ma generalmente il cromoforo è sempre una molecola di *dihydroxyquinoline*, la componente peptidica è costituita da 6 a 12 amminoacidi a seconda dei ceppi. La molecola presenta una catena laterale generalmente costituita da un acido dicarbossilico o da acido dicarbossilammide. Le pioverdine legano in maniera stabile il Fe(III) (ferro ferrico) ma riescono a legare anche il Fe(II) ossidandolo in ferro ferrico (Cornelis & Matthijs, 2002). Il complesso Pioverdina/Ferro viene intercettato da una proteina di membrana chiamata *TonB Iron repressed*. Questo recettore benché abbia una certa specificità riesce a riconoscere la pioverdina prodotta da altre specie batteriche, ad esempio il recettore di *P. aeruginosa* riconosce altre due molecole di pioverdina prodotte da *P. fluorescens*. La pioverdina non è l'unica tipologia di sideroforo prodotto, infatti *P. fluorescens* produce altre molecole tra cui alcune derivanti del salicilato come la *pyochelin*, *pseudomonine* e *quinolobactin* (Cornelis & Matthijs, 2002). I siderofori in un contesto carente di ferro agiscono direttamente sul patogeno sottraendo il ferro disponibile. L'attività chelante della pioverdina è massima a pH neutro/basico in quanto è più alta l'affinità con il ferro, mentre diminuisce a pH acidi (Haas & Defago, 2005). In *P. fluorescens*, come in altri Gram-negativi, la produzione dell'acido gluconico è catalizzata da un enzima di membrana chiamato *glucose dehydrogenase* che ossida il glucosio periplasmatico. La reazione prosegue con l'ossidazione dell'acido gluconico in *2-ketogluconate*, catalizzata da un altro enzima di membrana *gluconate dehydrogenase*. Questi enzimi hanno un ruolo chiave nel biocontrollo in quanto nella rizosfera il glucosio è la fonte di carbonio principale. In questo contesto questi due enzimi influenzano la

concentrazione di glucosio e possono modulare la quantità di fosfati solubili. Inoltre l'enzima *glucose dehydrogenase* altera il pH radicale, tutti questi aspetti influenzano notevolmente il microbioma nella rizosfera. Infatti il metabolismo dell'acido gluconico è correlato all'attività antifungina di *Pseudomonas* spp. (Kaur *et al.*, 2006). Da studi scientifici condotti su *P. fluorescens* è emerso il ruolo fondamentale del gene *glucose dehydrogenase* e quindi dell'acido gluconico nell'abbassamento del pH extracellulare. Il ceppo *wild type* CHA0, grazie alla produzione di questo acido organico, riesce a solubilizzare forme insolubili di fosforo. La mutazione nel gene *glucose dehydrogenase* (ceppo CHA1196) annulla l'ossidazione del glucosio in acido gluconico e con essa l'abbassamento del pH extracellulare in presenza di questo carboidrato. La mutazione nel gene *gluconate dehydrogenase* (ceppo CHA1197) accresce la capacità di abbassare il pH extracellulare in quanto si accumula acido gluconico. La doppia mutazione nei due geni (ceppo CHA1198) genera un fenotipo identico al ceppo CHA1196. Valutazioni sull'attività di biocontrollo di questi ceppi di *P. fluorescens* hanno evidenziato che la mancanza del gene *glucose dehydrogenase* incrementa l'attività antagonistica nei confronti di *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* e *Rhizoctonia solani* rispetto al ceppo *wild type*. Analizzando la produzione delle principali molecole antifungine nei vari ceppi mutanti è stato evidenziato che la presenza di acido gluconico reprime la produzione di *2,4-diacetylphloroglucinol* e *pyoluteorin* dato che giustifica l'incremento delle capacità antagonistiche dei mutanti per la *glucose dehydrogenase*, mettendo in correlazione l'espressione dei geni responsabili della produzione delle molecole antifungine con la produzione dell'acido gluconico e quindi del pH extracellulare (de Werra *et al.*, 2009).

Rahnella aquatilis

Il genere *Rahnella* raggruppa batteri Gram-negativi, anaerobi facoltativi, di forma bastoncellare, non pigmentati e appartenenti alla classe dei *Gammaproteobacteria*. Lo studio di alcune specie, nell'ambito dell'interazione pianta-microbioma, ha evidenziato la capacità di questi batteri di promuovere lo sviluppo vegetale, agevolare l'acquisizione di nutrienti e la capacità nel controllare alcuni fitopatogeni. Nell'ambito del genere *Rahnella* la specie *aquatilis* è quella maggiormente studiata. Si tratta di un batterio con cellule bastoncellari di 2 - 3µm di lunghezza, mobile in quanto flagellato, ubiquitario, isolato da diverse matrici come suolo, acqua, alimenti e ambienti acquatici. Colonizza abilmente rizosfera e spermosfera dove riesce a fissare l'azoto atmosferico senza instaurare simbiosi con la pianta. In ceppi isolati dalla rizosfera di soia è stata descritta una forte capacità di solubilizzare minerali come

l'idropatite e il fosfato tricalcico, entrambe forme di fosforo non solubili e non disponibili, ma largamente presenti nel suolo. La solubilizzazione di questi minerali è legata all'acidificazione del pH extracellulare, infatti i due fenomeni sono inversamente proporzionali. L'abbassamento del pH del mezzo colturale prodotto dalla proliferazione di questa specie batterica è dovuto all'accumulo di acido gluconico. La componente genetica responsabile di tale fenotipo è stata studiata costituendo una libreria genomica in *Escherichia coli* HB101 e DH5 α e analizzando i ceppi con capacità di solubilizzare il fosfato tricalcico, quindi di produrre acido gluconico. L'analisi delle sequenze nucleotidiche rivelava due *open reading frames* (ORF1 e ORF2) codificanti per due proteine di 10 e 44 kDa (*pqqE* e *pqqD*), entrambe coinvolte nella biosintesi del cofattore *pyrroloquinoline quinone* (PQQ). Nei batteri Gram-negativi il PQQ svolge principalmente la funzione di cofattore non covalente di numerose *dehydrogenase* di membrana, compreso *methanol dehydrogenase*, *ethanol dehydrogenase* e *glucose dehydrogenase* (Matsushita *et al.*, 2002). L'enzima *glucose dehydrogenase* è una proteina di membrana che usa il PQQ come cofattore, ed è associata all'ossidazione del glucosio periplasmatico in acido gluconico. Pertanto sia il cofattore PQQ quanto il gene *glucose dehydrogenase* sono essenziali per la produzione di acido gluconico e quindi per tutte le proprietà che derivano dall'acidificazione dell'ambiente extracellulare. Nei batteri i geni coinvolti nella biosintesi del PQQ sono disposti in *cluster* nell'operone *pqqABCDEF* (Meulenberg *et al.*, 1992, Toyama *et al.*, 1997, Guo *et al.*, 2009, Guo *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2014). Attualmente per alcuni ceppi di *R. aquatilis* è nota la capacità di produrre molecole antimicrobiche e di controllare alcuni fitopatogeni. Il ceppo bSL1 isolato dalla carposfera di mela è stato testato per le proprietà antagoniste nei confronti di *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* su mele della varietà *Red Delicious*. Nei saggi *in vitro*, questo batterio inibiva completamente la germinazione dei conidi di *P. expansum* e *B. cinerea*, con meccanismi diversi per i due patogeni. I saggi di controllo biologico di *P. expansum* e *B. cinerea* mostravano una discreta capacità di ridurre la gravità e l'incidenza della malattia a differenti temperature (4°C e 15°C) (Calvo *et al.*, 2007). Il ceppo batterico testato inoltre non produceva molecole antibiotiche extracellulari e nei test di tossicità non provocava mortalità, manifestazioni sintomatiche o alterazione degli organi nei ratti. Altro ceppo per il quale è nota la capacità di biocontrollo è il H2X isolato dalla rizosfera di vite che riesce a controllare i tumori batterici causati da *Agrobacterium vitis*, *A. tumefaciens*, e/o *A. rhizogenes* in vite o in girasole. Il ceppo H2X ha attività antibatteriche *in vitro* e riesce a controllare la proliferazione di questi *Agrobacterium* anche *in vivo* riducendo la comparsa di tumori sia in girasole che in vite. L'eliminazione dei geni codificanti per i cofattori *pqqA* e *pqqB* o del gene codificante

per l'enzima *glucose dehydrogenase* comporta la perdita della capacità di biocontrollo, dimostrando il ruolo chiave dell'acido gluconico in quest'interazione (Guo *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2014). Nel ceppo GR20 di *R. aquatilis* è stato studiato l'enzima *5-enolpyruvylshikimate-3phosphate synthase* responsabile della sintesi degli amminoacidi aromatici come fenilalanina, tirosina e triptofano in piante, funghi e batteri. Questo enzima è il *target* della molecola erbicida *glyphosate*. La resistenza a questa molecola compare nei batteri quando sono sottoposti ad forte pressione selettiva. Il ceppo GR20, isolato da un terreno fortemente contaminato da *glyphosate*, presentava un'alterazione strutturale nell'enzima bersaglio dell'erbicida che ne aumentava la resistenza, questo gene clonato in *E. coli* e trasferito in tabacco accresceva la resistenza all'erbicida (Peng *et al.*, 2012). Per alcuni ceppi di *R. aquatilis* è stata descritta la capacità di provocare problematiche sanitarie nell'uomo, causando infezioni ospedaliere (Maraki *et al.*, 1994), oppure in soggetti immunocompromessi (Chang *et al.*, 1999). Pertanto l'applicabilità di ceppi appartenenti a questa specie batterica come agenti di lotta biologica in campo agrario è vincolata ad approfondite valutazioni circa la virulenza nei confronti di animali, allo scopo di minimizzare i rischi per la salute umana. Le peculiarità di questa specie batterica ne rendono comunque interessante lo studio, allo scopo di comprendere le interazioni che si instaurano nel microbioma e tra il microbioma e la pianta.

Il genere *Fusarium*

Il genere *Fusarium* comprende un ampio ed eterogeneo gruppo di funghi *Hyphomycetes* appartenenti al phylum *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes*, ordine *Hipocreales*, famiglia *Nectriaceae*. Questo genere fungino ad *habitat* terricolo ha una distribuzione cosmopolita, popola sia ecosistemi naturali che antropizzati. Particolarmente noto in quanto include numerosi patogeni vegetali capaci di causare marciumi molli (*Fusarium root rot*) e secchi (*Fusarium wilt*) all'apparato radicale ed al colletto. In alcuni casi la colonizzazione dei tessuti vegetali può interessare anche le infiorescenze (*Fusarium head blight*). Numerose specie durante la colonizzazione dei tessuti vegetali producono molecole tossiche per gli animali (micotossine). Queste molecole costituiscono una seria problematica igienico/sanitaria in quanto contaminanti della catena alimentare, che accumulandosi in diversi alimenti (cereali, frutta secca, latte ecc.) aumentano concretamente il rischio di cancro specialmente nelle aree in via di sviluppo. Per alcune specie del genere *Fusarium* (*F. solani*, *F. oxysporum* e *F. verticillioides*) (Guarro & Gené, 1995, Nucci & Anaissie, 2007) è stata riscontrata la capacità di provocare micosi nell'uomo, specialmente in pazienti immunocompromessi (Vartivarian *et*

al., 1993, Ortoneda *et al.*, 2004). Diverse specie del genere *Fusarium* vengono utilizzate nel controllo biologico di patogeni fungini, nella produzione di metaboliti secondari di interesse biologico e commerciale come ciclosporine e gibberelline (Desjardins *et al.*, 1993) e nella produzione di biomassa fungina ad alto contenuto proteico (*Quorn*) utilizzata per la produzione di alimenti (Wiebe, 2002).

La classificazione tassonomica delle specie del genere *Fusarium* ha subito numerose variazioni nel corso della storia micologica, questo per la grande variabilità nella morfologia e fisiologia interna al genere. Attualmente, secondo l'ultima classificazione tassonomica, si contano settanta specie (Leslie & Summerell, 2006). Alcune specie, come *F. solani* (*Nectria haematococca* - omoitalico), *F. graminearum* (*Gibberella zea* - omoitalico) e *F. verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* - eterotalico), completano il ciclo sessuale (specie teleomorfe), mentre per specie come *F. oxysporum* ad oggi non è stata ancora descritta la fase sessuale (specie anamorfe).

***Fusarium oxysporum* agente causale del marciume secco (*fusarium wilt*)**

Fusarium oxysporum è un fungo ad *habitat* terricolo descritto come un patogeno vegetale di rilevante importanza economica. Si tratta di un *hyphomycetes* con ife ialine e settate. Per questo fungo, non essendo mai stata descritta la fase sessuale, il concetto biologico di specie non può essere applicato quindi si parla più propriamente di *F. oxysporum complex species*. Questa specie vive in modo saprofitario nel suolo alimentandosi della sostanza organica morta, è presente sia come patogeno che endofita non patogeno. In quest'ultimo caso instaura un rapporto trofico con specie vegetali colonizzandone la regione corticale della radice senza causare manifestazioni sintomatiche. Le popolazioni virulente invece penetrano nell'apparato radicale colonizzandone sia lo strato corticale che i tessuti vascolari, causando la manifestazione sintomatica caratteristica conosciuta come fusariosi vascolare (*Fusarium wilt*). La presenza all'interno di questa specie di linee virulente e non virulente facilita l'analisi comparativa tra le due, allo scopo di evincere le differenze molecolari e genetiche che conferiscono la patogenicità. *F. oxysporum* è capace di produrre malattia in più di 120 specie vegetali, di cui numerose specie di interesse agrario. Nel 1940, Snyder e Hansen (Snyder & Hansen, 1940), definirono il concetto di *forma specialis* (f.sp.) per identificare un isolato di *F. oxysporum* capace di infettare un determinato genere, specie o varietà vegetale. Questa classificazione non ha valenza tassonomica ma tutt'oggi viene utilizzata per identificare l'insieme più o meno ampio di ospiti vegetali, che nella maggior parte dei casi danno il nome

alla forma speciale (*F. oxysporum* f.sp. *melonis*; *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*; *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*; *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ecc.). Ad oggi sono state descritte più di 100 forme speciali (Leslie & Summerell, 2006), un numero in continua evoluzione vista la descrizione di nuove interazioni (De Curtis *et al.*, 2014, Vitullo *et al.*, 2014). Non sono ancora chiari i complessi rapporti genetici esistenti tra isolati appartenenti a patotipi diversi, né è possibile distinguere le forme speciali sulla base di caratteri morfologici o in base alla compatibilità vegetativa (Nogales Moncada *et al.*, 2009). Le forme speciali si distinguono mediante saggi di patogenicità, però i risultati vengono influenzati da numerose variabili come: condizioni ambientali, variabilità genetica delle piante, concentrazione di inoculo ecc. Recentemente questa tecnica viene implementata o rimpiazzata da metodiche di biologia molecolare basate sull'utilizzo di marcatori genetici.

Biologia e epidemiologia

F. oxysporum presenta un micelio di consistenza cotonosa variabile nella colorazione dal bianco al rosa pallido fino ad una colorazione porpora intensa, differente a seconda dell'isolato e delle condizioni ambientali. Polimorfismo si riscontra anche nella velocità di crescita, la forma, le dimensioni e l'abbondanza dei conidi (Kang *et al.*, 2014). *F. oxysporum* produce tre tipologie conidiche: microconidi, macroconidi e clamidospore (figura 2). I macroconidi, nonostante siano le spore tipiche del genere *Fusarium*, sono le meno abbondanti, hanno un aspetto fusiforme, leggermente appuntiti alle estremità e falciformi. Sono costituiti da un numero variabile di cellule che oscilla da tre a cinque. Abbondano sulla superficie delle piante uccise dall'attacco del patogeno oppure dopo lunghi periodi di coltivazione con esposizione alla luce. I microconidi, molto più abbondanti dei macroconidi, sono costituiti da una o due cellule di forma ovale o cilindrica. Vengono prodotti con maggiore frequenza ed in qualsiasi circostanza. Le clamidospore, costituite da una o due cellule, presentano una forma sferica con parete inspessita. Hanno origine dalla modificazione strutturale di un ifa, vengono prodotte dal fungo all'insorgere di condizioni ambientali sfavorevoli allo scopo di creare strutture di propagazione durevoli, infatti conservano la vitalità nel terreno per lunghi periodi (Kang *et al.*, 2014). Le clamidospore svolgono un ruolo importante come inoculo primario per l'infezione radicale, infatti la germinazione è fortemente favorita dalla presenza di essudati radicali (Stevenson & Becker, 1972, Couteaudier & Alabouvette, 1990, Kono *et al.*, 1995). *F. oxysporum* generalmente ha una diffusione a breve distanza per mezzo dell'acqua d'irrigazione o attrezzatura contaminata. Il

fungo può “viaggiare” anche per lunghe distanze per mezzo di tessuti vegetali infetti, suolo e vento sotto forma di microconidi. La trasmissione può avvenire anche per mezzo di sementi contaminate.

Ciclo biologico

F. oxysporum sopravvive per lunghi periodi come saprofita adoperando la sostanza organica presente nel suolo, conservandosi sotto forma di micelio o più comunemente sotto forma di clamidospore (Kang *et al.*, 2014). *F. oxysporum* è capace di rilevare la presenza di una pianta ospite anche prima di stabilire un contatto fisico (Turrà *et al.*, 2015), infatti la germinazione conidica è notevolmente stimolata dagli essudati secreti dalla radice. Molto probabilmente questa matrice organica complessa attiva nel fungo le vie di trasduzione del segnale rispondendo mediante l'espressione di specifici geni che controllano lo sviluppo e la virulenza, aderendo e penetrando l'apparato radicale senza produrre strutture specializzate. La penetrazione della radice avviene generalmente per mezzo di aperture naturali come giunzioni cellulari o ferite. Una volta penetrato il fungo colonizza il *cortex* radicale crescendo in maniera intra ed intercellulare fino alla completa colonizzazione dei vasi xilematici del fittone, colletto e parte dello stelo. Il passaggio dallo strato corticale ai vasi xilematici dà inizio alla fase patogenetica del fungo, con successivo appassimento della pianta (*Fusarium wilt*). Evidenze scientifiche hanno dimostrato che alla manifestazione dei sintomi contribuisce oltre che l'occlusione dei vasi xilematici da parte del micelio fungino e la produzione di fitotossine, anche una serie di risposte della piante, come produzione di gel, gomme e tulle che occludono i vasi. La manifestazione sintomatica classica di *fusarium wilt* è rappresentata da clorosi, necrosi e caduta prematura delle foglie, imbrunimenti vascolari che coinvolgono il fittone, colletto e parte basale dello stelo, eventualmente la morte della pianta o crescita stentata con drastici cali produttivi (Michielse & Rep, 2009). Sui tessuti infetti della pianta e nel suolo prossimo ad essi si sviluppano e accumulano le tre forme conidiche concludendo il ciclo biologico di questo patogeno fungino (figura 3).

Meccanismi di virulenza

I funghi hanno sviluppato numerose strategie per penetrare, invadere, crescere e propagarsi nei tessuti vegetali (Kang *et al.*, 2014). A differenza dei virus e batteri i funghi essendo pluricellulari possiedono dei meccanismi attivi di penetrazione, che gli consentono di superare

le barriere vegetali mediante una combinazione di processi enzimatici e meccanici, tale processo è denominato crescita invasiva. I patogeni che attaccano l'apparato aereo interagiscono con uno strato impermeabile chiamato cuticola che viene superata per via enzimatica oppure per mezzo di strutture come l'appressorio e le ife di penetrazione. I patogeni dell'apparato radicale invece entrano in contatto direttamente con la parete cellulare che aggrediscono per mezzo della secrezione di complessi extracellulari contenenti enzimi come cellulasi e pectinasi capaci di degradare i polimeri di parete. *F. oxysporum* presenta una produzione enzimatica extracellulare molto complessa e attiva nella degradazione dei polimeri di parete (Di Pietro *et al.*, 2009). Il fungo fitopatogeno, durante ed in seguito alla penetrazione nell'ospite, deve contrastare le risposte di difesa della pianta secernendo fitotossine e composti analoghi ad ormoni vegetali, che alterano la fisiologia della pianta a beneficio del patogeno (Knogge, 1996). In alcuni casi i funghi producono molecole capaci di inibire parzialmente o totalmente le risposte di difesa (effettori) della pianta (Rep *et al.*, 2005). Tra le risposte di difesa delle piante vi è la produzione di molecole antimicrobiche (fitoalessine) e numerosi fitopatogeni, tra cui anche *F. oxysporum*, possiedono un corredo enzimatico capace di detossificarle (De Wit *et al.*, 2009). Un esempio è l'enzima fungino *tomatinase* che degrada la fitoalessina α -tomatina prodotta da pomodoro (Roldán-Arjona *et al.*, 1999, Pareja-Jaime *et al.*, 2008). Studi scientifici hanno evidenziato che il prodotto della detossificazione dell' α -tomatina addirittura sopprime le risposte di difesa della pianta (Bouarab *et al.*, 2002). Per una corretta comprensione dell'arsenale genetico e quindi molecolare dei funghi fitopatogeni è bene distinguere le molecole ed enzimi necessari nel processo infettivo (fattori di patogenicità) dalle molecole che concorrono ad accrescere o ridurre la severità dei sintomi e della malattia (fattori di virulenza).

Meccanismi di difesa della pianta

L'interazione pianta-patogeno è un processo molto complesso che si svolge in fasi successive durante le quali attuano meccanismi di riconoscimento a distinti livelli. La combinazione di tutti questi determina il fallimento o il successo della infezione. Presupposto base per la resistenza ad un patogeno è il suo riconoscimento, infatti la pianta una volta percepita la prossimità del patogeno pone in atto una serie di risposte di difesa per contenere la proliferazione dello stesso (Jones & Dangl, 2006). In linea generale le specie vegetali non sono ospite per la maggior parte dei microrganismi e questa resistenza si definisce generale (*non-host resistance*). Questa resistenza è dovuta alla produzione da parte dei microrganismi

di molecole facilmente percepite dalla pianta, è il caso di alcuni polisaccaridi o glicoproteine della parete fungina. Le molecole microbiche capaci di scatenare una risposta nella pianta, che si concretizza in una maggiore resistenza al patogeno, vengono chiamate *pathogen associated patterns* (PAMPs). D'altro canto alcuni patogeni sono capaci di evitare tale riconoscimento generando un'interazione ospite patogeno di tipo compatibile. In *F. oxysporum* la compatibilità si stabilisce a livello di razza fisiologica (virulenta o avirulenta) e cultivar (resistente o suscettibile). In questo caso la resistenza/suscettibilità non è più definibile generale ma presuppone l'interazione di pochi e specifici geni, infatti si è ipotizzata un'interazione gene per gene, secondo la quale per ogni gene di avirulenza del patogeno esiste nella pianta un corrispondente gene di resistenza (Flor, 1971). La perdita o mutazione di un gene di avirulenza comporta il superamento della resistenza mediata dal corrispondente gene di resistenza (Farman *et al.*, 2002). Considerando *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* sono state descritte tre razze fisiologiche nominate in ordine di scoperta 1, 2, 3. Queste si differenziano per la risposta ai geni di resistenza in pomodoro I-1, I-2, I-3, che nell'ordine conferiscono resistenza alle razze 1, 2, 3. Un esempio concreto di gene di avirulenza è il gene Six1 che codifica per una proteina secreta durante la colonizzazione dei vasi xilematici, questa proteina è riconosciuta dalla pianta mediante il gene di resistenza I-3. Ceppi fungini con alterazioni del gene Six1 sono virulenti nei confronti di piante I-3. Tuttavia nelle interazioni ospite patogeno con esito positivo la perdita del gene Six1 causa una riduzione della virulenza, pertanto se l'interazione Six1/I-3 dà esito resistenza/avirulenza in altre interazioni la mancanza di questa proteina fungina arreca uno svantaggio al fungo (Rep *et al.*, 2004).

Metaboliti secondari prodotti da *F. oxysporum*

F. oxysporum pur essendo considerata una specie fungina non tossigena è capace di sintetizzare numerosi metaboliti secondari bioattivi. Il ruolo biologico di tali molecole ad oggi non è del tutto chiaro, anche se si conoscono gli effetti su numerosi organismi. L'attività biologica di queste molecole scaturisce dall'interazione con le componenti cellulari come DNA, RNA, enzimi, cofattori enzimatici, costituenti di membrana (Bell *et al.*, 2003). Lo studio delle molecole del metabolismo secondario fungino è incentrato principalmente sugli effetti che queste hanno sulla salute animale, in quanto si accumulano facilmente nelle produzioni agricole e negli alimenti. Queste molecole hanno effetti sugli animali, sulle piante, sulla microflora batterica e fungina, infatti l'attività di questi metaboliti sembra essere

collegata con i rapporti ecologici che *F. oxysporum* instaura con altri organismi (Toyoda *et al.*, 1988, de Weert *et al.*, 2004, Wu *et al.*, 2008).

I principali metaboliti secondari bioattivi prodotti da *F. oxysporum* sono i seguenti (figura 4):

- Moniliformina: è una micotossina isolata per la prima volta in *F. moniliforme* J. Sheld [*F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg] (Cole *et al.*, 1973). Questa molecola è considerata sia una micotossina che una fitotossina. L'effetto fitotossico si manifesta con necrosi e clorosi fogliari internervali, fenomeno osservato in grano e tabacco (Marasas *et al.*, 1979, Abbas *et al.*, 1989, Chelkowski *et al.*, 1990). Evidenze sperimentali attestano la tossicità anche per animali quali polli e ratti (Li *et al.*, 2000).
- Beauvericina: è una micotossina ciclodepsipeptide appartenente alla famiglia delle enniatine ampiamente studiate per le capacità insetticide, è un inibitore specifico dell'enzima colesterolo aciltransferasi. Tossica per le cellule umane, inducendo la morte cellulare in maniera simile all'apoptosi. La produzione della Beauvericina è una caratteristica di alcune forme speciali di *F. oxysporum*, rivestendo un ruolo importante nella patogenesi (Logrieco *et al.*, 1998, Moretti *et al.*, 2002).
- Enniatine: sono un gruppo di micotossine appartenenti al gruppo dei cicloesaptidi, isolati per la prima volta in *F. orthoceras* var. *enniatinum* Appi. & Wr. A seconda dei residui amminioacidici N-metilati presenti nella molecola si distinguono eniantina A, B, C, D, E, F. Dal punto di vista biologico sembra che la produzione di queste tossine sia associata alla comparsa di sintomi di avvizzimento a carico delle piante. In pomodoro inducono necrosi del tessuto vascolare (Gaumann *et al.*, 1947, Logrieco *et al.*, 1998, Moretti *et al.*, 2002).
- Fumonisine: sono un gruppo di molecole strutturalmente correlate, prodotte principalmente da *F. moniliforme* e *F. proliferatum* sebbene anche *F. oxysporum* ed altre specie siano potenziali produttrici, in quanto possiedono il cluster genetico per la produzione delle fumonisine (Seo *et al.*, 1996, Seo *et al.*, 1999, Proctor *et al.*, 2004).
- Acido fusarico (*5-butylpicolinic acid*): isolato per la prima volta da *F. heterosporum* (Yabuta *et al.*, 1937), viene sintetizzato da *F. oxysporum* sia in ceppi virulenti sia in ceppi non virulenti. L'acido fusarico è considerabile un fattore di virulenza, descritto per la prima volta nell'interazione pomodoro *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Yabuta *et al.*, 1937, Gaumann, 1957). Successive pubblicazioni scientifiche ne hanno descritto la fitotossicità anche per altri vegetali, pertanto è considerabile una fitotossina (Jullien, 1988, Megnegneau & Branchard, 1988, Bacon *et al.*, 1996, Gapillout *et al.*, 1996)

L'acido fusarico presenta anche una discreta tossicità negli animali risultando mediamente tossico per i topi (Hidaka *et al.*, 1969). La tossicità deriva dall'influenza di questa molecola nella neurotrasmissione con importanti risvolti in campo farmaceutico (Malini, 1966, Hidaka *et al.*, 1969, Porter *et al.*, 1990, Porter *et al.*, 1995). L'acido fusarico aumenta la tossicità di altre micotossine interagendo sinergicamente con queste molecole (Dowd, 1988, Porter *et al.*, 1990, Smith & MacDonald, 1991, Chamberlain *et al.*, 1993, Smith & Sousadias, 1993, Bacon *et al.*, 1995). Non è da trascurare l'effetto inibente che l'acido fusarico ha su microrganismi batterici e fungini, aumentando notevolmente la competitività di *F. oxysporum* nella colonizzazione della rizosfera (de Weert *et al.*, 2004, Bacon *et al.*, 2006, Ruiz *et al.*, 2015). Recenti risultati scientifici hanno dimostrato come questo metabolita secondario chela ioni come Fe^{++} , Fe^{+++} , Zn^{++} , Mn^{++} e Cu^{++} con alta affinità, ipotizzando un possibile coinvolgimento nell'assorbimento di cationi (Ruiz *et al.*, 2015). In *F. oxysporum* f.sp. *cubense* è stato dimostrato che la biosintesi dell'acido fusarico è modulata dalle *Mitogen Activated Protein Kinase* FoSlt2, FoMkk2 e FoBck1, infatti i livelli di trascrizione dei geni coinvolti nella biosintesi di questa fitotossina sono notevolmente ridotti nei mutanti *knockout* per le tre proteine. Inoltre nei mutanti è ridotta anche la biosintesi di siderofori, associando il metabolismo del ferro con la sintesi dell'acido fusarico (Ding *et al.*, 2015).

Ruolo dell'acido fusarico nell'interazione *F. oxysporum*-pianta-microbioma

L'acido fusarico, conosciuto anche come *5-butylpicolinic acid*, è una fitotossina non ospite specifica, prodotta da 11 specie del genere *Fusarium* (Gaumann *et al.*, 1947, Gaumann, 1957). Questa molecola è considerata un importante fattore di virulenza in *F. oxysporum*, tanto che riesce a indurre molto rapidamente la comparsa di manifestazioni sintomatiche livello fogliare come necrosi, ingiallimenti, disseccamenti e caduta precoce delle foglie. Vista la fitotossicità molto spesso questo metabolita viene utilizzato per selezionare varietà resistenti a *F. oxysporum* trattando piante o calli vegetali direttamente con la fitotossina, è il caso del banano, gladiolo, cece, pomodoro, orzo, cotone, ed altre specie coltivate (Chawla & Wenzel, 1987, Megnegneau & Branchard, 1988, Ravikumar & Ratna Babu, 2007, Stipanovic *et al.*, 2011). Nei tessuti vegetali colonizzati da *F. oxysporum* si riscontrano alte concentrazioni di

questa molecola. A livello cellulare l'acido fusarico induce una serie di alterazioni di tipo chimico-fisico (Kuzniak *et al.*, 1999, Wu *et al.*, 2008, Sapko *et al.*, 2011). Gli effetti fino ad oggi descritti riguardano l'alterazione del gradiente elettrochimico di membrana, perdita di elettroliti, diminuzione dei livelli di ATP cellulare, inibizione di alcuni metallo-enzimi (esempio citocromo ossidasi) con conseguente alterazione della catena respiratoria (D'Alton & Etherton, 1984, Arias, 1985, Marrè *et al.*, 1993). Studi condotti su pomodoro e *Arabidopsis thaliana* hanno dimostrato che l'acido fusarico comporta l'alterazione del metabolismo delle specie reattive dell'ossigeno, infatti da un lato si verifica l'aumento della produzione di O₂ e H₂O₂, dall'altro si ha l'inibizione degli enzimi anti ossidanti come *superoxide dismutase*, *catalase* e *ascorbate peroxidase*. Inoltre la contaminazione da acido fusarico comporta l'incremento della perossidazione dei lipidi e della produzione di etilene, fenomeni coinvolti nella morte e senescenza cellulare (Singh & Upadhyay, 2014). In *Arabidopsis* concentrazioni non tossiche di acido fusarico stimolano la sintesi di fitoalessine (Bouizgarne *et al.*, 2006). Studi condotti su *F. oxysporum* f.sp. *cubense* hanno evinto come l'acido fusarico prodotto durante l'interazione con piante di banana si accumuli maggiormente nelle foglie e la concentrazione è strettamente correlata con la gravità dei sintomi. Inoltre questa molecola concorre alla perdita di acqua ed elettroliti nella foglia (Dong *et al.*, 2012). L'acido fusarico oltre ad essere tossico per gli animali e vegetali produce importanti alterazioni anche alla fisiologia fungina e batterica, con risposte differenti a seconda della specie. Per numerosi rizobatteri la presenza di acido fusarico comporta un inibizione del metabolismo e della crescita. Approfondite ricerche sono state condotte su diverse specie del genere *Pseudomonas*. *P. fluorescens* e *P. putida* tollerano mediamente una concentrazione di acido fusarico pari a 100 µg/mL (Landa *et al.*, 2002), fanno eccezione alcune *biovar* di entrambe le specie che riescono a tollerare fino a 500 µg/mL. D'altro canto l'acido fusarico prodotto da *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* risulta essere un importante *chemo-attractant* per *P. fluorescens* WCS365 (de Weert *et al.*, 2004), quindi se da un lato questo metabolita frena l'accrescimento di *P. fluorescens* dall'altro è una molecola attrattiva verso la quale questa specie batterica si sposta attivamente colonizzando le strutture dalle quali viene secreta (ife fungine, rizosfera colonizzata da *F. oxysporum*). Studi condotti sul ceppo CHA0 di *P. fluorescens* evincono come una concentrazione di 0.12 µg/ml di acido fusarico inibisce la sintesi 2,4-Diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) (Notz *et al.*, 2002). Il decorso della malattia nelle piante di pomodoro attaccate da *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* viene drasticamente ridotto se alla soluzione nutritiva si aggiunge zinco o rame celato in EDTA, riduzione aumentata del 25 % in presenza del ceppo di biocontrollo CHA0. La presenza di zinco riduce

la sintesi di acido fusarico e allo stesso tempo aumenta la sintesi di 2,4-DAPG, entrambe i fattori generano una maggiore capacità di biocontrollo del ceppo CHA0 (Duffy & Défago, 1997). Questo risultato suggerisce che la sintesi di acido fusarico venga influenzata dalla presenza di cationi, dato ampiamente confermato da ricerche condotte sul un ceppo Pf-5 di *P. fluorescens*. Infatti l'acido fusarico oltre ad influire sulla crescita microbica riducendola, aumenta la produzione di siderofori come *pyoverdine* ed *enantio-pyochelin*. I mutanti incapaci di sintetizzare queste due molecole sono maggiormente inibiti dall'acido fusarico rispetto al ceppo *wild type*. Inoltre mediante titolazioni spettrofotometriche, gli stessi autori, hanno evidenziato come l'acido fusarico leghi ioni come Fe^{++} , Fe^{+++} , Zn^{++} , Mn^{++} e Cu^{++} con alta affinità (Ruiz *et al.*, 2015). Mentre *P. fluorescens* tollera l'acido fusarico fronteggiando la sottrazione di cationi con un aumento della sintesi dei siderofori, alcune specie microbiche sono capaci di metabolizzarlo trasformandolo in prodotti non più tossici per i batteri e per le piante. E' il caso di *Ralstonia solanacearum* (*ex. P. solanacearum*) che detossifica questo metabolita modificando il gruppo carbossilico in posizione *alpha* in un radicale azotato, forma non fitotossica come mostrato dalla figura 5 (Toyoda *et al.*, 1988). La resistenza e/o detossificazione dell'acido fusarico è una capacità abbastanza comune tra i batteri, infatti nelle sequenze genomiche di numerosi batteri sono annotati geni codificanti per enzimi responsabili della detossificazione o resistenza, in tabella 1 sono riportati alcuni esempi. Numerose specie appartenenti al genere *Bacillus*, tra cui noti agenti di controllo biologico come *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*, sono fortemente inibite dall'acido fusarico (Bacon *et al.*, 2006), questa sensibilità rende possibile l'utilizzo di *B. subtilis* per lo *screening* dell'acido fusarico prodotto da *Fusarium* spp. (Srobarova *et al.*, 2009). Anche nel regno fungino vi sono specie capaci di metabolizzare l'acido fusarico trasformandolo in molecole con una tossicità inferiore, è il caso di *Aspergillus tubingensis* che trasforma questa micotossina in *fusarinol* con fitotossicità nettamente inferiore (Crutcher *et al.*, 2014). *Trichoderma harzianum*, noto agente di biocontrollo fungino, è sensibile all'acido fusarico, infatti la sua crescita è totalmente inibita a concentrazioni di 120 µg/ml di acido fusarico. La generazione di mutanti con maggiore resistenza a questa micotossina aumenta notevolmente la capacità di biocontrollo di *Trichoderma harzianum* (figura 6) (Marzano *et al.*, 2013).

Variabili che influenzano la virulenza di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Durante l'infezione i funghi fitopatogeni attivano una serie di meccanismi di virulenza (adesione all'ospite, penetrazione e crescita invasiva ecc.) condizionati da numerose variabili. *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* oltre ad interagire con l'ospite, (tollerare o suscettibile) e con i microrganismi che popolano la rizosfera (inibizione o stimolazione del processo di patogenesi) viene condizionato da una serie di fattori chimico-fisici che alterano, in maniera positiva o negativa, il livello di virulenza. Le alterazioni della virulenza si concretizzano nella capacità di aderire alla radice, di fare fusione delle ife e di penetrare membrane a base di cellulosa (*cellophane*). La ricerca scientifica condotta su questo fungo fitopatogeno ha portato a conoscenza alcuni dei fattori che alterano la normale virulenza, tra questi i principali sono:

- **Azoto.** L'azoto è un elemento essenziale per la vita ed è uno dei maggiori limitanti per la crescita delle piante, ragion per cui è apportato in grande quantità alle coltivazioni sotto forma di azoto inorganico. Numerosi dati agronomici indicano come la disponibilità azotata e gli apporti esogeni, in termini quantitativi e qualitativi (nitrato, ammonio e urea), alterano la severità di delle malattie vegetali. In linea generale è ormai noto che eccessi di azoto aumentano la suscettibilità delle piante alle malattie, questo fenomeno è stato descritto nelle infezioni di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Alternaria solani*, *Pythium* e molti altri patogeni fungini. D'altro canto bassi livelli d'azoto diminuiscono la virulenza dei patogeni. Infatti studi condotti su *Penicillium* e *Aspergillus* hanno dimostrato che in contesti carenti in azoto viene repressa l'espressione dei geni coinvolti nella virulenza. Apporti esogeni di azoto possono influire sulle difese della pianta, infatti carenze azotate comportano una riduzione della capacità di risposta ai patogeni (Fagard *et al.*, 2014). Alcuni fattori di virulenza (fitotossine) interferiscono sul metabolismo dell'azoto o degli amminoacidi nell'ospite (Snoeijers *et al.*, 2000). L'utilizzazione dell'azoto è un processo altamente regolato in tutti gli organismi. I funghi sono capaci di utilizzare una grande varietà fonti di azoto ma preferiscono la forma ammoniacale e la glutammina (ter Schure *et al.*, 2000). L'utilizzazione selettiva di una fonte azotata piuttosto che un'altra implica l'espressione o repressione di alcuni geni, questo fenomeno è conosciuto come repressione per cataboliti dell'azoto (Wong *et al.*, 2008). In *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* è stato di recente scoperto che alcune funzioni mediate dalla *Mitogen activated Protein Kinase* (MAPK) Fmk1 (Di Pietro *et al.*, 2001), relazionate con la virulenza, vengono regolate dalla fonte azotata. Nel ceppo *wild tipe* l'adesione alla radice, penetrazione di membrane *cellophane* e capacità di arrecare malattia alla pianta sono inibite in presenza di ammonio [(NH₄)₂SO₄ e NH₄NO₃], mentre restano attive in

presenza di nitrato (NaNO_3) (López-Berges *et al.*, 2010). La repressione della virulenza in presenza di ammonio è legata ai geni codificanti per la *bZIP protein* MeaB e per il trasportatore d'ammonio MepB. Entrambe i geni non sono essenziali per la virulenza ma svolgono un ruolo chiave nella repressione della stessa in presenza di ammonio. Infatti in presenza di ammonio i mutanti ΔMeaB e ΔMepB riescono ad aderire alla radice, fare fusione ifale, penetrare membrane di cellophane ed arrecare la malattia alla pianta. E' stato inoltre dimostrato che la fonte azotata condiziona l'evoluzione del pH extracellulare, infatti studi condotti in mezzo minimo con diverse forme di azoto hanno dimostrato come l'utilizzo di nitrato induce l'alcalinizzazione del mezzo, mentre l'utilizzo di ammonio comporta l'abbassamento del pH extracellulare. Anche in questo caso i mutanti ΔMeaB e ΔMepB hanno una risposta alterata, infatti in presenza di nitrato di ammonio alcalinizzano (Segorbe, 2015).

- **Ferro.** Il ferro è un elemento chiave per tutti gli organismi, ha il ruolo di cofattore in una vasta gamma di processi cellulari. Tuttavia l'eccesso di questo metallo può essere estremamente tossico promuovendo la produzione di specie reattive dell'ossigeno. A causa di questo duplice aspetto e causa della bassa biodisponibilità, gli organismi hanno sviluppato meccanismi per il mantenimento dell'omeostasi del ferro, bilanciando l'assorbimento con l'utilizzo e lo stoccaggio dello stesso. Si stima che nel suolo la disponibilità di ferro solubile (Fe^{+++}) ammonti a solo 10^{-10} M circa. In questo ecosistema sia le piante che il microbioma della rizosfera hanno sviluppato dei meccanismi molto efficaci per il sequestro di ferro, pertanto l'autore López-Berges ha ipotizzato il coinvolgimento dei meccanismi di omeostasi del ferro di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* nel processo di patogenesi dello stesso. Recentemente è stato dimostrato come il fattore di trascrizione HapX, che regola l'omeostasi del ferro in *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ed altri saprofiti come *Aspergillus nidulans*, abbia un ruolo fondamentale nella virulenza degli stessi. Infatti la delezione del gene HapX riduce la capacità di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* di invadere ed uccidere l'ospite. La virulenza su piante di pomodoro è ulteriormente ridotta in presenza del l'agente di biocontrollo *P. putida*, mentre tale riduzione scompare se si adopera un ceppo batterico incapace di produrre siderofori. Questi risultati dimostrano il ruolo fondamentale del fattore di trascrizione HapX nella competizione per il ferro con la pianta e con i microrganismi, quindi il ruolo fondamentale del ferro nel processo di patogenesi (López-Berges *et al.*, 2012)

- pH:** Il pH di una soluzione acquosa è una proprietà molto importante. Le cellule di un organismo, per gran parte costituite di acqua e che vivono in ambienti acquosi, hanno sviluppato sofisticate strategie per percepire, sfruttare e modificare il pH dell'ambiente circostante. La capacità di mutare o adattarsi ad un determinato pH è alla base di innumerevoli processi biologici, tra cui l'acquisizione di nutrienti, comunicazione intercellulare, virulenza e difesa contro i patogeni. pH anomali sono caratteristici di numerose malattie sia animali che vegetali, ivi inclusi varie tipologie di cancro negli animali e di tumori nei vegetali. Benché il pH citosolico sia neutro (7,2-7,4) le cellule sono capaci di produrre pH estremi, sia acidi che basici, con diverse finalità biologiche, questo a livello extracellulare o in organelli (esempio vacuoli) (Criscitiello *et al.*, 2013). La virulenza di numerosi patogeni vegetali, sia batterici che fungini, è condizionata all'adattamento all'ospite tra cui anche pH nel sito d'infezione e dell'ambiente circostante. L'espressione di numerosi geni codificanti per fattori di virulenza è condizionata dal pH ambientale e in funghi come *Aspergillus nidulans*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* essa è regolata da cascate di trasduzione (*signalling cascade*) che hanno come componente terminale il fattore di trascrizione PacC/Rim 101p (*zinc finger transcription factor*) (Tilburn *et al.*, 1995, Peñalva & Arst, 2002). In *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* l'espressione del gene PacC è massima in ambiente alcalino mentre si riduce drasticamente in ambiente acido. La delezione del gene PacC accresce la virulenza rispetto al ceppo *wild type*, mentre rendendo costitutiva l'espressione del gene si ottiene la riduzione della virulenza. Quindi per *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* il gene PacC regola negativamente la virulenza (Caracuel *et al.*, 2003). Ricerche su *A. nidulans* e *S. sclerotiorum* hanno descritto come PacC controlla l'espressione di importanti geni di virulenza, evidenza ancora non del tutto chiara in *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Tilburn *et al.*, 1995, Rollins & Dickman, 2001). Oltre alla percezione del pH e consecutiva espressione genica, numerosi funghi fitopatogeni sono capaci di alterare attivamente il pH extracellulare. Esistono specie che acidificano durante il processo infettivo come *Penicillium* spp. (Prusky *et al.*, 2004, Hadas *et al.*, 2007), *Botrytis* spp. (ten Have *et al.*, 2001, Manteau *et al.*, 2003), *Sclerotinia* spp. (Rollins & Dickman, 2001, Kim *et al.*, 2007), *Phomopsis* spp. (Davidzon *et al.*, 2010) e *Aspergillus* spp. (Karaffa & Kubicek, 2003). Altri funghi, come ad esempio *Colletotrichum* spp. (Alkan *et al.*, 2008) o *Alternaria alternata*, alcalinizzano durante il processo di infezione (Eshel *et al.*, 2002). *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, come altri patogeni tellurici, durante il

processo di patogenesi interagisce attivamente con l'apparato radicale il quale tende fisiologicamente ad acidificare l'ambiente circostante (Römheld *et al.*, 1984). I cambiamenti di pH nel suolo sono controllati e ridotti dal sistema tampone di quest'ultimo, pertanto la pianta investe molta energia a tale scopo. L'abbassamento del pH nella rizosfera consente l'aumento della solubilità di numerosi nutrienti tra cui il ferro. Ricerche condotte su *Medicago ciliaris* dimostrano come l'acidificazione nella rizosfera è il risultato della secrezione di acidi organici mediante l'enzima *malate dehydrogenase* e l'espulsione di protoni grazie all'attività enzimatica H^+ *ATPase*. L'attività enzimatica aumenta se si pone la pianta in carenza di ferro o presenza di EDTA, con conseguente produzione di essudati radicali maggiormente acidi (M'Sehli *et al.*, 2008). L'acidificazione della rizosfera è nota anche per le piante di pomodoro, infatti in un mezzo scarsamente tamponato la radice riesce ad abbassare il pH extracellulare di un'unità. L'acidificazione si annulla se si incuba la radice in presenza di conidi di *F. oxysporum*. Questo suggerisce che durante il processo infettivo questo patogeno è capace di incrementare attivamente il pH extracellulare contrastando l'acidificazione prodotta dalla pianta (Segorbe Luque, 2015). Evidenza confermata dal fatto che se si tampona il pH a livelli acidi il fungo subisce una riduzione di virulenza, stesso risultato si ottiene apportando azoto sotto forma di ammonio, in questo caso l'acidificazione prodotta dal fungo impedisce l'instaurarsi del processo infettivo (López-Berges *et al.*, 2010). In presenza di azoto sotto forma di nitrato o urea il fungo alcalinizza conservando la normale virulenza (López-Berges *et al.*, 2010). I meccanismi attraverso i quali questo fitopatogeno alcalinizza non sono del tutto noti ma si può affermare che esiste una relazione tra la fonte azotata ed il cambio del pH del mezzo colturale. Questo fenomeno è ampiamente caratterizzato nei lieviti ed è conservato nel regno fungino. *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* oltre a mutare esso stesso il pH dell'ambiente circostante riesce ad indurre alterazioni del pH radicale (Segorbe Luque, 2015). Dall'analisi della sequenza genomica sono stati identificati geni codificanti per una proteina chiamata *Rapid ALkalinization Factor* (RALF). I RALF comprendono un'ampia famiglia di peptidi conservati nel regno vegetale che regolano lo sviluppo cellulare. In *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* questo gene è sovra-espresso durante l'infezione dell'apparato radicale di pomodoro. Il trattamento di colture cellulari di pomodoro con il peptide sintetico RALF innesca una rapida alcalinizzazione del mezzo extracellulare. Inoltre trattando l'apparato radicale con questo peptide si ottiene l'inibizione dello sviluppo e la drastica riduzione della

proliferazione di peli radicali, sia in piante di pomodoro che di *Arabidopsis*. I mutanti fungini con delezione del gene RALF mostrano un'attenuazione della virulenza e inducono una maggiore espressione di geni di difesa nell'ospite. La normale alcalinizzazione extracellulare che si osserva nell'interazione del ceppo *wild tipe* con piante di pomodoro è assente nell'interazione con il mutante per il gene RALF (Masachis *et al.*, 2015).

Cascate di trasduzione del segnale

I funghi sono capaci di percepire e rispondere ai cambiamenti nell'ambiente circostante, in tal senso le vie di trasduzione del segnale giocano un ruolo fondamentale. Generalmente la trasduzione del segnale implica l'unione di un ligando con un recettore, quest'ultimo cambiando conformazione attiva i componenti successivi della cascata di trasduzione generando una reazione a catena. Il tutto si traduce in un'alterazione dell'espressione genica volta a dare una risposta adeguata allo stimolo percepito. Negli eucarioti la trasduzione e l'amplificazione del segnale è affidata ad una classe di proteine chiamate chinasi del tipo serina/treonina, conosciute come MAPK acronimo di "*Mitogen-Activated Protein Kinases*" (Widmann *et al.*, 1999). Le vie MAPK sono costituite da domini molto conservati e suddivise in tre specie: la MAP Chinasi Chinasi Chinasi (MAPKKK), la MAP Chinasi Chinasi (MAPKK) e la MAP Chinasi (MAPK). Queste in sequenza e nell'ordine in elenco si attivano l'una con l'altra mediante fosforilazione dei residui serina/treonina. La trasduzione del segnale può avvenire direttamente tra queste tre tipologie di chinasi oppure per via trasversale mediante intermedi. Le chinasi utilizzano come substrato di fosforilazione un gruppo molto ampio di substrati relazionati con il metabolismo cellulare, il ciclo cellulare, espressione genica in risposta a stress extracellulari (Qi & Elion, 2005).

MAPK in *Fusarium oxysporum*

In *F. oxysporum* sono conosciute tre MAPK chiamate Fmk1, Mpk1 e Hog1. Mentre è noto da tempo la funzione della chinasi Fmk1 ed il ruolo di questa nella patogenicità, le altre due chinasi sono state oggetto di studio recentemente:

- In *F. oxysporum* il gene Fmk1 codifica per una chinasi che controlla diversi aspetti correlati con la virulenza, tra cui la formazione di ife specializzate nell'infezione, adesione alla radice, penetrazione e crescita invasiva (Di Pietro et al., 2001, Prados Rosales & Di Pietro, 2008). Gli aspetti regolati da questa chinasi sono tutti coinvolti nelle primissime fasi dell'infezione (Mendgen et al., 1996, Pérez-Nadales & Di Pietro, 2011). Questo ad eccezione del processo germinativo in quanto Fmk1 non regola la germinazione conidica. Altra caratteristica del mutante per la chinasi Fmk1 in *F. oxysporum* è l'incapacità di crescere in tessuti vegetali vivi, infatti se inoculato in ferite artificiali su frutti di pomodoro non riesce a sviluppare marcescenza (Di Pietro et al., 2001). Questa incapacità scaturisce dall'alterazione della secrezione di enzimi litici che degradano la parete cellulare. (Di Pietro et al., 2001). La chinasi Fmk1 ha un ruolo chiave anche nella virulenza in *Galleria mellonella* e ratti immunodepressi, contribuendo in forma minoritaria nell'infezione di animali (Navarro-Velasco et al., 2011). La chinasi Fmk1 è responsabile della risposta chemiotropica al glucosio e all'amminoacido glutammato (Turrà et al., 2015).
- La delezione della chinasi Mpk1 in *F. oxysporum* influenza l'espressione dei geni coinvolti nell'integrità di parete, tanto che la colonia presenta un aspetto alterato. Questo mutante presenta una virulenza molto attenuata in pianta, questo fenotipo molto probabilmente scaturisce dal fatto che l'alterazione della parete cellulare, quindi l'esposizione di domini costitutivi di questa struttura cellulare, fanno sì che questo ceppo venga riconosciuto dal sistema di difesa della pianta. Ciò è confermato dal fatto che il mutante non ha nessun difetto nella penetrazione di membrane di cellulosa (cellofane). La delezione di questa chinasi inoltre altera la sintesi dell'acido fusarico e dei siderofori (Ding et al., 2015). Mutanti *knockout* per la chinasi Mpk1, così come altre proteine di questa via di trasduzione (Ste2, Bck1, Mkk2) non rispondono agli stimoli chemiotropici offerti dalla pianta (essudati radicali, enzima perossidasi, acqua ossigenata), stimoli chiaramente attrattivi per il ceppo *wild type* (Turrà et al., 2015). Anche questa chinasi condiziona in maniera minoritaria la virulenza nei confronti di *G. mellonella* (Segorbe Luque, 2015).
- La delezione nel gene codificante per la chinasi Hog1 in *F. oxysporum*, così come in molti altri funghi (Dixon et al., 1999, Segmüller et al., 2007, Igbaria et al., 2008), determina una riduzione di crescita in presenza di stress osmotici (in soluzioni ad alta concentrazione salina, ipertonica). L'assenza di questa chinasi genera un ritardo

nell'infezione di piante di pomodoro così come in *G. mellonella* (Segorbe Luque, 2015).

Scopo della tesi

I patogeni ad *habitat* terricolo causano devastanti perdite di produzione agricola e sono particolarmente insidiosi a causa della persistenza dei propaguli nel suolo e della conseguente difficoltà di controllo. Non fa eccezione *F. oxysporum* che, come premesso nel capitolo introduttivo, comprende numerose ff.spp. che causano marciume secco all'apparato radicale e al colletto e conseguente avvizzimento sulla parte aerea (*fusarium wilt*). Sono numerose le colture interessate da attacchi di questo patogeno fungino e talvolta l'entità dei danni è particolarmente consistente fino a minacciare concretamente l'esistenza di alcune specie vegetali o *cultivar* (Ploetz, 2006). L'approccio maggiormente utilizzato nel fronteggiare le perdite produttive da attacchi da *F. oxysporum* è la selezione di varietà resistenti, trasferendo geni di resistenza naturalmente presenti nella popolazione vegetale. Un'alternativa nella gestione delle fusariosi è la selezione e caratterizzazione di agenti di controllo biologico. *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* attualmente non costituisce un problema concreto per la coltivazione del pomodoro, in quanto i genotipi coltivati sono nella maggior parte dei casi resistenti a questo patogeno. L'utilizzo nelle attività sperimentali dell'interazione ospite patogeno *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* - *Solanum lycopersicum* trova giustificazione nel fatto che entrambi gli organismi sono ampiamente studiati e si dispone di una enorme quantità di informazioni. In particolare *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ceppo 4287 razza 2 è oggetto di studio di diversi gruppi di ricerca tra cui il laboratorio di *Mecanismo Molecular de la Patogénesis Fúngica, Departamento de Genética, Universidad de Cordoba* (Spagna). La disponibilità dell'intera sequenza genomica di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* e di una numerosa serie di mutanti *knockout* fa di questo organismo un ottimo modello di studio, e i risultati possono essere applicati in tempi successivi a colture per le quali *F. oxysporum* costituisce un concreto problema fitosanitario. Su tali basi, la sperimentazione che ha portato alla stesura della presente tesi di dottorato si fonda su tre aspetti cruciali che condizionano la virulenza in *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*: fonte azotata; pH; omeostasi del ferro. I tre aspetti descritti non costituiscono le uniche variabili in grado di condizionare la virulenza in questo patogeno ma sono sicuramente e concretamente condizionabili dal microbioma che naturalmente popola la rizosfera. In tale ambito l'obiettivo che ho cercato di perseguire nel corso dei tre anni di dottorato di ricerca ha riguardato lo studio dell'influenza del microbioma batterico sul pH nella rizosfera, analizzando gli effetti di tale alterazione sulla virulenza di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. A tale scopo sono stati utilizzati ceppi *wild type* e mutanti di due specie di batteri Gram-negativi attivi contro *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. I batteri studiati (*P. fluorescens* ceppo CHA0 e *R. aquatilis* ceppo 36) condividono i meccanismi di acidificazione del pH extracellulare. Infatti entrambe le specie di batteri alterano il pH

mediante l'attività dell'enzima di membrana *glucose dehydrogenase* (Gcd) che ossida il glucosio periplasmatico in acido gluconico. Di entrambe le specie batteriche è stata valutata l'effettiva capacità di alterare il pH extracellulare in mezzi sintetici e nella rizosfera, associando tale aspetto con la capacità di controllare *in vitro* ed *in vivo* la proliferazione e la virulenza di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Tale obiettivo è stato perseguito mediante l'utilizzo di mutanti batterici per il gene Gcd. In particolare, come descritto nei capitoli introduttivi, per il ceppo CHA0 di *P. fluorescens* era già stato studiato il ruolo dell'acido gluconico nel controllo di *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* e *Rhizoctonia solani* mediante la produzione del mutante *knockout* del gene Gcd (CHA1196). In precedenti ricerche (de Werra *et al.*, 2009) è stato riportato come all'incremento di efficacia *in vivo* che *in vitro* del ceppo CHA1196 contro i due patogeni sia correlata ad una maggiore sintesi di 2,4-*diacetylphloroglucinol* e *pyoluteorin*, entrambe molecole antifungine. Grazie alla collaborazione con il Prof. Christoph Keel dell'*Université de Lausanne* (Svizzera), *Département de Microbiologie Fondamentale* è stato possibile utilizzare nelle prove sperimentali i ceppi descritti dallo stesso autore (CHA0, CHA1196, CHA1197, CHA1198) (de Werra *et al.*, 2009), nonché i mutanti per le molecole antifungine anzidette (CHA661 e CHA1241) ed una serie di mutanti multipli (CHA1242 e CHA1244). Per quanto riguarda il batterio *R. aquatilis* era già nota l'attività antimicrobica dell'acido gluconico nei confronti di batteri del genere *Agrobacterium* (Guo *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2014). Nel presente lavoro di tesi sono stati prodotti mutanti *knockout* per il gene Gcd in *R. aquatilis* ceppo 36 e di questi è stata valutata la capacità di biocontrollo nei confronti di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, nonché l'influenza dell'acido gluconico sul pH nella rizosfera. La caratterizzazione dei mutanti batterici ha permesso di dimostrare una chiara associazione tra l'acidificazione del mezzo extracellulare e la capacità di biocontrollo, pertanto le attività sperimentali nell'ultimo anno di dottorato hanno avuto come obiettivo la comprensione degli effetti del pH sulla fisiologia fungina, analizzando nello specifico la produzione di metaboliti secondari di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* a pH differenti e in presenza di differenti fonti di azoto. In tutti gli esperimenti condotti, oltre al ceppo *wild type* 4287 di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, sono stati utilizzati una serie di mutanti *knockout* descritti nei paragrafi introduttivi ed elencati in tabella 3. In particolare sono stati utilizzati tre mutanti per le tre MAPK ($\Delta mpk1$, $\Delta fmk1$, Δhog) descritte in *F. oxysporum*. Tale approccio ha reso possibile l'individuazione della via chinasi coinvolta nell'interazione con i microrganismi batterici o le alterazioni da essi provocate. Ciò è stato possibile grazie anche alla consolidata collaborazione con il prof. Antonio di Pietro dell'Università di Cordova.

Materiali e metodi

Materiale biologico

Nel corso di questo studio è stato utilizzato il ceppo CHA0 di *Pseudomonas fluorescens* isolato dalla rizosfera di tabacco in Svizzera (Stutz *et al.*, 1986), fornitoci dal Prof. Christoph Keel dell'*Université de Lausanne* (Svizzera), *Département de Microbiologie Fondamentale*. Questo ceppo batterico produce diversi metaboliti secondari con un ampio spettro di attività antimicrobica, riuscendo a controllare numerosi patogeni fungini ad habitat terricolo. Questo ceppo batterico è stato sottoposto a sequenziamento del genoma e attualmente si dispone dell'intera sequenza (Jousset *et al.*, 2014). Oltre al ceppo *wild type* ci sono stati forniti una serie di mutanti elencati nella tabella 2. Altro batterio Gram-negativo caratterizzato nel presente lavoro è stato *Rahnella aquatilis* ceppo 36, isolato dalla rizosfera di cece presso il laboratorio di Patologia vegetale del Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti dell'Università del Molise. Sperimentazioni precedenti hanno evinto come questo ceppo batterico sia capace di solubilizzare il fosforo tricalcico, produrre auxine metabolizzando il triptofano e colonizzare abilmente la rizosfera di cece esercitando un'azione antifungina nei confronti di *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* e *F. solani* f.sp. *pisi*. Nel corso della sperimentazione sono stati prodotti diversi ceppi ricombinati resistenti alla kanamicina descritti nella tabella 2. La capacità antagonistica dei ceppi batterici *wild type* e mutanti sono state saggiate nei confronti di *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ceppo 4287 (razza 2). Oltre al ceppo *wild type* sono stati utilizzati diversi mutanti *knockout* con la finalità di comprendere la natura delle interazioni tra fungo patogeno e agenti di biocontrollo. I mutanti, elencati e descritti nella tabella 3, ci sono stati forniti dal Prof. Antonio di Pietro dell'*Universidad de Cordoba* (Spagna), *Departamento de Genética, laboratorio de Mecanismo Molecular de la Patogénesis Fúngica*. Oltre alla f.sp. *lycopersici* sono stati utilizzati 8 ceppi *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*, elencati e descritti nella tabella 3. Questi ceppi fungini ci sono stati forniti dalla Prof.ssa Teresa Millan dell'*Universidad de Cordoba* (Spagna), *Departamento de Genética, laboratorio de Mejora Genética de Leguminosas y de Grano*. Nei saggi di controllo biologico *in vivo* sono state utilizzate piante di pomodoro (*Solanum lycopersicum*) della varietà Moneymaker (La Mayora, CSIC, Málaga), linea varietale sensibile alla razza 2 di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Vettori plasmidici e oligonucleotidi

Nel corso di questo studio sono stati realizzati costrutti ricombinanti allo scopo di generare mutanti *knockout* del ceppo 36 di *Rahnella aquatilis*. A tale scopo è stato utilizzato il plasmide pET-28a-c(+) come fonte del gene di resistenza all'antibiotico kanamicina e il plasmide pGem-T[®] per il clonaggio rapido del costrutto ricombinante, permettendone l'amplificazione e conservazione in *Escherichia coli* (tabella 9).

Gli oligonucleotidi sintetici (Invitrogen) utilizzati come primer nelle reazioni PCR sono stati disegnati mediante il programma Oligo 7 (Primer Analysis Software, versione 7.4, Molecular Biology Insights, Inc. USA), ottimizzando in ciascun caso la stabilità interna, minimizzando formazione di dimeri o di strutture secondarie stabili non desiderare e analizzando parametri fisici necessari nell'impostazione delle reazioni PCR (T_m , T_d , %G + C, %A + T). La tabella 4 riassume tutti gli oligonucleotidi utilizzati in questo lavoro, le sequenze nucleotidiche indicate in minuscolo indicano i nucleotidi aggiunti ai primer per favorire l'ibridazione e poter generare il costrutto ricombinante.

Substrati culturali, buffer e reagenti

Substrati

I substrati di coltura liquidi e agarizzati impiegati in questo studio sono stati sterilizzati in autoclave a 1,2 atmosfere e 120°C per 20 minuti, oppure mediante filtrazione utilizzando filtri con porosità del diametro di 0,22 μm . I terreni di coltura solidi sono stati versati in piastre Petri prima della solidificazione.

- **Luria-Bertani:**

Liquido (LB): yeast extract 10 g L⁻¹, bacto-tryptone 5 g L⁻¹, NaCl, 5 g L⁻¹;

Solido (LA): mezzo di coltura LB con l'aggiunta di bacteriological agar 18 g L⁻¹;

- **X-Gal Medium:** mezzo di coltura LA arricchito con isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG) 134 μM , X-Gal 0,005% (p/v), ampicillina 0,005% di (p/v), bacteriological agar 18 g L⁻¹;
- **King's B:** proteose-peptone 20 g L⁻¹, glicerolo 10 g L⁻¹, K₂HPO₄ 1,5 g L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 1,5 g L⁻¹;
- **Potato Dextrose:**

Liquido (PDB): sono stati fatti bollire 200 g di patate in un litro di acqua distillata per un ora. Trascorso questo tempo il brodo di patate è stato filtrato in tre strati di garza, sono stati aggiunti 20 g di D-glucosio anidro e portato ad un litro di volume aggiungendo acqua distillata;

Solido (PDA): stessa preparazione del PDB con l'aggiunta di bacteriological agar 18 g L⁻¹;

- **Yeast extract Peptone Dextrose Agar (YPDA):** yeast extract 3 g L⁻¹, mycological peptone 10 g L⁻¹, D-glucosio anidro 20 g L⁻¹, bacteriological agar 18 g L⁻¹;
- **Mezzo Minimo con differenti fonti azotate:**
 - Nitrato di Sodio (MMNS):** MgSO₄·7(H₂O) 0,5 g L⁻¹, KCl 0,5 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1 g L⁻¹, NaNO₃ 2,125 g L⁻¹, saccarosio 15 g L⁻¹;
 - Urea (MMU):** MgSO₄·7(H₂O) 0,5 g L⁻¹, KCl 0,5 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1 g L⁻¹, urea 1,5015 g L⁻¹, saccarosio 15 g L⁻¹. La soluzione di urea è stata preparata e filtro-sterilizzata separatamente dalla restante parte del substrato, alla quale è stata aggiunta dopo il passaggio in autoclave una volta raffreddata 55 °C;
 - Solfato di Ammonio (MMSA):** MgSO₄·7(H₂O) 0,5 g L⁻¹, KCl 0,5 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 3,3 g L⁻¹, saccarosio 15 g L⁻¹;
 - Nitrato di Ammonio (MMNA):** MgSO₄·7(H₂O) 0,5 g L⁻¹, KCl 0,5 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1 g L⁻¹, NH₄NO₃ 2 g L⁻¹, saccarosio 15 g L⁻¹;

Tutti i mezzi minimi descritti, quando utilizzati per la coltivazione di batteri, sono stati modificati sostituendo il saccarosio con il D-glucosio anidro (15 g L⁻¹), aggiunto al substrato previa filtro-sterilizzazione dopo la sterilizzazione del mezzo in autoclave. Il pH è stato corretto con HCl 2N oppure con NaOH 4M a seconda della necessità.

- **Top-Agar (TA):** bacteriological agar 5g L⁻¹;
- **National Botanical Research Institute Phosphate Medium (NBRIP):** D-glucosio anidro 10 gr L⁻¹, Ca₃(PO₄)₂ 5 g L⁻¹, MgCl₂ 0,5 g L⁻¹, MgSO₄ x 7 H₂O 0,25 g L⁻¹, KCl 0,2 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 0,1 g L⁻¹, bacteriological agar 20 g L⁻¹; pH 7 (Khairnar et al., 2003).

Nel corso di questo studio più volte è stato necessario l'utilizzo di antibiotici per i quali sono state preparate soluzioni concentrate (*stock solution*) filtro-sterilizzate. Nello specifico è stata utilizzata: l'ampicillina concentrazione finale 100 mg L⁻¹ (100 ppm); la kanamicina

concentrazione finale 50 mg L⁻¹ (50 ppm); la streptomina concentrazione finale 50 mg L⁻¹ (50 ppm); l'igromicina B concentrazione finale 20 mg L⁻¹ (20 ppm) in mezzo liquido e 55 mg L⁻¹ (55 ppm) in mezzo solido; la fleomicina concentrazione finale 2,4 mg L⁻¹ (2,4 ppm) in mezzo liquido e 6 mg L⁻¹ (6 ppm) in mezzo solido, aggiunta dopo aver portato a 8 il pH del substrato con NaOH 4M. Tutti gli antibiotici sono stati aggiunti dopo la sterilizzazione in autoclave del substrato, ad una temperatura di circa 55°C. Nell'attuazione di alcuni protocolli è stato necessario tamponare il pH dei substrati a valori specifici, a tale scopo alla normale composizione sono stati aggiunti 100 o 50 mM di MES monoidrato (*4-morpholineethanesulfonic acid monohydrate*) fissando il pH del mezzo colturale a valori specifici mediante l'aggiunta di HCl 2N oppure con NaOH 4M.

Buffer e reagenti

- **Phosphate Buffer Solution (PBS):** NaCl 8 g L⁻¹, KCl 0,2 g L⁻¹, Na₂HPO₄ 1,44 g L⁻¹; KH₂PO₄ 0,24 gr L⁻¹; pH 7.5;
- **Tris-EDTA buffer (TE):** Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM;
- **Tris Acetate EDTA buffer (TAE):** Tris acetate 40 mM, EDTA 1 mM; pH 8.2-8.4;
- **Bromocresol purple:** 0,045% (p/v) in acqua distillata;
- **Bromocresol green:** 0,045% (p/v) in acqua distillata;
- **Reagente Chromeazurol S (CAS):** Chromeazurol S 605 mg L⁻¹, FeCl₃ 0,1 mM, HDTMA 729 mg L⁻¹;
- **Soluzione I:** Tris-HCl 100mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0;
- **Soluzione II:** NaOH 0,2 N, SDS 1% (p/v);
- **Soluzione III:** Acetato di potassio 3M, acido acetico glaciale 11,5 % (v/v);
- **STE buffer (STE):** NaCl 100 mM, Tris-Cl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0.

Allevamento e conservazione del materiale biologico

Ceppi fungini

Le colture fungine sono state incubate a 28°C in PDB con agitazione orbitale 150 rotazioni per minuto (rpm). Al substrato colturale, indipendentemente dal ceppo fungino, sono stati aggiunti gli antibiotici streptomina e ampicillina alla concentrazione di 100 ppm per evitare contaminazioni batteriche, mentre per la coltivazione dei mutanti *knockout* è stata aggiunta l'igromicina B e/o fleomicina rispettivamente alle concentrazioni 20 e 6 ppm. La raccolta dei

conidi è stata eseguita dopo 5-6 giorni di coltura previo filtraggio del brodo di coltura con triplo strato di garza sterile per due volte. La sospensione conidica (prevalentemente microconidi) non trattenuta dalla garza è stata centrifugata 10.000 rpm per 5 minuti e quantificata mediante conteggio alla cella conta-globuli (mod. Fuchs-Rosenthal). Tutti i ceppi fungini utilizzati sono stati messi in collezione a -80°C in una soluzione acquosa di glicerolo al 30% (v/v) ad una concentrazione non inferiore di 5×10^8 conidi ml^{-1} . Le sospensioni conidiche così preparate e conservate sono state utilizzate come inoculo *in ratio* 100 μl ogni 50 ml di PDB. Per brevi periodi i ceppi fungini in uso sono stati conservati in piastre Petri con PDA a 4°C.

Ceppi batterici

Le colture di *P. fluorescens* e *R. aquatilis* sono state incubate a 28°C in agitazione costante a 180 rpm utilizzando substrati liquidi a base di King's B e LB. Per entrambi i batteri al substrato è stato aggiunto l'antibiotico ampicillina (100 ppm) allo scopo di evitare contaminazioni da altri batteri. Per la coltivazione dei mutanti *knockout* di *R. aquatilis* e del ceppo CHA661 di *P. fluorescens* al substrato colturale è stato aggiunto l'antibiotico kanamicina alla concentrazione di 50 ppm. Allo scopo di mettere in correlazione la crescita microbica con l'assorbanza del mezzo, per entrambe le specie batteriche è stata quantificata la concentrazione (CFU ml^{-1}) e la densità ottica a 600 nm (OD_{600}) di una coltura di 24 ore di incubazione in mezzo liquido. *E. coli* ceppo top10 è stato coltivato in LB alla temperatura di 37°C e in costante agitazione (180 rpm), oppure in LA in piastre Petri alla stessa temperatura. Al substrato è stato aggiunto l'antibiotico ampicillina 100 ppm per i ceppi recanti il plasmide pGem-T[®] oppure kanamicina 50 ppm per i ceppi con plasmide pET-28a-c(+), entrambi gli antibiotici sono stati utilizzati per la coltivazione dei ceppi recanti il plasmide pGem-T[®] con l'insero ricombinante. Tutti i ceppi batterici sono stati messi in collezione a -80°C in una soluzione di glicerolo al 30% in LB. L'inoculo batterico, a partite dalle collezioni in glicerolo, prevedeva l'utilizzo di 100 μl ogni 50 ml di LB.

Piante di pomodoro

I semi di pomodoro della varietà *MoneyMaker* sono stati sterilizzati superficialmente immergendoli in una soluzione acquosa di ipoclorito di sodio all'1% (v/v), a temperatura ambiente per venti minuti. Trascorso questo tempo i semi sono stati lavati per 10 minuti in

abbondante acqua distillata sterile per tre volte. I semi sono stati posti a germinare in vermiculite sterile umida in camera di crescita a 28°C con fotoperiodo 14/10 ore di luce/buio. Nei saggi di controllo biologico, così come per la raccolta di essudati radicali sono state utilizzate piante di pomodoro allo stadio fenologico di prima foglia vera, corrispondente a circa 15 giorni dopo la semina. Le piante più idonee sono state prelevate delicatamente dalla vermiculite e l'apparato radicale è stato liberato dei residui di substrato mediante lavaggi sotto acqua corrente.

Prova *in vivo* su piante di pomodoro

I ceppi batterici utilizzati nelle prove di controllo biologico contro *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (*Fol*) sono stati allevati per 12 ore nelle condizioni precedentemente descritte. Le colture cellulari batteriche, bloccate nella fase esponenziale di crescita, sono state centrifugate per 10 minuti a 5.000 rpm, lavate per tre volte in acqua distillata sterile, e risospese in PBS sterile. Della sospensione cellulare madre ne è stata stimata la concentrazione misurandone la OD₆₀₀, per poi diluirla alla concentrazione 5x10⁶ CFU ml⁻¹. Nelle prove di controllo biologico sono stati impiegati il ceppo *wild type* e il mutante $\Delta hapX$ di *Fol*. Per entrambi i ceppi è stata utilizzata una sospensione conidica alla concentrazione 5x10⁶ conidi ml⁻¹ in PBS. Le radici delle piante di pomodoro, preparate come descritto in precedenza, sono state immerse per 60 minuti nella sospensione batterica e per 30 minuti nella sospensione conidica. Il controllo positivo è stato immerso per 60 minuti in PBS e 30 minuti nella sospensione conidica mentre il controllo negativo per 90 minuti in PBS. Dopo il trattamento le piante sono state trapiantate in seminiere alveolari con vermiculite sterile. Per ciascuna tesi sono state utilizzate 15 piante. La prova così allestita è stata posta in camera di crescita a 28°C con fotoperiodo di 14/10 ore luce/buio e irrigata quotidianamente con acqua di rubinetto. Fanno eccezione le tesi per le quali si voleva controllare il pH di interazione, in questo caso sono state adoperate soluzioni di MES 1 mM a pH 5 e pH 7 (Segorbe Luque, 2015). L'evoluzione della malattia è stata monitorata dalla comparsa dei primi sintomi (7/10 giorni dall'inoculazione del patogeno) fino alla morte completa del controllo positivo con rilievi giornalieri. Tale valutazione è stata eseguita utilizzando una scala empirica con cinque differenti gradi di malattia: 1 - pianta sana; 2 - prime foglie con lievi sintomi; 3 - foglie e picciolo cadenti; 4 - foglie morte cadenti; 5 -

pianta morta (figura 7). L'evoluzione della malattia è stata anche definita come percentuale di piante sopravvissute nel tempo (Di Pietro *et al.*, 2001).

Interazione *in vitro* (coltura duale)

L'influenza dei ceppi batterici *wild type* e mutanti (*P. fluorescens* e *R. aquatilis*) sull'accrescimento radiale in piastra Petri di *Fol* ceppo *wild type* e mutanti è stata studiata in coltura duale, utilizzando il substrato agarizzato MMU con glucosio. Le piastre Petri del diametro di 9 cm contenenti circa 12 ml di substrato sono state inoculate ponendo nella parte centrale uno spot di 5 µl di una sospensione conidica avente concentrazione di 5×10^8 conidi ml^{-1} , mentre distanziati 2,5 cm dal centro due spot di 5 µl di una sospensione batterica in PBS con OD_{600} di 0,1. Oltre alle piastre di interazione sono state allestite delle piastre di controllo nelle quali sono stati inoculati i singoli microrganismi. Le piastre sono state poste ad incubare a 28°C. Ciascuna interazione prevedeva tre repliche. L'accrescimento fungino è stato valutato misurandone la crescita radiale, con rilievi quotidiani dal terzo giorno dopo l'inoculo. L'influenza dei batteri sullo sviluppo fungino è stata espressa come inibizione percentuale utilizzando la seguente formula:

$$I\% = [(R_c - R_t) / R_c] \times 100$$

Dove:

- R_c = accrescimento radiale del fungo nella tesi controllo;
- R_t = accrescimento radiale del fungo nelle tesi trattamento.

L'influenza dei ceppi di *P. fluorescens* CHA0 sull'accrescimento radiale fungino è stata valutata anche in presenza di 5 mM di FeCl_3 , aggiungendo questo sale al MMU con glucosio agarizzato e procedendo come descritto in precedenza.

Quantificazione del chemiotropismo fungino

Una sospensione conidica è stata incorporata in 4 ml di TA liquido alla temperatura di 50°C, alla concentrazione finale di $2,5 \times 10^6$ conidi per ml^{-1} e versata in una piastra Petri (\varnothing 9 cm). Sul fondo della piastra sono state tracciate tre linee equidistanti 5 mm (figura 8 A), in

corrispondenza delle linee laterali sono stati eseguiti due tagli nello strato di TA, in uno dei due tagli sono stati aggiunti 50 µl del composto da esaminare e nell'altro lo stesso volume di solvente (Turrà *et al.*, 2015). Le piastre di chemiotropismo così allestite sono state poste ad incubare a 28°C al buio per 13 ore. Decorso questo tempo di incubazione è stato quantificato il chemiotropismo delle germinule (conidi germinati) al microscopio binoculare a 200 ingrandimenti (Olympus CX22 Binocular Microscope) mediante conteggio delle stesse, in particolare è stato osservato il verso dell'apice ifale, ovvero se rivolto verso la sostanza testata oppure verso il solvente controllo (figura 8.B). Il chemiotropismo espresso come indice di chemiotropismo percentuale è stato calcolato come segue:

$$ICt\% = [(H_{test} - H_{solv})/H_{total}] \times 100$$

Dove:

- H_{test} = numero di germinule con apice ifale diretto verso la sostanza testata.
- H_{solv} = numero di germinule con apice ifale diretto verso il solvente controllo.
- H_{total} = numero di germinule totale conteggiate.

Per ogni test sono state conteggiate 500 germinule e ogni esperimento è stato ripetuto tre volte. L'indice di repulsione (IRt%) agli stimoli è stato espresso come segue:

$$IRt\% = ICt\% \times (-1)$$

Produzione e conservazione degli essudati radicali

Per la produzione degli essudati radicali sono state utilizzate piante di pomodoro della varietà *Moneymaker* allo stadio fenologico di prima foglia vera. L'apparato radicale estratto dalla vermiculite è stato lavato sotto acqua avendo cura di limitare al minimo le lesioni. La radice nuda è stata immersa per 1 minuto in etanolo al 70% (v/v) e successivamente in acqua distillata sterile per 10 minuti eseguendo due lavaggi. Le piante così preparate sono state mantenute in acqua distillata sterile per 48 ore allo scopo di eliminare quelle morte in seguito all'espianto e alla sterilizzazione in etanolo. Per la produzione degli essudati radicali due piante selezionate sono state poste in provette da microbiologica da 50 ml con 5 ml di acqua distillata sterile, immergendo solamente l'apparato radicale, ed incubate senza agitazione a 28°C con fotoperiodo 14/10 ore di luce/buio per 7 giorni. Decorso il periodo di incubazione

sono stati quantificati gli essudati radicali e uniformati tra loro tenendo conto della massa secca dell'apparato radicale. A tale scopo le piantine sono state recise all'altezza del colletto e gli apparati radicali sono stati seccati in stufa a 60°C per 48 ore quantificando la massa secca. Al fine di valutare l'influenza della popolazione batterica sulle caratteristiche degli essudati radicali sono state aggiunte 1×10^6 CFU ml⁻¹ (*P. fluorescens* e *R. aquatilis*). Gli essudati radicali sono stati conservati in microprovette da 2 ml a -20°C (Turrà *et al.*, 2015).

Caratterizzazione *in vitro* dei ceppi *wild type* e mutanti di *P. fluorescens*

Dei ceppi di *P. fluorescens* utilizzati nel presente lavoro di tesi è stata caratterizzata la secrezione di molecole bioattive nel mezzo extracellulare analizzando le proprietà dei brodi colturali dopo 72 ore di incubazione. Un ml di una coltura starter *overnight* in King's B è stata inoculata in 50 ml di MMU con glucosio in beute da 250 ml. Le colture sono state incubate a 28°C a 180 rpm per 72 ore e trascorso questo tempo ne è stata valutata l'assorbanza (OD₆₀₀) al fine di normalizzare i risultati in funzione della biomassa batterica. Allo scopo di verificare la presenza di biomolecole fluorescenti tra cui la pioverdina, le colture batteriche sono state centrifugate a 8.000 rpm per 10 min e il sovrantante filtro-sterilizzato a 0,22 µm mediante l'utilizzo di apparati da filtrazione sotto vuoto (Nalgene, Rapid Flow Filter). Dei brodi di coltura ottenuti è stato misurato il pH e l'assorbanza a 400 nm allo scopo di stimare la concentrazione di pioverdina (Hoegy *et al.*, 2014).

Valutazione della capacità chelante dei brodi colturali batterici

Dei brodi colturali batterici è stata valutata la capacità chelante mediante saggio CAS, analizzando spettrofotometricamente le variazioni colorimetriche del reagente *Chromeazurol*. Il test è stato condotto in piastre *multiwell* da 96 pozzetti, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 112 µl di acqua bidistillata, 50 µl di reagente CAS e 38 µl di brodo di coltura. L'assorbanza è stata misurata a 655 nm (OD₆₅₅) (Microplate Reader, Biorad) ad intervalli regolari di 5 minuti per la prima ora di reazione e successivamente al 75° minuto e 135° minuto. Nella prova è stata inserita una tesi di controllo negativo sostituendo in reazione il brodo di coltura batterico con il substrato di crescita MMU ed una di controllo positivo utilizzando una soluzione 1 mM di EDTA (Pérez-Miranda *et al.*, 2007).

La capacità chelante dei campioni è stata espressa come decremento percentuale della OD₆₅₅, utilizzando la seguente formula:

$$CC \% = [(ODc-ODt)/ODc] \times 100$$

Dove:

ODc = OD a 655 nm del controllo negativo;

ODt = OD a 655 nm del campione saggiato.

Per ogni ceppo batterico sono state effettuate tre repliche biologiche e otto repliche tecniche, l'esperimento è stato ripetuto tre volte. Dei brodi di coltura batterici è stata analizzata la capacità chelante valutando la quantità in FeCl₃ capace di neutralizzare le cariche chelanti presenti. A tale scopo aliquote dei brodi colturali dei ceppi mutanti di *P. fluorescens* CHA1196 e CHA1242 sono state trattate con concentrazioni crescenti di FeCl₃ (0-0,01-0,02-0,05-0,1-0,2-0,5-1-2-5 mM) agitate vigorosamente per 5 minuti e lasciate a temperatura ambiente per un'ora. Dei brodi di coltura così trattati è stata analizzata la capacità chelante residua mediante saggio CAS, esprimendo la capacità chelante come descritto in precedenza.

Saggio di antagonismo in liquido

I filtrati batterici ottenuti, come descritto nei paragrafi precedenti, sono stati utilizzati come base acquosa per la costituzione del substrato MMU (pH 7.0) per la crescita di *Fol*. Il saggio di antagonismo in mezzo liquido è stato eseguito in piastre *multiwell* da 96 pozzetti. In ogni pozzetto sono stati aggiunti 195 µl di substrato e 5µl di una sospensione conidica avente concentrazione 2×10^5 conidi ml⁻¹ (circa 1000 conidi per pozzetto). L'attività inibente dei filtrati colturali è stata valutata oltre che nei confronti di *Fol* ceppo *wild type* anche nei confronti dei mutanti nei geni delle MAPK ($\Delta fmk1$, Δhog , $\Delta mpk1$). Le piastre sono state poste ad incubare a 28°C con un'agitazione di 200 rpm e la crescita è stata monitorata misurando OD₆₀₀ ad intervalli di tempo costanti (24, 48, 72 e 96 ore). Per i brodi di coltura dei mutanti batterici CHA1196 e CHA1242 è stata valutata la capacità di inibizione in seguito al

trattamento con concentrazioni crescenti di FeCl_3 (2 mM e 5 mM) e la crescita fungina è stata monitorata come indicato precedentemente. Allo scopo esprimere l'attività chelante del filtrato colturale dei batteri in equivalenti di un agente chelante chimico sono state eseguite delle soluzioni a diverse concentrazioni di EDTA (2 – 1 - 0,5 - 0,3 - 0,2 - 0,16 - 0,14 - 0,1 - 0,075 - 0,05 - 0,01 - 0,005 - 0,0025 - 0,00125 - 5×10^{-4} - 5×10^{-5} - 5×10^{-6} - 5×10^{-7} - 5×10^{-8} - 5×10^{-9} - 5×10^{-10} - 0 mM). L'analisi CAS di queste diluizioni ha permesso di stimare la concentrazione di EDTA avente capacità chelante prossima a quella dei filtrati colturali batterici. Definita la concentrazione di EDTA con capacità chelante paragonabile a quella dei filtrati colturali dei mutanti batterici CHA1196 e CHA1242 è stato valutato l'accrescimento in liquido di *Fol* ceppo *wild type* in presenza di EDTA. Per tale saggio è stato utilizzato il substrato MMU con aggiunta di EDTA alle concentrazioni 2mM - 1 mM - 0,5 mM - 0,2 mM a pH 7, utilizzando come controllo l'accrescimento fungino in MMU. La crescita fungina è stata valutata come descritto in precedenza.

Estrazione dei metaboliti dal brodo colturale del ceppo CHA1242

Il filtrato colturale del ceppo mutante di *P. fluorescens* CHA1242 (circa 50 ml) è stato acidificato a pH 2.0 con l'aggiunta di qualche goccia di HCl (37% v/v), trasferito in un imbuto separatore e sottoposto ad estrazione liquido/liquido aggiungendo 50 ml di etilacetato e agitando vigorosamente per 5 minuti. Dopo la separazione delle due fasi (dopo circa 30 minuti), la fase organica (superiore) è stata trasferita in un pallone da vuoto (figura 9), mentre la fase acquosa (inferiore) è stata sottoposta ad estrazione per ulteriori due volte. Le tre frazioni organiche sono state riunite e portate a secco mediante evaporatore rotativo (Strike 300, steroglass), con bagnomaria a 45°C e pressione ridotta. Il residuo è stato risospeso in 50 ml di MMU. La fase acquosa è stata trattata per 10 minuti in evaporatore rotativo allo scopo di eliminare i residui di etilacetato ed è stata utilizzata come base acquosa per la costituzione del substrato MMU. Il brodo di coltura del ceppo CHA1242 è stato sottoposto anche ad estrazione con fenolo trattando 50 ml di brodo con 5 ml di solvente. Le due componenti sono state emulsionate agitando vigorosamente per 30 min. La frazione fenolica, separata dalla fase acquosa per centrifugazione a 4.000 rpm per 10 min, è stata portata a secco in evaporatore rotativo con bagnomaria a 45°C e pressione ridotta e risospesa in 50 ml di MMU. Anche in questo caso la frazione acquosa privata del fenolo residuo è stata utilizzata come base per la costituzione del substrato MMU. Degli estratti in etilacetato e fenolo, così come delle fasi acquose esauste, è stata analizzata la OD_{400} e ne è stata valutata la capacità chelante mediante

saggio CAS come descritto in precedenza, inoltre è stata valutata anche la capacità inibente nei confronti di *Fol* come descritto nei paragrafi precedenti.

Valutazione delle alterazioni nella rizosfera prodotte dalla proliferazione batterica

In seguito alle valutazioni fenotipiche *in vitro* dei ceppi *wild type* e mutanti di *P. fluorescens* si è provveduto ad analizzare le alterazioni che la proliferazione dei ceppi batterici determinava in un contesto simile alla rizosfera. La sperimentazione è stata condotta utilizzando piante di pomodoro della varietà *Moneymaker* procedendo come descritto nel paragrafo riguardante la produzione degli essudati radicali. Degli essudati radicali prodotti in presenza dei ceppi *wild type* e mutanti di *P. fluorescens* è stato valutato il pH, la capacità chelante ed il chemiotropismo fungino comparando i risultati con quelli ottenuti dagli essudati radicali prodotti in assenza di batteri. Le alterazioni prodotte dalla proliferazione batterica sulla superficie radicale sono state misurate anche in termini di germinabilità conidica. Il saggio è stato condotto in piastre *multiwell*, ponendo in ciascun pozzetto 200 µl di essudato radicale con circa 1000 conidi di *Fol*. Le piastre *multiwell* così allestite sono state incubate per 15 ore a 28°C a 200 rpm di agitazione. Al termine del periodo di incubazione è stata valutata la percentuale di conidi germinati mediante osservazione al microscopio ottico a 100 ingrandimenti contando almeno 200 conidi per ogni pozzetto. La germinazione conidica ottenuta negli essudati radicali è stata comparata con la germinazione conidica in PDB.

Produzione e caratterizzazione dei mutanti Δgcd di *R. aquatilis*

Estrazione del DNA genomico

Per l'estrazione del DNA genomico batterico sono stati utilizzati 2 ml di una coltura batterica *overnight*, centrifugata in microprovette da 2 ml a 14.000 rpm per 2 min. Dopo la rimozione del surnatante il *pellet* è stato lavato per due volte con 400 µl STE. Le cellule lavate sono state sospese in 200 µl di TE e poste a 100°C per 5 minuti e successivamente a -80°C per 5 minuti. Dopo i trattamenti termici sono stati aggiunti 100 µl di fenolo saturato con Tris-HCl (pH 8) e la sospensione batterica è stata agitata vigorosamente per 1 min. I campioni sono stati centrifugati a 14.000 rpm per 10 min a 4°C separando la fase acquosa da quella organica (fenolo). 160 µl di fase acquosa sono stati trasferiti in una nuova microprovetta da 1,5 ml e vi

sono stati aggiunti 40 µl di TE e 100 µl di cloroformio. I campioni sono stati agitati per 1 min e centrifugati a 14.000 rpm per 10 min a 4°C. Separate le due fasi sono stati prelevati 160 µl di fase acquosa e trasferiti in una nuova microprovetta da 1,5 ml, ai quali sono stati aggiunti 40 µl di TE e 5 µl RNase (10 mg ml⁻¹) incubando la reazione a 37 °C per un ora. Dopo l'incubazione sono stati aggiunti 100 µl di cloroformio e le due fasi sono state emulsionate agitando vigorosamente per 1 min. I campioni sono stati centrifugati a 14.000 rpm per 10 min a 4°C, sono stati prelevati 150 µl di fase acquosa trasferendoli in una nuova microprovetta contenente 375 µl di etanolo al 100% e mantenuti a -20°C per 30 min. La soluzione di etanolo è stata centrifugata a 14.000 rpm per 10 min a 4°C ed il *pellet* è stato lavato in 500 µl di etanolo in soluzione acquosa (70% v/v) e successivamente centrifugato a 14.000 rpm per 10 min a 4°C. Il *pellet* privo di etanolo residuo è stato sospeso in 50 µl di TE e conservato a -20°C. Il DNA stato visualizzato mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1% (p/v) in TAE e bromuro di etidio (0,004% v/v). Dopo l'elettroforesi il gel è stato osservato e fotografato al transilluminatore (Gel DOC 2000, Biorad). Come standard molecolare è stato utilizzato il DNA del fago lambda (*Promega*, Italia) a concentrazione nota (Cheng & Jiang, 2006).

Estrazione di plasmidi

Per l'estrazione del DNA plasmidico da cellule di *E. coli* sono stati utilizzati 1,5 ml di coltura batterica *overnight* centrifugata in microprovette da centrifuga a 14.000 rpm per 2 min. Rimosso il surnatante, il *pellet* è stato sospeso in 100 µl di soluzione I e 200 µl della soluzione II. Il tutto è stato omogeneizzato invertendo i tubi per 10 volte e la reazione è stata lasciata a temperatura ambiente senza agitazione per 2 minuti. Trascorso questo tempo sono stati aggiunti 150 µl di soluzione III ed è stata omogeneizzata al resto della reazione mescolando delicatamente con un puntale da 200 µl. La reazione miniprep è stata centrifugata a 14.000 rpm per 10 min e la fase liquida è stata traferita in una nuova microprovetta da 1,5 ml con 800 µl di etanolo 100%. Con l'aggiunta di etanolo è stato possibile insolubilizzare il DNA plasmidico facendolo precipitare, dopo lieve agitazione dei tubi per 25 volte. I tubi sono stati centrifugati a 14.000 rpm per 10 min ed è stato eliminato il surnatante. Il *pellet* è stato lavato in 1 ml di etanolo in soluzione acquosa al 70% (v/v) e centrifugato a 14.000 rpm per 10 min. Eliminato il surnatante, il *pellet* è stato asciugato e sospeso in 25 µl di TE. Il DNA plasmidico stato visualizzato mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1% (p/v) in TAE e bromuro di etidio (0,004% v/v). Dopo l'elettroforesi il gel è stato osservato e fotografato al

transilluminatore (Gel DOC 2000, Biorad). Come standard molecolare è stato utilizzato il *ladder* 1Kb (*Promega*, Italia).

Analisi delle sequenze geniche di *Rahnella aquatilis* depositate in banca dati

La sintesi del costrutto ricombinante utilizzato per la produzione di ceppi Δgcd di *R. aquatilis* è stata eseguita analizzando le sequenze geniche depositate nella banca dati del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Non disponendo di sequenza genomica del ceppo 36 di *R. aquatilis* utilizzato negli esperimenti di mutagenesi inserzionale, la sequenza nucleotidica dei primer utilizzati nelle reazioni PCR è stata disegnata analizzando le informazioni depositate in banca dati. Attualmente si dispone della sequenza nucleotidica dell'intero genoma, nonché dei plasmidi, di 6 ceppi di *R. aquatilis* con annotati mediamente 4692 geni e 4666 proteine. Inoltre sono depositate in banca dati numerose sequenze di organismi tassonomicamente affini. La localizzazione fisica del gene *Gcd* nei genomi analizzati mediante analisi bioinformatica è stata eseguita utilizzando le informazioni depositate e pubblicate da Guo e collaboratori (2009). Le informazioni necessarie a tale scopo sono state reperite nella banca dati dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e l'analisi delle sequenze in formato fasta è stata eseguita mediante programma BioEdit (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). La rappresentazione grafica delle sequenze nucleotidiche nonché la localizzazione fisica del gene *Gcd* e dei primer disegnati è stata eseguita mediante programma SnapGene (GSL Biotech).

Realizzazione del costrutto ricombinante

La produzione di mutanti *knockout* di *R. aquatilis* per il gene *glucose dehydrogenase* (Δgcd) è stata eseguita mediante sostituzione del gene con quello codificante la resistenza alla kanamicina. A tale scopo si è provveduto alla sintesi di un costrutto ricombinante costituito da due regioni complementari alla sequenza nucleotidica a monte e a valle del gene bersaglio, separate dalla cassetta di resistenza alla kanamicina (Aranda *et al.*, 2010). A tale scopo si è provveduto ad amplificare le regioni fiancheggianti al gene bersaglio (utilizzando come stampo il genoma di *R. aquatilis* ceppo 36) e la cassetta di resistenza alla kanamicina (utilizzando come stampo il plasmide pET-28a-C) (dettagli PCR nelle tabelle 5 e 6). I primer utilizzati nelle reazioni PCR e le dimensioni attese degli ampliconi sono le seguenti:

- Regione 5': primer *Gcd for* e *Gcd rev* + Kan prom rev; circa 1000 bp;

- Regione 3': primer Gcd for + Kan e Gcd rev, circa 800 bp;
- Cassetta di resistenza alla kanamicina Kan prom rev e Kan term for, circa 950 pb.

I primer Gcd rev + Kan e Gcd for + Kan, rispettivamente di 41 e 42 pb, recano all'estremità 5' 20 basi complementari ai primer utilizzati per l'amplificazione della cassetta di resistenza alla kanamicina (figura 10). L'utilizzo di questi primer in reazione PCR ha permesso la formazione di due regioni complementari all'estremità della cassetta di resistenza alla kanamicina che hanno reso possibile la fusione dei frammenti in un unico costrutto ricombinante mediante PCR con i primer *nested* (tabella 7). Infatti la fusione dei tre ampliconi (regione 5'; cassetta resistenza alla kanamicina; regione 3') è stata eseguita inserendo in reazione i tre prodotti PCR come DNA stampo ed i primer Gcd for nested e Gcd rev nested. Le dimensioni attese del costrutto ricombinante sono state di circa 2750 pb. La PCR di fusione, nonostante sia stata eseguita in *Temperature Gradient Protocol* $\Delta 6$ ha generato una serie di amplificazioni aspecifiche (figura 11), per tanto si è provveduto all'isolamento dell'amplicone delle giuste dimensioni da gel di agarosio (Qiagen; QIAEX II Gel Extraction Kit 150). Il costrutto purificato da gel è stato clonato nel vettore lineare pGem-T[®] ed inserito per elettroporazione in *E. coli* Top10 (tabella 8). Il costrutto è stato quindi conservato e riprodotto in *E. coli* e al momento della trasformazione è stato amplificato mediante PCR utilizzando i primer Gcd for nested e Gcd rev nested. I prodotti PCR ottenuti nei vari passaggi sono stati analizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1% (p/v) in TAE e bromuro di etidio (0,004% v/v). Dopo l'elettroforesi il gel è stato osservato e fotografato al transilluminatore (Gel DOC 2000, Biorad). Come standard molecolare è stato utilizzato il *ladder* 1Kb (*Promega*, Italia). Nelle reazioni di trasformazione, sia di *E.coli* con il plasmide pGem-T[®] con inserto, sia di *R. aquatilis* con il costrutto ricombinante lineare, è stato utilizzato 1 µg di DNA veicolato in 5 µl di *DNAse free water*.

Preparazione di cellule elettrocompetenti ed elettroporazione

Per la preparazione delle cellule elettrocompetenti di *E.coli* ceppo Top10 e di *R. aquatilis* ceppo 36 è stato seguito lo stesso protocollo. Dalle *stock* conservate in glicerolo a -80°C è stata prelevata un'aliquota di sospensione cellulare e piastrata in piastre Petri con LA, incubate a 28°C per *R. aquatilis* mentre 37°C per *E. coli*, per 12 ore. Colonie singole sviluppatesi in piastra sono state trasferite in 10 ml di LB e coltivate per 12 ore alle stesse temperature indicate in precedenza con una agitazione di 180 rpm. Dello starter 5 ml sono stati inoculati in 100 ml di LB in una beuta da 500 ml ed incubate a 200 rpm fin quando la

coltura presentava una OD₆₀₀ di circa 0,6 – 0,8 (3-4 ore circa di incubazione). Raggiunta la concentrazione prefissata, la coltura batterica è stata raffreddata in ghiaccio per circa 30 minuti e centrifugata a 6.000 rpm a 4°C per 10 minuti. Eliminato il surnatante il *pellet* di cellule è stato sospeso in 100 ml di acqua distillata sterile fredda e la sospensione cellulare è stata centrifugata a 6.000 rpm a 4°C per 10 minuti. Allo scopo di eliminare tutti i sali contenuti nella sospensione di cellule sono state eseguiti 3 lavaggi in una soluzione acquosa di glicerolo al 10% (p/v) freddo dimezzandone la quantità ad ogni lavaggio (100-50-25 ml di glicerolo al 10%). Dopo l'ultimo lavaggio il *pellet* di cellule è stato risospeso in 1 ml di glicerolo (10% p/v), suddividendo la sospensione di cellule elettrocompetenti in aliquote da 40 µl in microprovette da 1,5 ml, conservandole a -80°C. Le aliquote di cellule elettrocompetenti sono state scongelate in ghiaccio e sono state trasformate con 1 µg di DNA (plasmide o costruito ricombinante lineare) veicolato al massimo in 5 µl di soluzione, omogeneizzando il tutto senza pipettare. Come controllo negativo è stata utilizzata un aliquota di cellule elettrocompetenti alle quali era stata aggiunta la stessa quantità in volume di acqua distillata sterile. La miscela di cellule competenti e DNA è stata mantenuta per 10 minuti in ghiaccio e trasferita in cuvette da elettroporazione da 0,2 cm (BioRad). Alle cuvette, inserite nell'apposito alloggio dell'elettroporatore (Gene Pulser II, BioRad), è stato applicato un impulso elettrico di 2.500 V, 200 ohm, 25µF³ capacitor per circa 5 µs. Le cellule sono state raffreddate velocemente in ghiaccio e trasferite in 1 ml di mezzo liquido SOC ed incubate in tubi Falcon da 15 ml per 1 ora alle temperature ottimali di crescita dei batteri e un agitazione di 200 rpm. Trascorso questo periodo di incubazione le cellule sono state centrifugate per 15 minuti a 4.000 rpm e risospese in 100 µl di acqua distillata sterile e piastrate in piastre Petri (Gonzales *et al.*, 2013). Nello specifico i trasformanti di *R. aquatilis* sono stati piastrati in LA contenente 50 ppm di Kanamicina, mentre i trasformanti di *E. coli* in X-Gal Medium (Sigma-Aldrich, USA). Le piastre sono state incubate per 48 ore, trascorso questo periodo sono state selezionate tutte le colonie resistenti alla kanamicina nel caso dei trasformati di *R. aquatilis*, mentre nel caso di *E. coli* è stata eseguita la *blue-white screen* selezionando le colonie di colore bianco. In entrambe i casi le colonie selezionate sono state purificate mediante trasferimento in piastre con LA più specifico antibiotico e successivamente coltivate in mezzo liquido e conservate a -80°C in una soluzione acquosa di glicerolo al 30% (v/v).

Saggio di penetrazione di membrane di cellulosa (*cellophane*) in presenza di *R. aquatilis*

Con questo saggio è stata valutata la capacità da parte di *Fol* di produrre enzimi cellulolitici e la capacità di esercitare una pressione fisica su una superficie rigida. Fogli di *cellophane*, precedentemente tagliati per entrare in piastre Petri da 9 cm di diametro e sterilizzati in autoclave, sono stati disposti in piastre contenenti MMU agarizzato con glucosio e lasciati asciugare per 5 minuti sotto cappa a flusso laminare. Le piastre così preparate sono state inoculate al centro con 5 μl di una sospensione conidica di $2,5 \times 10^7$ conidi ml^{-1} ed incubate per 4 giorni a 28°C. Dopo aver verificato l'accrescimento del fungo, il *cellophane* è stato rimosso e le piastre sono state incubate per altri due giorni alle stesse condizioni valutando l'eventuale accrescimento della colonia fungina nella parte sottostante al *cellophane*. Allo scopo di valutare l'influenza della proliferazione di *R. aquatilis* ceppo *wild type* e del ceppo Δgcd sulla capacità del fungo di penetrare il *cellophane* sono stati piastrati 100 μl di una sospensione batterica ad OD_{600} 0,1 e lasciati asciugare per 5 minuti sotto cappa a flusso laminare. Un foglio di *cellophane* è stato posizionato al di sopra dell'inoculo batterico e si è provveduto all'inoculo del fungo, valutando l'avvenuta penetrazione come descritto in precedenza. Tale influenza è stata valutata anche in presenza di MES 100 mM a pH 7 e pH 4,5. Allo scopo di escludere il coinvolgimento di metaboliti batterici sull'influenza della penetrazione del *cellophane* da parte di *Fol*, i ceppi batterici saggiati sono stati piastrati sopra al foglio di *cellophane*, rimosso dopo 48 ore di incubazione. Successivamente è stato posizionato un foglio di *cellophane* nuovo proseguendo come descritto in precedenza (López-Berges *et al.*, 2010).

Saggio di adesione alle radici

Il test è stato condotto con la finalità di valutare l'eventuale interferenza della proliferazione di *R. aquatilis* sulla capacità di *Fol* di aderire alle radici di piante di pomodoro. Il saggio è stato eseguito su radici di piantine di pomodoro allo stadio fenologico di prima foglia vera preventivamente lavate con acqua liberandole delicatamente dalla vermiculite. Le piante sono state trasferite in matracci da 100 ml contenenti 50 ml di PDB diluito in acqua distillata sterile [1:50 (v/v)] ed inoculate con una sospensione conidica di 5×10^6 conidi ml^{-1} , mentre i ceppi batterici sono stati inoculati ad una concentrazione di 5×10^6 CFU ml^{-1} . Le piante sono state incubate a 28°C con un'agitazione di 150 rpm per 48 ore. Passato il periodo di incubazione le piante sono state recuperate dalla sospensione di microrganismi e le radici, lavate con acqua, sono state osservate allo stereoscopio eseguendo rilievi fotografici. Il micelio aderito risultava

chiaramente visibile come una massa bianca che ricopriva le radici laterali (Di Pietro *et al.*, 2001).

Saggio di crescita invasiva su frutti di pomodoro

Allo scopo di valutare l'influenza dei ceppi *wild type* e Δgcd di *R. aquatilis* sulla capacità di *Fol* di colonizzare i tessuti vegetali, il saggio di crescita invasiva è stato condotto su frutti di pomodoro (varietà *cherry*). I pomodori sono stati sterilizzati superficialmente con una soluzione acquosa di ipoclorito di sodio al 2% (v/v) per 5 minuti e successivamente lavati in acqua distillata. In prossimità della cavità peduncolare sono state praticate due ferite inoculate con 10 μ l di una sospensione conidica di 5×10^8 conidi ml^{-1} e/o 10 μ l di una sospensione batterica alla concentrazione di 5×10^8 CFU ml^{-1} . I frutti sono stati incubati a 28°C con il 100% di umidità relativa. Trascorse 96 ore dall'allestimento della prova è stata valutata la comparsa di marcescenze in prossimità delle ferite con abbondante micelio bianco (Di Pietro *et al.*, 2001).

Monitoraggio del pH degli essudati radicali in presenza di *F. oxysporum* e/o agenti di biocontrollo

L'influenza della popolazione batterica e/o fungina sul pH degli essudati radicali è stata valutata utilizzando piante di pomodoro della varietà *Moneymaker* trattate come descritto nel paragrafo inerente la produzione degli essudati radicali. Ogni replica è stata realizzata con due piante selezionate poste in provette da microbiologica da 50 ml con 5 ml di acqua distillata sterile, immergendo solamente l'apparato radicale. L'inoculo sia fungino che batterico è stato eseguito utilizzando 100 μ l una sospensione di cellule in PBS avente concentrazione nota. Nello specifico il saggio di monitoraggio del pH prevedeva le seguenti condizioni:

- *R. aquatilis* ceppo *wild type* e mutanti ad una concentrazione finale 1×10^6 CFU ml^{-1} .
- *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ad una concentrazione finale 1×10^6 CFU ml^{-1} .
- Co-inoculo batterio-fungo con concentrazione per singolo organismo 1×10^6 CFU ml^{-1} .

La prova così allestita è stata posta ad incubare senza agitazione a 28°C con fotoperiodo 14/10 ore luce/buoi ed il pH è stato monitorato ogni ora utilizzando un elettrodo per micro-campioni del diametro di 3 mm fino a 38 ore dall'inoculazione. Ogni tesi è stata realizzata con tre repliche biologiche e l'esperimento è stato eseguito tre volte. L'influenza della popolazione batterica e fungina sul pH radicale è stata valutata anche visivamente utilizzando

gli indicatori di pH *Bromocresol purple* e *Bromocresol green* [con differente pH di viraggio (figura 12)] aggiunti *in ratio* di 100 µl ogni 10 ml di TA. I conidi fungini sono stati aggiunti al TA liquido alla temperatura di 55°C alla concentrazione finale di $2,5 \times 10^6$ conidi ml⁻¹. L'inoculo batterico invece è stato eseguito immergendo l'apparato radicale in una sospensione batterica in PBS a OD₆₀₀ 0,1 per 30 minuti. L'apparato radicale è stato immerso nel TA ancora liquido in piastre Petri avendo cura di immergere solamente questa parte evitando che il TA entrasse in contatto con colletto e stelo. Le variazioni colorimetriche erano apprezzabili dopo 24/48 dall'allestimento delle piastre Petri e sono stati eseguiti rilevamenti fotografici (Segorbe Luque, 2015).

Caratterizzazione dei brodi colturali di *Fusarium oxysporum*

La caratterizzazione dei brodi di coltura ha riguardato i differenti ceppi di *Fusarium oxysporum* elencati nella tabella 3 coltivati in substrati liquidi e successivamente sottoposti a valutazione del pH, biomassa fungina, valutazione della capacità chelante, estrazione e quantificazione dell'acido fusarico.

Produzione dei brodi colturali di *Fusarium oxysporum*

I brodi di coltura sono stati ottenuti coltivando i ceppi di *Fusarium oxysporum* in MM liquido con le differenti fonti di azoto (nitrato di sodio; solfato di ammonio; nitrato di ammonio; urea) a pH iniziale 4,5. Beute da 100 ml contenenti 20 ml di substrato liquido sono state inoculate con 100 µl di una sospensione conidica in PBS ad una concentrazione iniziale 1×10^8 conidi ml⁻¹, quindi finale 5×10^5 conidi ml⁻¹. I ceppi fungini sono stati incubati per 7 giorni a 180 rpm 28°C. Le valutazioni precedentemente elencate sono state condotte considerando anche le seguenti variabili:

- MES 100 mM pH 4,5;
- MES 100 mM pH 7;
- FeCl₃ 100 µM;
- EDTA 0,2 mM;
- Pioverdina OD 400 nm 0,5.

Trascorso il periodo di incubazione i brodi colturali sono stati filtrati su dischi di carta Whatman n. 6 separando la biomassa dalla parte liquida. I filtri recanti il micelio fungino, dei quali era noto il peso (tara), sono stati posti ad essiccare in stufa a 60°C per 48 ore e successivamente pesati allo scopo di quantificare la biomassa fungina. Del brodo di coltura è stato valutato il pH mediante misurazione al pHmetro.

Valutazione della capacità chelante mediante saggio CAS

I brodi di coltura dei ceppi fungini sono stati sottoposti alla valutazione della capacità chelante mediante saggio CAS. Tale analisi è stata condotta adoperando piastre *multiwell* 96 pozzetti, in ciascun pozzetto è stata inserita una reazione del volume finale di 200 µl, costituita da:

- 38 µl di filtrato colturale;
- 112 µl di acqua bidistillata;
- 50 µl di reagente CAS.

Come controllo negativo è stato utilizzato il MM, mentre come controllo positivo è stata utilizzata una soluzione 1mM di EDTA. La OD₆₅₅ è stata misurata a intervalli regolari di 5 minuti per la prima ora di prova e successivamente al 75° e al 135° minuto (Microplate Reader, Biorad). Per ogni tesi sono state eseguite tre repliche biologiche e otto repliche tecniche, l'esperimento è stato ripetuto tre volte. La capacità chelante dei campioni è stata espressa come decremento percentuale della OD a 655 nm, utilizzando la seguente formula:

$$CC \% = [(ODc-ODt)/ODc] \times 100$$

Dove:

ODc = OD 655 nm del controllo;

ODt = OD 655 nm del campione saggiato.

Estrazione dell'acido fusarico

L'estrazione dell'acido fusarico è stata condotta su 5 ml di ciascun brodo di coltura fungino. Allo scopo di aumentare la solubilità di questo metabolita il brodo di coltura è stato acidificato a pH 2 con l'aggiunta di una goccia di HCl (37% v/v). L'estrazione liquido/liquido è stata condotta in tubi Falcon da 50 ml aggiungendo al brodo colturale 5 ml di etilacetato, le due frazioni sono state emulsionate agitando vigorosamente per 5 minuti. L'emulsione brodo

di coltura-etilacetato è stata centrifugata per 5 minuti a 4.000 rpm. Dopo la separazione delle due fasi, l'etilacetato (la fase superiore) è stato trasferito in un pallone da vuoto, mentre la fase acquosa è stata sottoposta ad estrazione per ulteriori due volte. Le tre frazioni di etilacetato sono state unite e portate a secco in evaporatore rotativo, con bagnomaria a 50°C e pressione ridotta. Il residuo secco è stato risospeso in 1 ml di metanolo al 100% e conservato a -20°C in Vials Crimp da 2 ml.

Analisi dell'acido fusarico mediante TLC

L'analisi qualitativa volta a determinare la presenza di acido fusarico è stata condotta mediante TLC. 5 µl di ciascun estratto risospeso in metanolo e 5 µl di una soluzione standard di acido fusarico (Sigma–Aldrich) alla concentrazione 1 mg ml⁻¹ in metanolo sono stati caricati su una lastra cromatografica 20 x 20 cm al gel di silice con indicatore di fluorescenza (Silica gel 60 F254, MERCK). La lastra è stata sviluppata in camera cromatografica utilizzando una soluzione di sviluppo avente la seguente composizione e rapporto volumetrico: isopropanolo:etilacetato:acqua distillata:acido acetico - 4:3,8:2:0,2 (v/v/v/v). Dopo essere stata sviluppata ed asciugata mediante un getto di aria calda, la lastra è stata osservata sotto luce UV a 254 nm di lunghezza d'onda. L'acido fusarico appariva ad un Rf di 0,87 che estingueva la fluorescenza delle lastre con indicatore. Delle lastre è stato eseguito un rilievo fotografico.

Quantificazione dell'acido fusarico in HPLC

Alla luce dei risultati qualitativi ottenuti con l'analisi TLC, si è proceduto alla quantificazione dell'acido fusarico negli estratti in etilacetato. Le determinazioni sono state condotte mediante cromatografia liquida ad alta pressione (*High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC) utilizzando uno standard di acido fusarico (Sigma-Aldrich, USA). È stato utilizzato un sistema HPLC (Perkin–Elmer, Norwalk, CT, USA) dotato di pompa 410 LC, rivelatore spettrofotometrico UV (LC 90) ed un integratore LCI (Amalfitano *et al.*, 2002).

Le separazioni sono state eseguite mediante una colonna a fase inversa (Macherey–Nagel, Duren, Germania) C18 100-5 Nucleosil (250 x 4,6 mm, 5 µm), con eluizione in gradiente. Le fasi mobili impiegate sono state: metanolo (eluente C), acqua distillata di grado HPLC (eluente D), 1% di-potassio fosfato in acqua, corretto a pH 7.35 mediante aggiunta di alcune gocce di acido fosforico 85% (eluente E). L'eluizione è stata inizialmente condotta con la

miscela C:D:E (50:10:40 v/v/v), successivamente trasformata, secondo un gradiente lineare di oltre 20 minuti a C:D:E (75:10:15 v/v/v); le condizioni iniziali sono state ristabilite secondo un gradiente lineare di oltre 5 minuti e la colonna è stata riequilibrata in queste condizioni per 10 minuti prima di eseguire la successiva separazione cromatografica. La velocità del flusso è stata di 1 ml min.⁻¹ ed aliquote di 20 µl dei campioni sono state iniettate nella colonna per le analisi. La rilevazione spettrofotometrica è stata condotta alla lunghezza d'onda di 268 nm. La quantificazione dell'acido fusarico è stata effettuata integrando l'area del picco del cromatogramma avente tempo di ritenzione di circa 7,20±0,5 minuti. La quantificazione dell'acido fusarico negli estratti in etilacetato è stata eseguita creando una retta di taratura adoperando le seguenti concentrazioni dello standard di acido fusarico: 0,2 - 0,4 - 0,6 - 1,194 - 1,494-2 mg ml⁻¹.

Valutazione dell'attività inibitoria dell'acido fusarico nei confronti dei ceppi CHH0 e CHA1196 di *P. fluorescens*

A seguito dell'analisi sulla presenza dell'acido fusarico negli estratti in etilacetato dei brodi di coltura fungini si è proceduto alla valutazione dell'attività inibitoria parte di questo metabolita sui ceppi CHA0 e CHA1196 di *P. fluorescens*. Il saggio è stato condotto adoperando il substrato liquido MMU con glucosio a pH iniziale 7, aggiungendo le seguenti concentrazioni di acido fusarico: 0 - 0,125 - 0,250 - 0,5 - 0,7 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 mM. La prova è stata condotta in piastre *multiwell* da 96 pozzetti ponendo in ciascun pozzetto 195 µl di substrato e 5 µl di una sospensione batterica avente una OD₆₀₀ di 0,1. La prova così allestita è stata posta ad incubare a 28°C a 200 rpm di agitazione. L'accrescimento batterico è stato monitorato mediante valutazione della OD₆₀₀ con *Microplate Reader* (Biorad) ad intervalli di 8 ore.

La crescita dei due ceppi batterici in presenza di acido fusarico è stata valutata anche in presenza di:

- Pioverdina OD 400 nm 0,5;
- FeCl₃ 100 µM.

Ciascuna tesi presentava 8 ripetizioni biologiche e gli esperimenti sono stati ripetuti per tre volte. Delle concentrazioni di acido fusarico utilizzate nei saggi di crescita di *P. fluorescens* è stata valutata la capacità chelante mediante saggio CAS, esprimendo i valori di capacità chelante come indicato in precedenza (Ruiz *et al.*, 2015).

Analisi statistica

I risultati di tutti gli esperimenti sono stati espressi come media \pm deviazione standard derivanti da almeno tre esperimenti indipendenti. Tali risultati sono stati elaborati statisticamente mediante analisi della varianza ANOVA test di Tukey, considerando statisticamente significativi valori di $p \leq 0,05$. L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata con il programma MedCalc (MedCalc Software version 12.2.1.0, Ostend, Belgium).

Risultati

Caratterizzazione dei mutanti *knockout* di *P. fluorescens* ceppo CHA0

Alterazione del pH e solubilizzazione del fosforo tricalcico

Analizzando le variazioni del pH extracellulare e la capacità di solubilizzare il fosforo tricalcico, il ceppo *wild type* ed i mutanti *knockout* di *P. fluorescens* elencati nella tabella 2 sono stati caratterizzati valutando le alterazioni fenotipiche derivanti dalle delezioni geniche. Entrambi i saggi sono stati eseguiti in piastra Petri, nel primo caso è stata analizzata l'alterazione colorimetrica del *bromocresol purple* provocata dalla proliferazione batterica su substrato agarizzato MMU con glucosio, mentre la solubilizzazione del fosforo è stata valutata visualizzando la comparsa di un alone trasparente in seguito allo sviluppo della colonia batterica su substrato agarizzato NBRIP. Al termine dell'incubazione è stato possibile comprovare i fenotipi già documentati e pubblicati dei ceppi CHA0, CHA1196, CHA1197 e CHA1198 (de Werra *et al.*, 2009). Infatti il ceppo *wild type*, abbassando il pH periplasmatico, provocava il viraggio al giallo del *bromocresol purple* e mostrava una discreta capacità di solubilizzazione del fosforo tricalcico, fenotipo alterato in tutti i ceppi Δgcd (CHA1196, CHA1198, CHA1242, CHA1244), mentre i restanti ceppi (CHA1197, CHA1241, CHA661) fenotipicamente non si discostavano dal ceppo CHA0 (figura 13).

Analisi del brodo colturale dei ceppi batterici

L'alterazione del pH extracellulare dei ceppi mutanti e *wild type* di *P. fluorescens* è stata confermata anche mediante analisi del brodo colturale dopo 72 ore di incubazione in MMU con glucosio a pH 7.0. Come riportato in figura 14a il brodo colturale del ceppo *wild type* e tutti i ceppi con il gene *Gcd* integro presentavano un valore medio di pH pari a 5.16 circa (CHA0 pH 5.3; CHA661 pH 5.02; CHA1241 pH 5.1; CHA1197 pH 5.23), mentre per i ceppi Δgcd il valore di pH era di 8.1 circa (CHA1196 pH 8.1; CHA1198 pH 7.9; CHA1242 pH 8.3; CHA1244 pH 8.1). Il brodo di coltura dei diversi ceppi al termine dell'incubazione presentava evidenti differenze nel colore, infatti come mostrato in figura 15 tutti i ceppi Δgcd presentavano una spiccata pigmentazione verde/fluorescente, particolarmente evidente se

sottoposta a luce ultravioletta (254 nm). Tale alterazione, dovuta all'accumulo di molecole fluorescenti (es. pioverdina), è stata quantificata valutando la densità ottica (OD) a 400 nm del brodo di coltura filtro-sterilizzato. Come riportato in figura 14b-i ceppi Δgcd mostravano una OD₄₀₀ media di circa 0,878 (CHA1196 OD = 0,87; CHA1198 OD = 0,9; CHA1242 OD = 0,85; CHA1244 OD = 0,87) mentre per i ceppi batterici con il gene Gcd integro la OD₄₀₀ media è stata di circa 0,071 (CHA0 OD = 0,071; CHA661 OD = 0,073; CHA1241 = OD 0,081; CHA1197 OD = 0,061). In seguito alle analisi statistiche, non sono state riscontrate differenze significative tra tutti i ceppi batterici Δgcd e tra i ceppi con il gene Gcd integro. La capacità chelante del brodo di coltura, espressa come decremento percentuale della OD₆₅₅, è stata stimata mediante saggio CAS. Come riportato in figura 14c, la mutazione nel gene Gcd, oltre ad alterare la fisiologica acidificazione extracellulare e ad incrementare la produzione di pigmenti fluorescenti, ha comportato un incremento dell'attività chelante del brodo colturale. Infatti i ceppi Δgcd hanno mostrato una capacità chelante media dell'82,82% (CHA1196 = 82,37%; CHA1198 = 83,83%; CHA1242 = 83,28%; CHA1244 = 82,83%), pari al doppio rispetto ai ceppi con gene Gcd integro la cui capacità chelante media è stata del 42,05% (CHA0 = 44,44%; CHA661 = 37,68%; CHA1241 = 41,06%; CHA1197 = 45,05%). Anche in questo caso non ci sono state differenze significative tra i ceppi Δgcd e tra i ceppi con il gene Gcd integro. Del brodo colturale dei ceppi Δgcd è stata stimata la capacità chelante in termini di molarità di FeCl₃ capace di neutralizzare le cariche chelanti presenti. A tale scopo il brodo colturale dei ceppi CHA1196 e CHA1242 è stato trattato con concentrazioni crescenti di FeCl₃ e ne è stata valutata la capacità chelante residua mediante saggio CAS. Per entrambi i ceppi la neutralizzazione totale delle cariche chelanti è stata ottenuta nei trattamenti con 0,2 e 0,5 mM di FeCl₃ (figura 16). Il decremento % della OD₆₅₅ è stato prossimo allo zero per i trattamenti con 0,2 mM di FeCl₃ (CHA1196 = 3,05%; CHA1242 = 5,29%), mentre sono stati registrati valori negativi nei trattamenti con 0,5 mM di FeCl₃ (CHA1196 = -17,11%; CHA1242 = -4,94%). Vista l'evidente correlazione tra la mancanza del gene Gcd e la produzione di molecole fluorescenti e di siderofori, è stato valutato l'effetto di variabili chimiche sulla produzione di molecole chelanti da parte del ceppo *wild type* e dei mutanti di *P. fluorescens*. A tal proposito è stata valutata la capacità chelante e la OD₄₀₀ del brodo colturale dopo di 72 ore di incubazione in presenza di MES 50 mM; FeCl₃ 100 μ M ed EDTA 2 mM, aggiunti al MMU con glucosio a pH 7.0, comparando tali risultati con quelli ottenuti in MMU. Per quanto riguarda i ceppi Δgcd i valori di chelazione in presenza di MES a pH 7.0 non hanno mostrato differenze significative rispetto a quelli ottenuti nelle tesi controllo. La presenza di MES a pH 7.0 ha alterato la produzione di molecole fluorescenti nei ceppi con il

gene *Gcd* integro, infatti come riportato nella figura 17 il valore medio di OD₄₀₀ pari a 0,25, di circa 8,84 volte superiore rispetto alle tesi controllo (CHA0 OD 0,25 - 5,95; CHA661 OD 0,27 - 9,64; CHA1241 OD 0,25 - 10,32; CHA1197 OD 0,26 - 7,48). La presenza del tampone ha determinato un incremento della OD₄₀₀ anche nei ceppi Δgcd ma di minore entità rispetto ai restanti ceppi, infatti mediamente i valori registrati erano pari a 0,314 e di circa 1,24 volte superiore rispetto ai valori delle tesi controllo (CHA1196 OD 0,33 - 1,29; CHA1198 OD 0,32 - 1,25; CHA1242 OD 0,30 - 1,2; CHA1244 OD 0,31 - 1,20). Anche la presenza di EDTA ha comportato l'incremento della produzione di molecole chelanti nei ceppi di *P. fluorescens* con gene *Gcd* integro, con un valore di decremento % della OD₆₅₅ medio del 69,25% e di 1,65 volte maggiore rispetto alle tesi di controllo (CHA0 64% - 1,44; CHA661 68% - 1,8; CHA1241 71% - 1,73; CHA1197 74% - 1,64). Nei ceppi Δgcd la presenza di EDTA non ha prodotto alterazioni significative nella produzione di molecole chelanti. Per quanto riguarda la OD₄₀₀ la presenza di EDTA ne ha determinato un incremento nei ceppi con gene *Gcd* integro con un valore medio di 0,214 e di circa 6,82 volte maggiore rispetto alle tesi controllo (CHA0 OD 0,222 - 5,20; CHA661 OD 0,206 - 7,36; CHA1241 OD 0,216 - 8,64; CHA1197 OD 0,213 - 6,08). Nei ceppi Δgcd la presenza di EDTA non produce differenze significative rispetto alle tesi controllo. La presenza di FeCl₃ 100 μ M riduce la sintesi di molecole chelanti nel brodo colturale di tutti i ceppi batterici con valori di decremento % della OD₆₅₅ simili e senza differenze significative. Particolarmente interessante è stata l'entità della riduzione provocata dalla presenza del FeCl₃ nei ceppi Δgcd con una capacità chelante di 6,41 volte inferiore rispetto alle tesi controllo (CHA1196 14% - 5,88; CHA1198 13% - 6,38; CHA1242 14% - 5,85; CHA1244 11% - 7,53). La presenza di ferro ha ridotto anche la OD₄₀₀ nei ceppi Δgcd con un valore medio pari a 0,069 e di circa 3,91 volte inferiore rispetto alle tesi controllo (CHA1196 OD 0,083 - 3,03; CHA1198 OD 0,079 - 3,64; CHA1242 OD 0,049 - 5,1; CHA1244 OD 0,065 - 3,84).

Interazione *in vitro* tra *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* e *P. fluorescens*

L'interazione intercorrente tra *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ed i ceppi di *P. fluorescens* è stata studiata *in vitro* mediante coltura duale, analizzando l'accrescimento radiale del fungo in presenza delle colonie batteriche, disponendo i microrganismi in piastra Petri come descritto in precedenza. L'esperimento è stato condotto su MMU agarizzato con glucosio ed il risultato dell'interazione è stato espresso come % di inibizione dell'accrescimento fungino rilevata a 5 e 10 giorni dall'allestimento delle piastre (figure 18 e 19). L'inibizione del ceppo *wild type* di

Fol, dopo 5 giorni di co-incubazione, con i batteri aventi il gene *Gcd* integro, è stata mediamente del 16,44%, non sono state riscontrate differenze significative tra i ceppi batterici (CHA0 = 16,04%; CHA661 = 16,57%; CHA1241 = 16,04%; CHA1197 = 17,11%). Contrariamente, i ceppi Δgcd hanno ridotto in maniera più efficace l'accrescimento radiale del fungo con un'inibizione media del 34,62%, anche in questo caso non sono state riscontrate differenze significative tra i ceppi (CHA1196 = 35,29%; CHA1198 = 34,22%; CHA1242 = 34,22%; CHA1244 = 34,75%). Dopo 10 giorni di incubazione le tesi trattate con i ceppi batterici aventi il gene *Gcd* integro, hanno mostrato un forte accrescimento radiale della colonia fungina, la rilevazione dell'alone di inibizione è stata pressoché nulla, mentre l'inibizione permaneva nelle tesi trattate con i mutanti *knockout* Δgcd (CHA1196 = 22,48%; CHA1198 = 24,41%; CHA1242 = 22,40%; CHA1244 = 22,45%). La capacità inibitoria dei ceppi *wild type* e mutanti di *P. fluorescens* è stata valutata anche nei confronti dei 3 mutanti delle MAPK di *Fol*. Dall'analisi dei risultati, dopo 5 e 10 giorni di incubazione, è stato possibile verificare che i mutanti $\Delta fmk1$ e Δhog , interagendo *in vitro* con i ceppi batterici, presentavano un'inibizione che non si discostava da quella del ceppo fungino *wild type*. Invece il mutante $\Delta mpk1$ risultava essere leggermente meno inibito dai ceppi batterici con gene *Gcd* integro (CHA0 = 5,55%; CHA661 = 2,38%; CHA1241 = 0,78%; CHA1197 = 3,96%), mentre era fortemente inibito dai ceppi Δgcd (CHA1196 = 68,25%; CHA1198 = 73,03%; CHA1242 = 61,09%; CHA1244 = 68,25%). Allo scopo di provare l'effettivo coinvolgimento della secrezione di molecole chelanti nell'inibizione del patogeno fungino prodotta dai ceppi Δgcd di *P. fluorescens* è stata valutata la risposta in coltura duale del mutante fungino $\Delta hapX$. L'inibizione del ceppo $\Delta hapX$, dopo 5 e 10 giorni di incubazione, è stata maggiore rispetto al ceppo *wild type* nelle interazioni con i mutanti batterici Δgcd (dopo 5 giorni: CHA1196 = 42,51%; CHA1198 = 40,12%; CHA1242 = 41,91%; CHA1244 = 40,71%; dopo 10 giorni: CHA1196 = 34,10%; CHA1198 = 37,98%; CHA1242 = 37,91%; CHA1244 = 43,79%). L'inibizione dell'accrescimento fungino in coltura duale è stato valutato anche in presenza di $FeCl_3$ saggiando tutte le combinazioni descritte in precedenza. Come mostrato nelle figure 18 e 19 l'inibizione del ceppo *wild type* di *Fol*, dopo 5 giorni dall'allestimento della prova, è stata ridotta drasticamente in presenza di $FeCl_3$, tale riduzione è stata particolarmente evidente in presenza dei ceppi Δgcd di *P. fluorescens*. Infatti, la percentuale di inibizione media in presenza di ferro è stata del 19,28%, di circa 1,79 volte inferiore rispetto ai valori registrati in assenza del catione (CHA1196 = 19,96% - 1,773; CHA1198 = 18,93% - 1,807; CHA1242 = 17,47% - 1,95; CHA1244 = 20,87% - 1,66). Tale tendenza è stata osservata anche per ceppi $\Delta fmk1$ e Δhog di *Fol*, contrariamente, nei mutanti

Δmpk1 e *ΔhapX* la riduzione dell'attività inibitoria dei mutanti batterici *Δgcd* in presenza di FeCl_3 è stata maggiormente accentuata. Infatti per il ceppo fungino *Δmpk1* l'inibizione media in presenza del catione Fe^{+++} è stata del 3,10% ovvero di circa 24,57 volte inferiore rispetto all'inibizione in assenza di ferro (CHA1196 = 4,02% - 16,94; CHA1198 = 3,02% - 24,16; CHA1242 = 3,63% - 17,04; CHA1244 = 1,74% - 40,14). Anche per il mutante *ΔhapX* l'inibizione causata dai ceppi batterici *Δgcd* si riduceva notevolmente in presenza di FeCl_3 , tanto che l'inibizione media è stata del 12,94%, di circa 3 volte inferiore rispetto all'inibizione in assenza di ferro (CHA1196 12,43% - 2,7; CHA1198 12,49% - 3,22; CHA1242 13,48% - 3,1; CHA1244 13,43% - 3,03). La capacità antagonistica dei ceppi di *P. fluorescens* nei confronti di *Fol* ceppo *wild type* è stata valutata anche mediante saggi di inibizione in liquido condotti in piastre *multiwell* a 96 pozzetti. A tal proposito è stata valutata la crescita fungina in termini di incremento della OD_{600} in presenza di brodo di coltura batterico sterilizzato per filtrazione a 0,22 μm . Sono stati utilizzati i ceppi batterici CHA0, CHA1241, CHA661, CHA1196 e CHA1242, comparando la crescita fungina delle tesi trattate con quella della tesi controllo utilizzando come substrato il MMU. L'accrescimento fungino è stato monitorato rilevando la OD_{600} a 0, 24, 48, 72 e 96 ore di incubazione ed i valori medi, riportati in figura 20, hanno mostrato la totale inibizione di *Fol* prodotta dal brodo di coltura dei due ceppi batterici *Δgcd* (CHA1196 e CHA1242) con una OD a 96 ore inferiore a 0,1 e con differenze statisticamente non significative tra i due ceppi batterici. I brodi di coltura dei ceppi batterici con gene *Gcd* integro (CHA0, CHA1241 e CHA661) non hanno provocato alcuna inibizione nell'accrescimento fungino. Infatti, rispetto alle tesi controllo, nelle quali la OD_{600} dopo 96 ore di incubazione è stata di circa 0,6, nelle tesi trattate la OD_{600} registrata è stata nettamente superiore (valore medio di OD_{600} pari a 0,8 indipendentemente dal ceppo batterico utilizzato). I brodi di coltura dei due mutanti *Δgcd* (CHA1196 e CHA1242) sono stati trattati con 2 e 5 mM di FeCl_3 e ne è stata valutata la capacità inibente residua rispetto al brodo di coltura non trattato e al controllo. La crescita fungina anche in questo saggio è stata monitorata valutando la OD_{600} all'inizio della prova (T_0) e dopo 12, 24, 48, 72 e 96 ore di incubazione. I dati riportati graficamente nella figura 22 hanno mostrato come la presenza di FeCl_3 riduce la capacità inibitoria dei brodi di coltura dei ceppi *Δgcd*, infatti la perdita dell'inibizione è parziale nei trattamenti con 2 mM di FeCl_3 , mentre è totale nei trattamenti con 5 mM di FeCl_3 . Nella figura 21 sono riportati i valori di decremento percentuale della OD_{655} delle differenti concentrazioni di EDTA. Mediante saggio di inibizione in liquido è stata valutata l'attività inibente di 0,1; 0,2; 0,5; 1 e 2 mM di EDTA in MMU a pH 7.0 nei confronti di *Fol* ceppo *wild type* valutando l'accrescimento fungino misurandone la OD_{600} a 0, 12, 24, 48 e 72 ore di

incubazione. Come si evince dalla figura 23 l'accrescimento fungino è stato completamente inibito dalle concentrazioni 2 – 1 – 0,5 mM di EDTA, mentre le concentrazioni 0,2 – 0, 1 mM di EDTA ne hanno ridotto l'accrescimento. A 72 ore di incubazione i valori di OD₆₀₀ nei trattamenti con 2 – 1 – 0,5 mM di EDTA sono stati pari a 0, mentre alle concentrazioni 0,2 – 0,1 le OD₆₀₀ sono stati di 0,2 e 0,6 rispettivamente, ma comunque in entrambi i casi inferiori rispetto al controllo.

Attività inibente delle frazioni estratte dal brodo di coltura del ceppo CHA1241

Il brodo colturale del ceppo CHA1242 di *P. fluorescens* è stato sottoposto ad estrazione con solventi organici (etilacetato e fenolo) allo scopo di individuare la frazione attiva nell'inibizione di *Fol*. Dagli estratti ottenuti, dalle frazioni acquose esauste, nonché da brodo di coltura tal quale è stato misurato lo spettro di assorbanza da 320 a 570 nm. Come riportato in figura 24 in corrispondenza della lunghezza d'onda 400 nm il brodo colturale tal quale, la frazione acquosa dell'estrazione in etilacetato e l'estratto in fenolo hanno presentato un picco di OD che mancava nella frazione acquosa dell'estrazione in fenolo e nell'estratto in etilacetato. Analizzando la capacità chelante delle differenti frazioni mediante analisi CAS è stato possibile ipotizzare che la componente chelante è stata solubilizzata dal fenolo e non dall'etilacetato (figura 25). Delle quattro frazioni è stata valutata la capacità inibitrice nei confronti di *Fol* mediante saggio in liquido in piastre *multiwell* da 96 pozzetti, comparandola con quella del brodo di coltura tal quale e con l'accrescimento del fungo in MMU. La crescita fungina espressa in OD₆₀₀, monitorata a 0, 24, 48 e 72 ore di incubazione e riportata graficamente nella figura 26, indica come nell'estrazione in etilacetato la componente attiva nei confronti del patogeno fungino permane nella fase acquosa mentre essa viene estratta dal fenolo, ed in entrambe i casi l'inibizione ha entità pari al quella del brodo di coltura tal quale. L'estratto in etilacetato e la frazione acquosa dell'estrazione in fenolo non inibiscono l'accrescimento fungino, infatti a 72 ore la OD₆₀₀ riscontrata è superiore rispetto a quella del controllo.

Alterazioni nella rizosfera prodotte dalla proliferazione batterica

I risultati degli esperimenti *in vitro* condotti sui ceppi di *P. fluorescens* evidenziano una maggiore efficacia dei mutanti Δgcd nel controllare la proliferazione di *Fol*. Questi risultati sono stati validati analizzando modelli più vicini alla realtà, mediante saggi *in vivo* volti a

valutare le alterazioni provocate dai diversi ceppi batterici sulle proprietà degli essudati radicali di piante di pomodoro. La figura 27 riporta i valori di pH e la capacità chelante degli essudati radicali ottenuti dopo 7 giorni di co-incubazione pianta batterio. La presenza dei ceppi con gene *Gcd* integro ha comportato un abbassamento del pH degli essudati radicali rispetto al controllo, mentre la presenza dei ceppi Δgcd comportava l'alcalinizzazione degli essudati radicali (CHA0 pH $5.5 \pm 0,2$; CHA661 pH $5.4 \pm 0,1$; CHA1241 pH $5.2 \pm 0,3$; CHA1197 pH $5.5 \pm 0,1$; CHA1196 pH $8.5 \pm 0,2$; CHA1242 pH $7.9 \pm 0,5$; CHA1198 pH $8.3 \pm 0,6$; CHA1244 pH $8.4 \pm 0,2$; controllo pH $6.7 \pm 0,4$). La capacità chelante degli essudati radicali è stata ridotta rispetto al controllo dalla proliferazione dei ceppi batterici con gene *Gcd* integro, mentre essa è stata fortemente aumentata dalla presenza dei ceppi batterici Δgcd (CHA0 8,96%; CHA661 6,47%; CHA1241 7,50%; CHA1197 7,07%; CHA1196 37,75%; CHA1242 32,65%; CHA1198 35,20%; CHA1244 35,20%; controllo 14,97%). Degli stessi essudati radicali è stata valutata l'influenza sulla germinazione conidica, comparandone i risultati con la germinazione conidica in PDB. Come riportato graficamente nella figura 28 le percentuali di germinazione conidica erano significativamente inferiori negli essudati prodotti in presenza dei ceppi batterici, rispetto agli essudati prodotti da piante non batterizzate e rispetto al PDB. Tale riduzione è stata maggiore nelle tesi trattate con i ceppi Δgcd (controllo = 84,08%; CHA0 = 64,66%; CHA661 = 61,25%; CHA1241 = 67,00%; CHA1197 = 37,08%; CHA1196 = 39%; CHA1242 = 36,58%; CHA1198 = 68,25%; CHA1244 = 33,25%; PDB = 91,16%). Degli essudati radicali è stata valutata anche l'attrazione chemiotropica misurando il chemiotropismo nelle germinule di *Fol*. Il valore di chemiotropismo riscontrato nel ceppo fungino *wild type* nei confronti degli essudati radicali prodotti da piante non batterizzate era pari al 28%, gli essudati radicali prodotti da piante batterizzate hanno perso l'attrattività fino a divenire repellenti. Infatti, la repulsione degli essudati radicali prodotti in presenza dei ceppi con gene *Gcd* integro aveva un valore medio del 8,29% (CHA0 = 8,70%; CHA661 = 10,81%; CHA1241 = 5,84%; CHA1197 = 7,82%). Gli essudati radicali prodotti in presenza dei ceppi Δgcd risultavano maggiormente attivi con valori medi di repulsione del 36,25% (CHA1196 = 38,59%; CHA1242 = 31,41%; CHA1198 = 30,66%; CHA1244 = 37,34%). Le alterazioni provocate dalla proliferazione batterica sul chemiotropismo fungino sono state analizzate anche nei confronti dei mutanti delle tre MAPK, riscontrando valori paragonabili a quelli descritti per il ceppo *wild type* nei mutanti $\Delta fmk1$ e Δhog . Il mutante $\Delta mpk1$ risultava nettamente meno attratto dall'essudato radicale prodotto da piante non batterizzate, inoltre non vi sono differenze statisticamente significative tra i dati di repulsione degli essudati radicali prodotti in presenza dei differenti ceppi batterici, evidenza riscontrata invece sia nel

ceppo *wild type* sia nei mutanti $\Delta fmk1$ e Δhog . Vista la discordanza in termini di risposta chemiotropica agli essudati radicali tra il mutante $\Delta mpk1$ e il ceppo *wild type* si è provveduto ad analizzare tale aspetto in risposta a stimoli più semplici ma legati alle alterazioni prodotte dai ceppi di *P. fluorescens* nella rizosfera (figure 29 e 30). A tale scopo sono state saggiate le seguenti molecole: EDTA 0,2 mM, $FeCl_3$ 5mM, Pioverdina OD₄₀₀ 0,5 e glucosio. La risposta chemiotropica a questi composti è stata misurata per il ceppo *wild type*, i tre mutanti della MAPK e i mutanti $\Delta bck1$, $\Delta mkk2$. Il glucosio induce una risposta chemiotropica media del 27,21% per tutti i ceppi fungini tranne che per il mutante $\Delta fmk1$ che risultava meno attratto da questo zucchero con un valore di chemiotropismo del 4,28%. L'EDTA induce invece una risposta di repulsione nel *wild type* e nei mutanti $\Delta fmk1$ e Δhog che ammonta mediamente al 34,36% circa (*wild type* = 36,86%; $\Delta fmk1$ = 32,21% e Δhog = 35,03%). Nei ceppi $\Delta bck1$, $\Delta mkk2$ e $\Delta mpk1$ l'EDTA produce una risposta molto meno marcata infatti il valore medio di chemiotropismo è dello 0,68% ($\Delta bck1$ = 0,23%; $\Delta mkk2$ = 1,44% e $\Delta mpk1$ = 3,73%). Stessa tendenza è stata osservata nei riguardi della pioverdina, anche questa molecola induce repulsione nei ceppi $\Delta fmk1$, Δhog e *wild type* (*wild type* = 17,45%; $\Delta fmk1$ = 14,79% e Δhog = 9,63%) ma di minor entità rispetto all'EDTA, mentre nei mutanti $bck1$, $\Delta mkk2$ e $\Delta mpk1$ non vi è repulsione. Il $FeCl_3$ provocava una chiara attrazione nei ceppi $\Delta fmk1$, Δhog e *wild type* (*wild type* = 11,88%; $\Delta fmk1$ = 9,06% e Δhog = 6,08%), mentre per i ceppi $bck1$, $\Delta mkk2$ e $\Delta mpk1$ non vi era risposta chemiotropica (figura 31).

Prova *in vivo* su piante di pomodoro

Del ceppo *wild type* e dei mutanti di *P. fluorescens* è stata valutata la capacità di biocontrollo nei confronti di *Fol* ceppo *wild type* e del mutante $\Delta hapX$, utilizzando piante di pomodoro della varietà *Moneymaker*, monitorando la mortalità provocata dai patogeni fungini fino alla morte di tutte le piante delle tesi trattate con il solo patogeno. Analizzando la mortalità delle piante di pomodoro nel saggio di biocontrollo contro *Fol* ceppo *wild type*, il patogeno induceva la manifestazione dei primi sintomi dopo 15 giorni circa dall'inoculazione del patogeno, dopo 20 giorni la mortalità è stata del 50% mentre a 40 giorni è salita al 100%. La batterizzazione radicale ha ridotto la mortalità complessiva delle piante di pomodoro, in particolare, le piante batterizzate con i ceppi batterici aventi il gene *Gcd* integro la sopravvivenza media è stata del 38,33% (CHA0 = 40%; CHA661 = 46,66%; CHA1241 = 33,33% e CHA1197 = 33,33%). La batterizzazione radicale con i mutanti batterici Δgcd ha ulteriormente ridotto la mortalità delle piante, infatti dopo 40 giorni dall'inoculazione la sopravvivenza media è stata del 73,33% (CHA1196 = 73,33%; CHA1242 = 73,33%; CHA1198 = 66,66% e CHA1244 = 80%) (figura 32). La prova di biocontrollo condotta nei

confronti del ceppo mutante $\Delta hapX$ di *Fol* ha permesso di verificare se *in vivo* la produzione di molecole chelanti, da parte di *P. fluorescens*, potesse essere alla base del meccanismo d'azione di questo agente di biocontrollo batterico. Questo mutante fungino ha indotto mortalità delle piante a partire da circa 22 giorni dopo l'inoculazione, arrivando al 100% di piante morte dopo 45 giorni. La batterizzazione radicale, anche in questo caso, ha ridotto la mortalità complessiva delle piante di pomodoro. Nella popolazione di piante batterizzate con i ceppi con il gene *Gcd* integro, a 45 giorni dall'inoculazione, la sopravvivenza media è stata del 64,95% (CHA0 = 66,67%; CHA661 = 60%; CHA1241 = 66,66% e CHA1197 66,66%). La batterizzazione radicale con i mutanti Δgcd ha ridotto drasticamente la mortalità, dopo 45 giorni dall'inoculazione la sopravvivenza media delle piante è stata del 88,33% (CHA1196 = 86,66%; CHA1242 = 93,33%; CHA1198 = 86,66% e CHA1244 = 86,58%) (figura 33).

Produzione e caratterizzazione di mutanti Δgcd di *R. aquatilis* ceppo 36

Analisi delle sequenze geniche di *R. aquatilis* depositate in banca dati NCBI

Dalla ricerca in banca dati dei genomi sequenziati di *R. aquatilis* risultavano depositate ed annotate le sequenze di 6 ceppi appartenenti a questa specie e due ceppi batterici tassonomicamente affini (tabella 10.). Per i ceppi CIP 78.65 e HX2 di *R. aquatilis* e Y9602 di *Rahnella* sp. erano depositate in banca dati NCBI anche le sequenze plasmidiche (tabella 11.), per i primi due ceppi erano disponibili le sequenze di tre plasmidi mentre per il terzo ceppo di due molecole plasmidiche. Dall'analisi BLAST della sequenza EF090904 con i ceppi CIP 78.65, HX2 e Y9602 risultava che il gene *Gcd* era fisicamente localizzato in un plasmide in tutti e tre i ceppi batterici. Nello specifico nel ceppo HX2 si localizzava nel plasmide PRA1 dal nucleotide 344708 al 349132, nel ceppo CIP 78.65 era compresa nel plasmide pRahaq201 dal nucleotide 188240 al 191778, mentre nel ceppo Y9602 il plasmide interessato era il pRAHAQ01 dal nucleotide 347516 al 351940. Nella regione localizzata dall'analisi BLAST, in tutti e tre i casi, era annotato il gene codificante per l'enzima *Gdc* ed era riportata anche l'ipotetica sequenza amminoacidica. Il disegno dei primer utilizzati per la sintesi del costrutto ricombinante è stato eseguito allineando le sequenze nucleotidiche dei tre ceppi analizzati, nello specifico utilizzando 1500 pb al 5' e al 3' del gene *Gcd*. Tale analisi è stata eseguita utilizzando il programma BioEdit mettendo in evidenza le regioni maggiormente conservate tra i tre ceppi batterici. Mediante il sito web <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> è stato

possibile generare una rappresentazione grafica degli allineamenti nucleotidici (figure 35 e 36.). Dall'analisi bioinformatica sono state individuate le regioni nucleotidiche conservate e attraverso il programma Oligo7 sono state disegnate 3 coppie di primer (tabella 4). La localizzazione dei primer è riportata in figura 34, elaborata mediante programma SnapGene utilizzando la sequenza nucleotidica del ceppo di *R. aquatilis* HX2.

Realizzazione del costrutto ricombinante per la produzione di mutanti Δgcd

La realizzazione del costrutto ricombinante per la produzione di mutanti Δgcd del ceppo 36 di *R. aquatilis* kanamicina resistenti è stata eseguita mediante l'amplificazione delle regioni al 5' e al 3' rispetto al gene. A tale scopo sono state eseguite due reazioni PCR, precedentemente descritte, che hanno generato al 5' un amplicone di 1000 pb circa e uno al 3' di circa 800. Contemporaneamente è stato amplificato il gene codificante per la resistenza alla kanamicina utilizzando come DNA stampo il plasmide pET-28a-c(+), generando un amplicone di circa 980 pb (figura 37). La fusione dei tre frammenti PCR in un unico costrutto (regione 5'-cassetta resistenza alla kanamicina - regione 3') è stata eseguita utilizzando la coppia di primer *nested* ottenendo un costrutto di 2600 pb circa. La reazione PCR, oltre all'amplicone atteso, generava una serie di aspecifici dovuti ad assemblaggi alternativi dei tre DNA stampo e dei due primer (figura 11). Dopo l'elettroforesi dal gel è stata eluita e purificata la banda della dimensione di 2600 pb. Il DNA purificato dal gel di agarosio è stato visualizzato in un'ulteriore corsa elettroforetica allo scopo di valutarne la qualità. Il restante purificato è stato clonato nel plasmide pGem-T[®] eseguendo la selezione *blue-white* (figura 38 A). Le colonie di *E. coli* selezionate sono state coltivate in purezza mediante passaggi in substrato selettivo agarizzato, successivamente coltivate in mezzo liquido estraendone il DNA plasmidico. Il plasmide estratto è stato tagliato mediante enzima di restrizione NdeI comparandone le dimensioni rispetto al plasmide senza inserto ottenendo alcune delle colonie di *E. coli* di colore blu. Dalla visualizzazione su gel di agarosio i plasmidi che avevano inglobato il costrutto ricombinante presentavano dimensioni di circa 5600 pb, mentre il plasmide privo di inserto era di circa 3000 pb (figura 38 B).

Trasformazione di *R. aquatilis* e selezione dei ceppi Δgcd

Adoperando come DNA stampo il plasmide pGem-T[®] con inserto è stata eseguita una PCR utilizzando i due primer *nested*, ottenendo il costrutto ricombinante per la produzione di mutanti Δgcd . Utilizzando cellule del ceppo 36 di *R. aquatilis* elettrocompetenti e circa 1 μ g di costrutto ricombinante, dalla reazione di elettroporazione sono state ottenute numerose

colonie kanamicina resistenti (figura 39). Tali colonie sono state selezionate e coltivate in purezza mediante piastraggi successivi in terreno selettivo agarizzato. Dai batteri kanamicina resistenti sono stati selezionati i ceppi #3, #4 e #5 e gli stessi sono stati sottoposti ad estrazione del DNA genomico e PCR di conferma utilizzando *Gcd for nested* e *Gcd rev nested*, comparando i risultati con quelli ottenuti nel ceppo *wild type* di *R. aquatilis*. Dalla visualizzazione su gel di agarosio delle PCR di conferma emergevano due fenotipi ben distinti tra i tre ceppi selezionati, infatti considerando che per il ceppo *wild type* di *R. aquatilis* le dimensioni dell'amplicone erano di circa 4000 pb, per i ceppi #3 e #5 l'amplicone visualizzato era di circa 2600 pb mentre per il ceppo #4 erano presenti due bande una di 4000 pb e l'altra di 2600. Il risultato della PCR di conferma ha reso possibile la distinzione dei ceppi Δgcd (#3 e #5) dal ceppo ectopico (#4) (figura 40).

Valutazioni fenotipiche dei ceppi *wild type* e Δgcd di *R. aquatilis*

Dei ceppi #3, #4, #5 e del ceppo *wild type* di *R. aquatilis* è stata valutata l'effettiva capacità di acidificare il pH extracellulare valutandone la capacità di solubilizzare il fosforo tricalcico e analizzando le variazioni colorimetriche del *bromocresol purple* e *bromocresol green* in MMU con glucosio. Da entrambe i saggi emergeva una spiccata capacità di acidificazione a livello extracellulare del ceppo *wild type*, che si concretizzava nel saggio di solubilizzazione del fosforo tricalcico con la comparsa di un alone trasparente nelle circostanze della colonia (figura 68), mentre in presenza dei due indicatori colorimetrici con il viraggio del colore (figura 41). Nonostante l'analisi colorimetrica non abbia fornito un dato quantitativo è stato possibile stimare che l'acidificazione prodotta dal ceppo *wild type* portava il pH del mezzo a valori inferiori a 3.8 (figura 12). Un fenotipo paragonabile a quello del ceppo *wild type* era quello prodotto dal ceppo #4. I ceppi #3 e #5 erano incapaci di solubilizzare il fosforo ed in presenza dei due coloranti non è stata riscontrata alcuna alterazione nel colore, convalidando il risultato ottenuto dall'analisi PCR di conferma.

Monitoraggio del pH nell'interazione *in vitro* ed *in vivo* tra *R. aquatilis* e *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

La proliferazione di *R. aquatilis* in MM ha prodotto un'intensa e rapida acidificazione extracellulare indipendentemente dalla fonte azotata utilizzata come fonte di nutrimento. In MMU e MMNS tale decremento è stato particolarmente intenso a partire da 15 ore

d'incubazione per poi stabilizzarsi dopo 22 ore a pH 3.0 in MMU e pH 3.5 in MMNS. In MMSA il decremento del pH è stato meno intenso e si è stabilizzato dopo 25 ore di incubazione ad un valore medio di pH di 4.8. L'accrescimento di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* in MMU e MMNS ha prodotto valori di pH speculari a quelli generati dalla proliferazione batterica. Infatti in MMU il pH è restato invariato stabilizzandosi dopo 28 ore di incubazione a 6.63, in MMNS il pH extracellulare è incrementato raggiungendo, al termine dell'incubazione, un valore medio di pH 7.5. In MMSA *Fol* ha acidificato il brodo di coltura, fino ad un valore medio di pH pari a 5.34 dopo 22 ore di incubazione. L'alcalinizzazione prodotta da *Fol* in MMU e MMNS è stata annullata dalla presenza di *R. aquatilis* facendo registrare, al termine delle 28 ore di incubazione, un valore medio di pH pari a 4.5. In MMSA il co-inoculo batterio/fungo ha prodotto un andamento di pH simile a quello del solo batterio (figura 42). La proliferazione del ceppo ectopico #4 di *R. aquatilis* in MMU ha mostrato un fenotipo simile a quello del ceppo *wild type*. Invece i ceppi Δgcd #3 e #5 non hanno prodotto acidificazione del brodo di coltura, infatti al termine delle 28 ore di incubazione il pH finale medio risultava essere di 8.0. Co-incubando in MMU il ceppo #5 con *Fol* è stato registrato un andamento del pH simile a quello prodotto dal solo fungo (figura 43). Le valutazioni riguardanti le dinamiche del pH in MM prodotte dai singoli organismi, batterici e fungini, oppure dalla combinazione dei due hanno fornito interessanti informazioni in merito all'influenza reciproca in termini di pH. In tal senso si è provveduto ad analizzare l'influenza che la proliferazione microbica esercitava sul pH degli essudati radicali, analizzando le variazioni di questo parametro nel tempo. Considerando il pH di partenza (6.5) dopo 38 ore di incubazione la secrezione radicale abbassava il pH della soluzione di circa una unità, stabilizzandosi dopo 20 ore ad un pH medio di 5.5. La presenza del ceppo *wild type* di *R. aquatilis* ha incrementato la normale acidificazione prodotta dall'apparato radicale, infatti dopo 22 ore di incubazione il pH della soluzione si è stabilizzata ad un valore medio di pH 4.5, mentre allo stesso tempo in presenza di *Fol* il pH della soluzione d'interazione ha subito un incremento di un unità, raggiungendo dopo 22 ore un valore medio di 7.5. L'alcalinizzazione prodotta dalla proliferazione del fungo patogeno è stata annullata in presenza di *R. aquatilis*, infatti la coesistenza fungo-batterio ha generato un valore medio di pH pari a 4.6. In presenza del ceppo Δgcd #5 il pH degli essudati radicali presentano un andamento simile a quello prodotto da *Fol* e tale tendenza non viene alterata neppure co-inoculando i due microrganismi (figura 44). L'influenza della proliferazione microbica sul pH degli essudati radicali è stata valutata qualitativamente analizzando le alterazioni

colorimetriche del *bromocresol purple* eseguendo rilievi fotografici (figura 45). Seppur in termini qualitativi è stato possibile confermare quanto rilevato mediante monitoraggio del pH.

Saggio di penetrazione su membrana di *cellophane*

Il test di penetrazione del *cellophane* è stato condotto al fine di valutare l'influenza del ceppo *wild type* e mutante Δgcd di *R. aquatilis* sulla capacità di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* di penetrare membrane di cellulosa. Il patogeno fungino è stato capace di penetrare il *cellophane* raggiungendo il MMU agarizzato sottostante (figura 46.1). Tale capacità è stata osservata tamponando il substrato con MES 100 mM a pH 7.0, mentre è stata persa tamponando il MMU a pH 4.5 (figure 47.1 e 47.2). La presenza del ceppo *wild type* di *R. aquatilis* tra la membrana di *cellophane* ed il substrato ha impedito la penetrazione di *Fol* (figura 46.2). L'azione batterica permane tamponando il mezzo colturale a pH 4.5 mentre viene persa a pH 7.0 (figure 48.1 e 48.2). In assenza del batterio dopo 48 ore di incubazione non si è alterata la normale capacità di penetrazione del *cellophane* di *Fol* escludendo il coinvolgimento di molecole antifungine nell'azione esercitata dal ceppo batterico *wild type* (figura 49.2). La presenza del ceppo Δgcd #5 non ha impedito la penetrazione del *cellophane* da parte del patogeno, consentendo il raggiungimento del MMU agarizzato sottostante (figura 49.1).

Saggio di adesione radicale

Uno dei presupposti necessari affinché *Fol* possa infettare piante suscettibili di pomodoro è la capacità di aderire ai tessuti radicali. Mediante questo saggio è stata valutata l'influenza di *R. aquatilis* ceppo *wild type* e ceppo Δgcd #5 sulla capacità di adesione alla radice delle ife fungine. L'adesione alle radici da parte del fungo si è manifestata con l'accrescimento massivo attorno alle strutture ipogee formando un micelio facilmente individuabile anche ad occhio nudo. Al termine delle 48 ore di incubazione gli apparati radicali trattati con i conidi fungini risultavano ricoperti di abbondante micelio (figura 50). La presenza del ceppo *wild type* di *R. aquatilis* riduceva drasticamente tale adesione ed il micelio fungino presente sulle radici risultava nettamente meno abbondante (figura 50). Il ceppo Δgcd #5 non ha alterato in maniera apprezzabile l'adesione alle radici di *Fol* che al termine dell'incubazione ricopriva l'apparato radicale di micelio.

Saggio di crescita invasiva su frutti di pomodoro

Questo saggio è stato eseguito allo scopo di valutare l'influenza del ceppo *wild type* e $\Delta gcd \#5$ di *R. aquatilis* sulla capacità di accrescimento invasivo del patogeno fungino analizzando la comparsa di marciumi su frutti di pomodoro inoculati come descritto precedentemente. *Fol* dopo 72 ore dall'inoculazione ha prodotto a livello delle ferite delle are circolari marcescenti ricche di micelio bianco. In presenza del ceppo batterico *wild type* il patogeno perdeva la capacità di produrre marcescenza, mentre tale capacità risultava invariata utilizzando il ceppo di *R. aquatilis* $\Delta gcd \#5$ (figura 51).

Interazione *in vitro* tra *R. aquatilis* e *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

L'iterazione tra *R. aquatilis* e *Fol* è stata studiata analizzando l'inibizione nella crescita radiale della colonia fungina, del ceppo *wild type* e mutanti per le MAPK, esercitata dai ceppi batterici *wild type* ed il mutante $\Delta gcd \#5$. In coltura duale il ceppo *wild type* di *R. aquatilis* non provocava alcuna inibizione nell'accrescimento radiale di *Fol* ceppo *wild type* e dei mutanti Δhog e $\Delta fmk1$, mentre risultava inibito l'accrescimento radiale del ceppo fungino $\Delta mpk1$. Il mutante $\Delta gcd \#5$ perdeva la capacità inibitoria nei confronti del ceppo fungino $\Delta mpk1$ (figura 52).

Prova *in vivo* su piante di pomodoro

E' stata valutata la capacità antagonistica del ceppo 36 di *R. aquatilis* nei confronti di *Fol* su piante di pomodoro. Nel corso della prova, analizzando la sopravvivenza delle piante è possibile osservare come *Fol* ha indotto una mortalità del 100% delle piante nell'arco di circa 35 giorni dall'inoculazione. La batterizzazione radicale con il ceppo *wild type* di *R. aquatilis* ha ridotto notevolmente la mortalità delle piante di pomodoro, infatti il primo evento di mortalità è stato riscontrato dopo 28 giorni dall'inoculazione e al termine della prova la percentuale di sopravvivenza riscontrata era del 73% (figura 53 A). La capacità di biocontrollo permaneva anche per il ceppo ectopico #4, infatti l'efficacia di biocontrollo di questo ceppo non si discostava da quella osservata per il ceppo *wild type*, con una percentuale di sopravvivenza al termine della prova dell'80%. I ceppi $\Delta gcd \#3e$ e #5 presentavano un'efficacia notevolmente ridotta rispetto al ceppo *wild type*, infatti a 35 giorni dall'inoculazione le percentuali di sopravvivenza erano pari al 26% e al 20% rispettivamente (figura 54). Irrigando le piante della prova di controllo biologico con una soluzione tampone a pH 5.0 è stato possibile osservare una notevole riduzione della virulenza di *Fol*, infatti a 35 giorni dall'inoculazione fungina la percentuale di piante sopravvissute era dell'80%. La

batterizzazione radicale ha ulteriormente ridotto la mortalità delle piante di pomodoro riscontrando al termine della prova una percentuale di sopravvivenza dell'85% (figura 53 B). Irrigando le piante di controllo biologico con una soluzione tampone a pH 7.0 si ottiene invece un incremento della virulenza di *Fol*, infatti a 30 giorni provoca la morte al 100% delle piante. Il pH 7.0 ha drasticamente ridotto l'efficacia di biocontrollo di *R. aquatilis*, infatti a 35 giorni dall'inoculazione il patogeno fungino produceva il 100% di mortalità (figura 53 C). Non sono stati osservati eventi di mortalità nelle tesi di controllo, sia in quelle irrigate con acqua sia in quelle irrigate con soluzione tampone a pH 5.0 e 7.0, come anche nelle tesi batterizzate. Le piante irrigate con la soluzione tampone a pH 7.0 hanno mostrato una crescita stentata associata ad alterazioni riguardanti l'apparato epigeo, imputabili al pH della soluzione in quanto osservate in tutti i trattamenti.

Caratterizzazione del brodo colturale di *Fusarium oxysporum*

Le indagini sperimentali condotte sui ceppi Δgcd di *R. aquatilis* e *P. fluorescens* hanno evidenziato il ruolo cruciale dell'acido gluconico e quindi del pH nel controllo biologico di *Fol*, seppur con risvolti differenti nelle due specie batteriche. La sperimentazione dell'ultimo anno di dottorato di ricerca ha avuto come obiettivo quello di valutare gli effetti del pH sulla produzione di metaboliti secondari e di molecole con attività chelante in *Fol*. L'approfondimento di questo aspetto è stato possibile sfruttando la differente risposta in termini di pH prodotto dal fungo nei confronti delle diverse fonti azotate [NaNO_3 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $(\text{NH}_4)(\text{NO}_3)$; $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$] ed è stato condotto utilizzando oltre al ceppo *wild type* anche i diversi ceppi mutanti elencati e descritti nella tabella 3. Al termine di 7 giorni di incubazione in MM con le diverse fonti azotate è stato valutato il pH, la capacità chelante mediante saggio CAS e la presenza di acido fusarico nei brodi di coltura.

Valutazione del pH e della capacità chelante mediante saggio CAS

La proliferazione del ceppo *wild type* in MMU ha prodotto un significativo incremento del pH nel brodo di coltura portandolo da 4.5 a 6.0. Per i mutanti $\Delta fmk1$ e Δhog il pH finale è stato di poco differente rispetto al *wild type* (pH 6.72 e pH 6.81), mentre il mutante $\Delta mpk1$ ha

prodotto un incremento maggiore con pH finale di 8.22. Nei mutanti $\Delta bck1$, $\Delta mkk2$ e $\Delta ste2$ il pH finale è stato simile a quello del ceppo $\Delta mpk1$. Altrettanto alcalino risultava il pH del brodo colturale del mutante nella via biosintetica dell'acido fusarico #8 con valore di 8.8. Per mutanti $\Delta pacC$ e $\Delta hapX$ non vi erano grosse differenze in termini di pH rispetto al ceppo *wild type*, mentre per i mutanti $\Delta meaB$ e $\Delta mepB$, il pH finale risultava leggermente più alcalino (pH 7.38 e pH 7.48). In MMNS la proliferazione di tutti i ceppi fungini ha prodotto un incremento del pH dal valore iniziale (pH 4.5), in particolare per il ceppo *wild type* il valore medio al termine dei 7 giorni di incubazione era di pH 6.85, anche in questo caso per i mutanti $\Delta fmk1$ e Δhog non vi erano differenze significative rispetto al *wild type*. I mutanti $\Delta bck1$, $\Delta mkk2$, $\Delta ste2$, $\Delta pacC$ e #8 in MMNS hanno prodotto un pH finale significativamente più alto rispetto al ceppo *wild type*. Per il mutante $\Delta hapX$ il pH finale era di 5.47, un valore significativamente più basso rispetto ai restanti ceppi. La proliferazione dei ceppi fungini in presenza di ammonio, sia in MMNA che in MMSA, ha prodotto l'abbassamento del pH rispetto al valore di partenza. Mediamente in MMSA il valore di pH finale era di 3.22, mentre in MMNA di 3.8. Facevano eccezione i ceppi mutanti $\Delta meaB$ e $\Delta mepB$ la cui proliferazione in MMNA, rispetto ai dei restanti ceppi (pH 3.8), produceva un incremento del valore medio che al termine dei 7 giorni di incubazione risultava di 6.59 per entrambi i mutanti (figura 56 e 57). Successivamente alla misurazione dei valori di pH nel brodo colturale è stata anche valutata la capacità chelante mediante saggio CAS. In accordo con i risultati sperimentali ottenuti per i ceppi di *P. fluorescens*, anche in *Fol* si verificava una correlazione positiva tra valori di pH e capacità chelante. Infatti in tutti i ceppi fungini i valori di chelazione maggiori sono stati riscontrati nei brodi di coltura prodotti in MMU e MMNS. I dati riportati graficamente nelle figure 58 e 59 mostrano chiaramente alcune eccezioni a tale regola ed in particolare:

- I mutanti $\Delta hapX$ e $\Delta pacC$ in MMNA e MMSA presentavano dei valori di chelazione in termini di decremento % della OD₆₅₅ nettamente superiori rispetto ai restanti ceppi (MMNA= $\Delta hapX$ 66% e $\Delta pacC$ 56%; MMSA = $\Delta hapX$ 64% e $\Delta pacC$ 58%). Ciò nonostante i valori medi di pH dei due ceppi in MMSA e in MMNA erano rispettivamente pari a 3.07 e 3.85.
- Il ceppo #8 in tutti i substrati presentava valori di chelazione inferiori rispetto al ceppo *wild type*, ed in particolar modo in MMU e MMNS.

- I ceppi $\Delta bck1$, $\Delta mkk2$, $\Delta ste2$ e $\Delta mpk1$ in MMU e MMNS presentavano valori di chelazione significativamente maggiori rispetto ai valori riscontrati nel ceppo *wild type*.
- I ceppi mutanti $\Delta meaB$ e $\Delta mepB$ in MMNA presentavano una capacità chelante superiore a quella del ceppo *wild type*.

Quantificazione dell'acido fusarico

Analizzando qualitativamente il contenuto in acido fusarico nel brodo di coltura del ceppo *wild type* allevato nei 4 diversi MM è stato possibile verificare una correlazione diretta tra valore di pH – capacità chelante – presenza di acido fusarico (figura 66). Su tale base è stato poi quantificato l'acido fusarico presente nel brodo colturale di tutti i ceppi fungini allevati in tutti i MM, ed i valori ottenuti in termini di mg ml^{-1} sono stati rapportati alla biomassa fungina esprimendo il contenuto di questo metabolita secondario come mg di acido fusarico su unità di biomassa fungina (mg^{-1}). La stima della concentrazione dell'acido fusarico nel brodo di coltura è stata possibile grazie ad una retta di taratura realizzata mettendo in correlazione concentrazioni note di questo metabolita con i valori dell'area del picco rivelato in HPLC (figura 55). I dati ottenuti sono rappresentati graficamente nelle figure 61 e 62, analizzando i risultati è stato possibile constatare che il ceppo *wild type* produceva acido fusarico solamente nei contesi in cui riusciva ad innalzare il pH del mezzo colturale, ossia in MMU e MMNS; non vi erano differenze significative nella produzione di acido fusarico tra i ceppi *wild type*, $\Delta fmk1$ e Δhog . I ceppi $\Delta bck1$, $\Delta mkk2$, $\Delta ste2$ e $\Delta mpk1$ producevano una quantità in acido fusarico nettamente inferiore rispetto al ceppo *wild type*, risultato particolarmente evidente in MMU e MMNS. A mantenere la capacità di produrre acido fusarico anche a pH 3.0 erano i ceppi $\Delta hapX$ e $\Delta pacC$, infatti sia dall'analisi qualitativa che dai risultati HPLC è stato riscontrato acido fusarico sia in MMNA che MMSA (figura 61 e 66 B). Come atteso il ceppo #8 non produceva acido fusarico in nessun mezzo colturale. A confermare che la produzione dell'acido fusarico fosse influenzata dal pH sono i risultati ottenuti dai due ceppi $\Delta meaB$ e $\Delta mepB$ che in virtù del pH prodotto in MMNA riuscivano a produrre acido fusarico anche in questo MM. Analogamente a quanto svolto nella caratterizzazione dei ceppi di *P. fluorescens* è stato valutato l'effetto di alcune variabili chimiche sulla biosintesi dell'acido fusarico. Le variabili analizzate sono state: EDTA 0,2 mM; FeCl_3 100 μM ; pioverdina OD_{400} 0,5; MES 100 mM pH 7.0 e MES 100 mM pH 4.5. L'effetto sulla sintesi dell'acido fusarico è stato

valutato nei 4 MM con le diverse fonti azotate. Dall'analisi HPLC sul contenuto in acido fusarico nel brodo di coltura risultava che:

- In MMNA e MMSA, contesti in cui il ceppo *wild type* non ha prodotto acido fusarico la presenza di EDTA, la pioverdina e il MES a pH 7,0 induce la produzione di questo metabolita. In particolare la variabile che meglio ha prodotto un incremento di acido fusarico è stata l'EDTA in entrambe i substrati.
- In MMU e MMNS, contesti in cui il ceppo *wild type* ha prodotto acido fusarico, le variabili capaci di alterare tale fenotipo sono state l'EDTA, la pioverdina, il FeCl₃ 100 µM e il MES a pH 4.5. In particolare mentre le prime due variabili hanno incrementato il contenuto in acido fusarico il MES a pH 4.5 e il FeCl₃ a 100 µM ne annullava la produzione.

Questi risultati, riportati graficamente nella figura 65, hanno mostrato come la sintesi dell'acido fusarico fosse legata alla competitività del fungo per il ferro; infatti la presenza di siderofori di sintesi o di origine batterica, oppure valori di pH che hanno reso poco solubile tale catione, hanno incrementato significativamente la sintesi di acido fusarico.

Valutazione dell'attività inibitoria dell'acido fusarico nei confronti di *P. fluorescens* ceppo CHA0 e CHA1196

I risultati sopra descritti hanno evidenziato una stretta correlazione tra la produzione di acido fusarico e pH del mezzo colturale, di conseguenza la produzione di questo metabolita è stata influenzata dalla fonte azotata e soprattutto dalla disponibilità di ferro nel mezzo colturale. Le evidenze sperimentali finora illustrate attribuiscono all'acido fusarico un ruolo sull'approvvigionamento del ferro e di cationi di interesse biologico. Allo scopo di delucidare tale aspetto è stata valutata la capacità chelante di questo metabolita mediante saggio CAS, analizzando 10 concentrazioni differenti. Dall'analisi è risultata una chiara attività chelante dell'acido fusarico, proporzionale alla sua concentrazione come riportato graficamente nella figura 63. Delle stesse concentrazioni utilizzate nel saggio CAS è stata valutata la tossicità nei confronti di due ceppi batterici ampiamente studiati nel presente lavoro di dottorato (CHA0 e CHA1196). L'acido fusarico aggiunto in MMU con glucosio ha inibito totalmente la crescita del ceppo batterico *wild type* sin dalle concentrazioni più basse (0,125 mM). Invece il ceppo CHA1196 ha tollerato meglio la presenza dell'acido fusarico, la crescita batterica è stata notata fino alla concentrazione 1mM. La tossicità dell'acido fusarico nei confronti dei due

batteri è stata valutata anche in presenza di due variabili: pioverdina OD₄₀₀ 0,5 e FeCl₃ 100 µM. Entrambe le molecole hanno incrementato la tolleranza all'acido fusarico del ceppo CHA1196, che è riuscito a crescere fino alla concentrazione 4 mM. Diversamente in presenza di FeCl₃ si è annullato totalmente l'effetto inibente dell'acido fusarico nella concentrazione 0,125 mM, mentre è incrementata la tolleranza alla concentrazione 0,25 mM. La presenza della pioverdina ha incrementato la tolleranza all'acido fusarico anche nel ceppo CHA0, tanto che questo è riuscito a crescere alle due concentrazioni più basse (0,125 mM e 0,25 mM). In presenza di FeCl₃ è aumentata in maniera più evidente la tolleranza all'acido fusarico del ceppo CHA0 alla concentrazione 0,125 mM e in maniera inferiore anche alla concentrazione 0,25 mM (figura 64).

Caratterizzazione del brodo colturale dei ceppi di *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*

Le indagini condotte su *Fol* hanno evidenziato il chiaro coinvolgimento dell'acido fusarico nella competizione per in ferro con il microbioma potenzialmente presente nella rizosfera. Analizzando i fenotipi degli otto ceppi di *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* è stato valutato l'ipotetico coinvolgimento dell'acido fusarico nella competizione per i cationi di interesse biologico con la pianta ospite.

Dall'analisi dei risultati emergeva che:

- In termini di pH tutte le razze di *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* hanno seguito la stessa tendenza di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* nei vari MM. I tre ceppi appartenenti alla razza 0 (Foc 0, Foc7952 e Foc8503) hanno presentato valori di pH significativamente più alcalini in MMU, MMNS e MMNA rispetto alle restanti razze (figura 57).
- La capacità chelante di *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* è risultata nettamente ridotta rispetto a *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* nei vari MM. I tre ceppi appartenenti alla razza 0 hanno presentato valori di chelazione superiori alle restanti razze in MMU, MMNS e MMNA, ma comunque inferiori ai valori riscontrati in *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (figura 60).
- In tutti i substrati saggiati le razze 1, 2, 3, 4 e 5 non hanno prodotto acido fusarico, mentre per i tre ceppi appartenenti alla razza 0 è stata riscontrata la presenza di questo metabolita secondario nel brodo colturale prodotto in MMU, MMNS e MMNA. Le

concentrazioni di acido fusarico riscontrate sono state nettamente inferiori rispetto a quelle prodotte da *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (figura 67).

Discussione

L'applicabilità pratica di agenti di controllo biologico presuppone la conoscenza approfondita dei meccanismi attraverso i quali esplicano la loro azione. Questo aspetto non può prescindere dalla conoscenza delle caratteristiche biologiche del patogeno al quale si vuole far fronte mediante l'utilizzo di microrganismi antagonisti. L'obiettivo della presente tesi è stato lo studio dei meccanismi alla base dell'azione antagonistica esercitata da due batteri Gram-negativi (*P. fluorescens* ceppo CHA0 e *R. aquatilis* ceppo 36) nei confronti del patogeno fungino *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (*Fol*). La considerazione alla base della pianificazione, progettazione ed esecuzione delle prove sperimentali ha riguardato la capacità e la necessità del patogeno di modificare il pH del mezzo durante il processo infettivo. L'alterazione del pH durante l'interazione ospite-patogeno è una caratteristica comune a numerosi funghi fitopatogeni, infatti, come descritto nei paragrafi introduttivi, esistono specie che acidificano durante la colonizzazione dei tessuti vegetali e specie che invece alcalinizzano l'ambiente extracellulare (Rollins & Dickman, 2001, Eshel *et al.*, 2002, Karaffa & Kubicek, 2003, Kim *et al.*, 2007, Alkan *et al.*, 2008, Davidzon *et al.*, 2010). La proliferazione di *Fol* sin dalle primissime fasi della colonizzazione radicale tende alcalinizzare il mezzo, recenti ricerche scientifiche hanno evidenziato come questo fenomeno sia una condizione essenziale affinché l'interazione ospite-patogeno abbia un esito positivo (López-Berges *et al.*, 2010, Segorbe Luque, 2015). E' altrettanto nota la capacità di numerosi batteri di acidificare l'ambiente di crescita durante la proliferazione cellulare e nella maggior parte dei casi si conoscono i meccanismi biochimici alla base di tale acidificazione (Guo *et al.*, 2009, de Werra *et al.*, 2009, Guo *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2014). I due batteri oggetto di studio condividono lo stesso meccanismo di acidificazione, infatti ossidando il glucosio, per mezzo dell'attività enzimatica della proteina di membrana Gcd, accumulano acido gluconico nello spazio periplasmatico e quindi nel mezzo colturale. Recenti studi mettono in evidenza il ruolo di questo acido organico nell'attività antagonistica esercitata da *P. fluorescens* e *R. aquatilis* nei confronti di

patogeni fungini e batterici, giungendo a considerazioni contrastanti tra i due batteri (Guo *et al.*, 2009, de Werra *et al.*, 2009). Infatti, mentre per *R. aquatilis* l'acido gluconico è la molecola alla base dell'attività antagonista nei confronti dei patogeni batterici appartenenti al genere *Agrobacterium* (Guo *et al.*, 2009), in *P. fluorescens* l'abbassamento del pH extracellulare reprime la sintesi e la secrezione di 2,4-diacetylphloroglucinol e pyoluteorin (2,4-DAPG e PLT), due importanti molecole antifungine pertanto i ceppi mutanti Δgcd presentano una maggiore efficacia nell'attività antagonista nei confronti di *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* e *Rhizoctonia solani* (de Werra *et al.*, 2009). Il presente lavoro di tesi ha avuto la finalità di valutare il ruolo dell'enzima batterico Gcd, quindi dell'acido gluconico, nel controllo biologico di *Fol*. Tale obiettivo è stato perseguito analizzando i fenotipi dei mutanti Δgcd di entrambe le specie. I risultati inerenti la caratterizzazione del ceppo CHA0 e dei ceppi mutanti di *P. fluorescens* sono in accordo con quanto pubblicato da de Werra e collaboratori (2009). L'acido gluconico, e quindi anche l'attività enzimatica della proteina Gcd, svolgono un ruolo essenziale nell'alterazione del pH extracellulare. Infatti, il ceppo *wild type* così come i ceppi mutanti con il gene Gcd integro sono in grado di abbassare il pH extracellulare, mentre i ceppi Δgcd perdono tale capacità e con essa la capacità di solubilizzare il fosforo tricalcico. Dall'analisi del brodo di coltura dopo 72 ore di incubazione è emersa una grossa differenza nella secrezione di molecole fluorescenti tra i ceppi Δgcd e i ceppi con gene Gcd integro. Tale differenza, quantificata mediante misurazione della densità ottica a 400nm, è strettamente associata alla maggiore capacità chelante del brodo di coltura dei ceppi Δgcd rispetto ai restanti ceppi, indice di una maggiore secrezione di siderofori. I ceppi Δgcd , incapaci di acidificare il pH extracellulare, producono una maggiore quantità di pigmenti fluorescenti e di molecole chelanti rispetto al ceppo *wild type* e ai restanti mutanti con gene Gcd integro. In coltura duale i ceppi Δgcd sono in grado di inibire in misura maggiore l'accrescimento radiale di *Fol* ceppo *wild type* rispetto ad i ceppi batterici con gene Gcd integro; il ceppo fungino $\Delta hapX$ risente maggiormente dell'inibizione prodotta dagli stessi, dimostrando chiaramente il ruolo dei siderofori nell'inibizione prodotta. A supportare questa ipotesi vi è la riduzione dei livelli di inibizione dei due ceppi fungini in presenza $FeCl_3$. In coltura duale i ceppi mutanti per il geni della via biosintetica del 2,4-DAPG e della PLT (CHA1241, CHA1242, CHA1244 e CHA661) non hanno presentato alcun decremento della capacità inibitoria, escludendo il coinvolgimento di queste molecole antifungine nell'inibizione *in vitro* di *Fol*. Dei tre mutanti per le MAPK di *Fol* a risentire maggiormente dell'inibizione prodotta dai ceppi Δgcd è stato il mutante $\Delta mpk1$ e pertanto si può ipotizzare il coinvolgimento di questa chinasi nella trasduzione citoplasmatica di segnali

coinvolti nell'interazione con *P. fluorescens*. Anche nei saggi di inibizione in liquido è emersa la maggiore capacità inibente dei mutanti Δgcd rispetto al ceppo *wild type* ed ai restanti ceppi mutanti batterici, tale inibizione si riduceva fino ad annullarsi aggiungendo concentrazioni crescenti di $FeCl_3$. Anche in questo caso i mutanti per la biosintesi del 2,4-DAPG e della PLT non presentavano decrementi di efficacia nell'inibizione dell'accrescimento fungino, potendo pertanto escludere il coinvolgimento di queste molecole nell'interazione antagonistica batterio fungo *in vitro*. Le evidenze sperimentali ottenute consentono di ipotizzare il coinvolgimento dei siderofori batterici nell'inibizione di *Fol*. Applicando una pressione chelante equivalente a quella presente nel brodo colturale dei ceppi Δgcd , mediante l'utilizzo di un chelante chimico (EDTA), si otteneva la totale inibizione dell'accrescimento fungino, confermando quanto supposto in precedenza. La valutazione dell'inibizione residua delle frazioni estratte con solventi organici (fenolo, etilacetato) del brodo di coltura del ceppo CHA1241 permette di escludere il coinvolgimento di altre molecole antifungine, in quanto l'attività inibente è costantemente associata alla capacità chelante della frazione. La caratterizzazione *in vitro* dei mutanti di *P. fluorescens* ha messo in evidenza l'incremento della capacità antagonistica dei ceppi Δgcd nei confronti di *Fol*, pertanto ne è stata valutata l'efficacia *in vivo*. La proliferazione a livello radicale dei ceppi batterici Δgcd ha incrementato in maniera significativa la capacità chelante degli essudati radicali, rispetto a quella riscontrata in assenza di batteri oppure in presenza del ceppo batterico *wild type* e dei restanti mutanti con il gene *Gcd* integro. Mentre gli essudati radicali hanno prodotto un'apprezzabile risposta chemiotropica nel fungo patogeno (20% circa di indice di chemiotropismo), gli essudati radicali prodotti in presenza dei ceppi batterici hanno esercitato una chiara repulsione. L'attività repellente è risultata nettamente maggiore negli essudati radicali prodotti in presenza dei ceppi Δgcd . Analizzando la risposta chemiotropica dei tre mutanti per le MAPK non sono state riscontrate alterazioni fenotipiche per i ceppi $\Delta fmk1$ e Δhog rispetto al ceppo *wild type*, mentre il mutante fungino $\Delta mpk1$ è stato chiaramente meno repulso dagli essudati radicali prodotti in presenza dei ceppi Δgcd . Tali risultati lasciano supporre un coinvolgimento della chinasi $\Delta mpk1$ nella trasduzione citoplasmatica di stimoli esterni legati al ferro e alla sua disponibilità. Per tale ragione si è provveduto all'analisi dei livelli di chemiotropismo nei confronti di stimoli semplici legati alla disponibilità al ferro. In tal senso è stata analizzata la risposta chemiotropica di ceppi fungini mutanti per intermedi della via di trasduzione della proteina $\Delta mpk1$ (Δbck , $\Delta mkk2$ e $\Delta ste2$). I livelli di chemiotropismo nei confronti di questi stimoli (EDTA, Pioverdina, $FeCl_3$) dei mutanti $\Delta fmk1$ e Δhog non hanno presentato apprezzabili variazioni rispetto a quelli registrati per il ceppo *wild type*, mentre nei confronti

di tali stimoli significativi discostamenti di risposta chemiotropica sono stati registrati per i ceppi $\Delta mpk1$, $\Delta bck1$, $\Delta mkk2$ e $\Delta ste2$. Altra valutazione in merito alle alterazioni prodotte dalla proliferazione batterica sulle caratteristiche degli essudati radicali ha riguardato la quantificazione della germinazione dei microconidi fungini, comparando la percentuale di germinazione ottenuta in un mezzo ricco (PDB) e negli essudati radicali, rispetto a quelle ottenute negli essudati radicali prodotti in presenza dei batteri. La presenza dei ceppi di *P. fluorescens* ha ridotto notevolmente la percentuale di geminazione conidica rispetto alle due tesi di controllo. La riduzione della germinazione conidica è stata particolarmente consistente nelle tesi trattate con i ceppi Δgcd , pertanto, anche in questo caso la mancata produzione di acido gluconico ha determinato l'incremento di efficacia nell'azione antagonistica nei confronti di *Fol*, rispetto ai restanti ceppi con gene *Gcd* intatto. L'assenza dei geni essenziali per la sintesi delle due molecole antifungine, 2,4-DAPG e PLT, non ha comportato alterazioni nella percentuale di germinazione. L'ultimo aspetto analizzato ha riguardato la valutazione delle capacità antagonistiche *in vivo* del ceppo *wild type* e mutanti di *P. fluorescens* mediante un saggio di controllo biologico, analizzando la mortalità nel tempo delle piante di pomodoro della varietà *MoneyMaker*. Il ceppo *wild type* di *Fol* ha prodotto la morte di tutta la popolazione di piante di pomodoro entro circa 40 giorni dall'inoculazione, laddove invece la batterizzazione ha ridotto la percentuale di mortalità, risultando maggiormente efficaci i ceppi batterici Δgcd . Anche in questo caso è possibile ipotizzare un coinvolgimento delle molecole chelanti batteriche; a confermare tale supposizione è l'incremento di efficacia dei batteri Δgcd nei confronti del ceppo mutante $\Delta hapX$ di *Fol*. La mutazione nel gene *HapX*, riducendo l'efficacia nel mantenimento dell'omeostasi del ferro nel ceppo fungino ha pertanto ridotto la competitività nei confronti dei ceppi di *P. fluorescens* Δgcd .

Per il ceppo 36 di *R. aquatilis* non si dispone di sequenza genomica pertanto per la produzione di mutanti *knockout* per il gene *Gcd* è stato necessario un importante lavoro di bioinformatica preliminare. In tal senso sono stati analizzati i genomi depositati in banca dati NCBI di tre ceppi di *R. aquatilis* e un ceppo tassonomicamente affine a tale specie. Diversi lavori scientifici hanno descritto il ruolo del gene *Gcd* di *R. aquatilis* nel controllo biologico di patogeni batterici della vite; pertanto era già disponibile la sequenza nucleotidica di tale gene (Guo *et al.*, 2009). Eseguendo l'analisi BLAST della sequenza del gene *Gcd* con le sequenze genomiche selezionate è stato possibile localizzare fisicamente il gene. In tutti i casi analizzati il gene risultava localizzato nel plasmide di maggiori dimensioni e sono state considerate 1500 pb a monte e a valle del gene bersaglio. Le sequenze nucleotidiche selezionate dai 4 ceppi batterici sono state analizzate individuando le regioni maggiormente

conservate sulle quali poter disegnare i primer necessari per la realizzazione del costrutto ricombinante. I primer disegnati mediante analisi bioinformatica sono risultati efficaci nel ceppo 36 di *R. aquatilis* amplificando regioni genomiche delle dimensioni attese. La sintesi del costrutto ricombinante mediante PCR di fusione si è rivelata discretamente efficace generando oltre all'amplicone delle dimensioni attese una serie di aspecifici che hanno reso necessario il passaggio di clonazione in plasmide pGem-T[®], rendendo più agevole la sintesi delle quantità necessarie di costrutto. L'elettroporazione ha generato una buona quantità di colonie batteriche kanamicina resistenti, mentre la piastra di controllo non recava alcuna colonia di falso positivo, escludendo l'insorgenza di resistenze spontanee dovute a modifiche transitorie nel metabolismo batterico. Delle colonie selezionate è stato possibile valutare, mediante PCR di conferma, l'avvenuta mutazione del gene *Gcd*. Per la successiva caratterizzazione fenotipica sono stati selezionati due ceppi Δgcd nonché un ceppo ectopico. Dalla caratterizzazione *in vitro* del ceppo *wild type* di *R. aquatilis* è emersa una forte capacità di acidificazione sia in MM che degli essudati radicali. Tale capacità permaneva nel ceppo ectopico mentre veniva persa dai ceppi Δgcd . La proliferazione fungina sia in MM che a contatto con l'apparato radicale ha prodotto l'alcalinizzazione del pH extracellulare, ad eccezione di quanto osservato in presenza di ammonio (solfato di ammonio e nitrato di ammonio). La co-incubazione batterio *wild type* con *Fol*, sia in MM che negli essudati radicali, ha prodotto un pH acido con valori nettamente inferiori rispetto a quelli ottenuti dalla proliferazione del solo fungo. L'interazione del fungo patogeno con i ceppi Δgcd , ha prodotto un pH tendenzialmente basico, simile a quello prodotto dal solo fungo. Dai saggi di penetrazione su membrana di *cellophane* è stato possibile valutare l'influenza della proliferazione batterica sulla capacità del fungo di oltrepassare questa barriera. Precedenti studi scientifici (Di Pietro *et al.*, 2001, López-Berges *et al.*, 2010) hanno messo in correlazione la penetrazione di membrane di *cellophane* con l'alcalinizzazione extracellulare prodotta da *Fol*. La presenza del ceppo *wild type* di *R. aquatilis* impedisce la penetrazione del fungo, tale azione permane tamponando il mezzo colturale a pH 4, mentre si annulla tamponando a pH 7. Il ceppo batterico Δgcd , non riuscendo ad abbassare il pH del mezzo colturale, non può impedire la penetrazione della membrana di *cellophane* da parte di *Fol*. Al riguardo è stato possibile escludere il coinvolgimento di molecole antifungine nell'azione del ceppo batterico *wild type* in quanto l'attività è legata alla sua presenza fisica quindi alla continua variazione del pH. La presenza del ceppo batterico *wild type* impedisce la normale adesione di *Fol* ai tessuti radicali e la crescita invasiva su frutti di pomodoro, presupposti essenziali nel processo infettivo. La mutazione nel gene *Gcd* batterico ha comportato la

perdita di queste attività; infatti, il patogeno fungino in presenza del ceppo Δgcd era in grado di aderire alla radice e a produrre marciume nei tessuti vegetali. Nonostante il ceppo *wild type* di *R. aquatilis* era capace di influenzare numerosi aspetti legati alla virulenza di *Fol* esso non produceva alcuna inibizione del ceppo fungino *wild type* in coltura duale. Ad essere inibito invece era il ceppo fungino $\Delta mpk1$ con un accrescimento radiale nettamente ridotto in presenza del ceppo batterico *wild type*, attività che veniva invece persa dal ceppo Δgcd di *R. aquatilis*. Dalla prova di controllo biologico è emersa una buona efficacia del ceppo batterico *wild type* nel contenimento della virulenza di *Fol*; l'effetto antagonistico permaneva tamponando il pH d'interazione al valore di 5 mediante l'utilizzo di soluzioni tamponate. Irrigando le piante con una soluzione tampone a pH 7 la capacità di controllo biologico esercitata dal batterio si riduceva drasticamente. Allo stesso tempo la virulenza di *Fol* nella tesi a pH 5 subiva un netto decremento rispetto alle piante irrigate con acqua. Mantenendo il pH a 7 aumentava la rapidità del decorso della malattia come conseguenza dell'aumentata virulenza del fungo patogeno. A questo risultato si aggiungeva anche la perdita di efficacia del ceppo batterico Δgcd nel controllo di *Fol*. Entrambi i risultati associano la capacità di acidificazione di *R. aquatilis* con la capacità antagonistica *in vivo* nei confronti di *Fol*, nel primo caso esercitando un'azione chimica mentre nel secondo caso impedendo geneticamente la produzione dell'acido gluconico mediante l'interruzione del gene *Gcd*.

Recenti ricerche hanno evidenziato la capacità di *Fol* di alterare attivamente il pH extracellulare in funzione della fonte azotata a disposizione, nonché la necessità di incrementare il pH durante il processo infettivo affinché l'interazione ospite patogeno abbia esito positivo (López-Berges *et al.*, 2010). Nel loro insieme, i risultati sin qui descritti, hanno confermato il ruolo cruciale del pH nella virulenza di *Fol*; pertanto come ultimo obiettivo sono state valutate le alterazioni nella sintesi e secrezione di metaboliti secondari fattori di virulenza (acido fusarico) in funzione del pH extracellulare. La proliferazione del ceppo *wild type* di *Fol* in MMU MMNS ha prodotto un incremento del pH del brodo di coltura, mentre in MMNA e MMSA l'accrescimento fungino produceva acidificazione del pH extracellulare. Stesso fenotipo è stato riscontrato in tutti i ceppi mutanti utilizzati ad eccezione dei mutanti $\Delta meaB$ e $\Delta mepB$ i quali in presenza di nitrato di ammonio alcalinizzavano il pH extracellulare. Dal saggio CAS è emerso una stretta correlazione tra alcalinizzazione e secrezione di siderofori; infatti, analizzando la capacità chelante del ceppo *wild type* di *Fol* in funzione della fonte azotata è stato possibile verificare che i livelli di chelazione maggiori sono stati registrati in MMU e MMNS, contesti in cui il fungo tendeva ad incrementare il pH nel mezzo colturale. La maggior parte dei ceppi mutanti hanno risposto a tale regola, fatta

eccezione per i ceppi $\Delta hapX$ e $\Delta pacC$ per i quali nonostante il pH in presenza di ammonio raggiungeva valori di 3 circa, la capacità chelante del brodo colturale era nettamente superiore rispetto a quella dei restanti ceppi fungini. Altro risultato che prova la correlazione tra capacità chelante e pH extracellulare riguarda i livelli di chelazione osservati nei brodi di coltura dei ceppi mutanti $\Delta meaB$ e $\Delta mepB$ in presenza di nitrato di ammonio. I ceppi $\Delta mpk1$, $\Delta bck1$, $\Delta mkk2$ e $\Delta ste2$ in nitrato di sodio ed urea presentavano valori di chelazione nettamente superiori a quelli dei restanti ceppi fungini. Dall'analisi qualitativa e quantitativa dell'acido fusarico nel brodo di coltura del ceppo *wild type* emerge un'ulteriore correlazione; infatti, al pH e la capacità chelante si associa anche la produzione di questo metabolita secondario. La produzione di acido fusarico è stata particolarmente abbondante in MMU e MMNS, mentre lo stesso non veniva prodotto in MMSA e MMNA. Hanno risposto a tale regola la maggior parte dei ceppi mutanti, fatta eccezione dei ceppi $\Delta hapX$ e $\Delta pacC$ i quali hanno prodotto livelli apprezzabili di acido fusarico anche in MMNA e MMSA. Anche in questo caso la produzione di acido fusarico in MMNA dei ceppi mutanti $\Delta meaB$ e $\Delta mepB$ conferma l'associazione tra pH extracellulare e la produzione di questo metabolita. I ceppi $\Delta mpk1$, $\Delta bck1$, $\Delta mkk2$ e $\Delta ste2$ hanno prodotto quantità di acido fusarico nettamente inferiori rispetto al ceppo *wild type*. Come recentemente descritto (Ruiz *et al.*, 2015) l'acido fusarico è capace di legare stabilmente diversi cationi di interesse biologico tra cui il ferro; i risultati del presente lavoro di tesi hanno confermato tale capacità mediante saggio CAS. Analizzando l'accrescimento dei ceppi batterici CHA0 e CHA1196 in presenza di acido fusarico è emersa una maggiore sensibilità del ceppo batterico *wild type*. L'inibizione prodotta dall'acido fusarico si riduceva in presenza di pioverdina oppure dei $FeCl_3$. La chiara associazione pH, capacità chelante, produzione acido fusarico unita all'effettiva capacità chelante dell'acido fusarico e alla differente sensibilità all'acido fusarico dei due ceppi batterici, rendono ragionevole ipotizzare il coinvolgimento dell'acido fusarico nel metabolismo del ferro di *Fol*. A tale scopo è stata valutata l'influenza di alcune variabili chimiche sulla produzione dell'acido fusarico nel ceppo fungino *wild type*, osservando che nei contesti in cui il fungo produceva acido fusarico (MMU e MMNS) si otteneva la riduzione di tale produzione tamponando il substrato a pH 4.5 oppure in presenza di $FeCl_3$. In contesti in cui il fungo non produceva acido fusarico l'aggiunta di EDTA, di pioverdina batterica oppure tamponando il pH a 7.0 induceva la produzione di questo metabolita. Precedenti ricerche descrivono come questa fitotossina sia particolarmente abbondante nei tessuti vegetali marcescenti attaccati da *F. oxysporum* (Dong *et al.*, 2012). I risultati emersi nel corso delle attività sperimentali lasciano supporre il coinvolgimento di questo metabolita nella manifestazione sintomatica prodotta da *F.*

oxysporum (*yellowing*). In tal senso è stata anche analizzata la capacità chelante e produzione di acido fusarico di 8 ceppi appartenenti a 6 razze di *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (*Foc*) differenti per le manifestazioni sintomatiche indotte nelle varietà suscettibili di cece (patotipo *yellowing* e patotipo *wilting*) (Kelly *et al.*, 1994). In termini di pH tutti i ceppi di *Foc* hanno risposto in maniera simile al ceppo *wild type* di *Fol*, mentre sono stati riscontrati discreti livelli di chelazione in MMU e MMNS solamente nei patotipi *yellowing* (razza 0). A produrre acido fusarico erano solo i patotipi *yellowing*, comunque in quantità inferiori rispetto a quelle riscontrate per *Fol*.

Conclusioni

L'azione degli organismi sul pH extracellulare è un aspetto fondamentale per il quale sia eucarioti che procarioti investono molto in termini energetici. Nell'interazione ospite-patogeno *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* -*Solanum lycopersicum* la reciproca influenza sul pH nella rizosfera è un fattore determinante che condiziona l'esito di tale interazione. Le secrezioni radicali generano condizioni tali da favorire la proliferazione nella rizosfera di innumerevoli microrganismi che a loro volta alterano il pH di questa nicchia ecologica. Alla luce dei risultati ottenuti nei tre anni di dottorato di ricerca è possibile affermare che il gene batterico *glucose dehydrogenase* (Gcd) ha un ruolo essenziale nel controllo biologico di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, ma con risvolti opposti nei due ceppi batterici Gram-negativi presi in esame. Infatti in *Pseudomonas fluorescens* ceppo CHA0 la mutazione nel gene Gcd ha comportato un aumento dell'attività antagonistica sia *in vivo* che *in vitro* e tale incremento, al contrario di quanto descritto in precedenti lavori scientifici, non si deve ad una maggiore sintesi di molecole antifungine. Infatti le performance dei mutanti semplici per i geni della via biosintetica del *2,4-diacetyl phloroglucinol* (2,4-DAPG) e della *Pyoluteorin* (PLT) (i ceppi batterici CHA1241 e CHA661 rispettivamente) non si discostano in maniera significativa rispetto a quelle del ceppo *wild type*, mentre il doppio mutante (2,4-DAPG – Gcd) ed il triplo mutante 2,4-DAPG, Gcd e *gluconate dehydrogenase* (2,4-DAPG – Gcd - Gad) presentano stesse capacità antagonistiche del mutante per il gene Gcd (CHA1196). L'incremento della capacità di controllo biologico osservato nei mutanti Δgcd nei confronti di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* è dovuto ad un consistente aumento nella sintesi e secrezione di siderofori che come è noto svolgono un ruolo essenziale nell'azione antagonistica di pseudomonadi fluorescenti nei confronti dei patogeni del appartenenti al genere *Fusarium*. Quanto osservato in *P. fluorescens* ceppo CHA0 suggerisce che, nell'approvvigionamento di cationi di interesse biologico, la secrezione di acidi organici reprime la produzione di siderofori solubilizzando

tali elementi solo per mezzo del pH acido. In contesti tamponati, quali l'ecosistema suolo, o in assenza del gene responsabile della sintesi del acido gluconico, *P. fluorescens* incrementa in maniera consistente la sintesi di molecole chelanti.

Rahnella aquatilis ha una forte attività di acidificazione extracellulare che viene a mancare nei mutanti Δgcd . Per questa specie batterica l'acidificazione nella rizosfera è un meccanismo chiave attraverso il quale essa riesce a controllare la virulenza di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Impedendo tale acidificazione, mediante tamponi oppure per mezzo di mutazioni nel gene Gcd, l'attività antagonistica si riduce drasticamente. La perdita di efficacia è stata descritta sia mediante test *in vivo* sia analizzando una serie di aspetti strettamente legati alla virulenza di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

L'ultimo aspetto analizzato ha permesso di comprendere in maniera più approfondita l'influenza del pH sulla virulenza di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, analizzando la sintesi e la secrezione dell'acido fusarico, un importante fattore di virulenza in diverse specie del genere *Fusarium*. Questo approccio è stato possibile sfruttando la differente reazione, in termini di pH extracellulare, in funzione alla fonte azotata metabolizzata dal patogeno fungino. I maggiori valori di chelazione sono stati osservati in presenza di urea e nitrato di sodio e in entrambe i casi la proliferazione fungina ha determinato l'incremento del pH nel brodo colturale. In nitrato di ammonio e solfato di ammonio la crescita fungina ha prodotto una forte acidificazione (pH $3 \approx$) ed in questo caso solamente il ceppo di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* mutante per il gene HapX, che regola l'omeostasi del ferro, ($\Delta hapX$) riusciva a produrre una discreta quantità di molecole chelanti. Analizzando la produzione dell'acido fusarico nel brodo colturale è possibile associare la presenza di questo metabolita con pH basici. Questa associazione è stata confermata dall'analisi del brodo di coltura in presenza di nitrato di ammonio dei ceppi mutanti per il fattore di trascrizione MeaB e per il gene codificante per il trasportatore di ammonio MepB ($\Delta meaB$ e $\Delta mepB$ rispettivamente); infatti entrambe i mutanti alcalinizzando in presenza di ammonio producono acido fusarico. A tale regola faceva eccezione il mutante $\Delta hapX$ il quale, benché induceva pH acidi, in presenza di ammonio produceva acido fusarico, rendendo verosimile l'ipotesi di una stretta associazione tra l'acido fusarico e l'approvvigionamento del ferro. L'analisi della capacità chelante e della produzione di acido fusarico in presenza delle differenti fonti azotate nei ceppi mutanti per le tre MAPK evidenzia degli squilibri nel mutante $\Delta mpk1$ e negli intermedi della via di trasduzione Mpk1, ipotizzando che queste chinasi possano avere un ruolo chiave nella trasduzione di segnali esterni legati alla disponibilità e all'approvvigionamento del ferro. La diversa sensibilità dei

ceppi mutanti di *P. fluorescens* CHA0 e CHA1196 a dosi crescenti di acido fusarico, unita alla riduzione della capacità inibente di questa molecola in presenza di ferro e/o pioverdina, legano in maniera chiara la produzione di questo metabolita alla competizione per il ferro e la tolleranza a questo metabolita all'aumentata produzione di siderofori batterici. In accordo con quanto osservato per la produzione di siderofori batterici la produzione di acido fusarico subisce un incremento in presenza di molecole chelanti o di pH basico mentre presenta un decremento in presenza di ferro oppure di pH acido. L'acido fusarico può essere pertanto considerato un sideroforo fungino attivo nella competizione per il ferro con il microbioma sia nella rizosfera sia nei tessuti vegetali di piante attaccate da *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* dove è particolarmente abbondante. In ultima analisi è stato possibile legare la produzione di acido fusarico alla clorosi fogliare indotta dai patotipi *yellowing* di *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* in quanto nelle condizioni sperimentali del presente lavoro di tesi era unicamente prodotto dalla razza 0.

In conclusione, il presente studio, condotto utilizzando un sistema modello basato su un patogeno fungino (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*), ben studiato e caratterizzato e che ha fornito disponibilità di mutanti per varie importanti funzioni, e sul coinvolgimento di ceppi batteri antagonisti selezionati (*R. aquatilis* e *P. fluorescens*) ha permesso di chiarire il ruolo di alcuni importanti aspetti (pH, siderofori, acido fusarico,) coinvolti nei meccanismi di interazione tra patogeno fungino e agenti di lotta biologica. Le ricerche sin qui condotte aprono la strada a future ricerche volte ad una migliore e più rapida comprensione delle complesse interazioni messe in atto tra microrganismi utili e patogeni fungini ad habitat terricolo, al fine di ottimizzarne il controllo biologico.

Tabelle

Organismo	Gene	A. number	AA
<i>Rahnella aquatilis</i> HX2	Fusaric acid resistance protein	AFE58979.1	683
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Fusaric acid detoxification protein	BAA12297.1	234
<i>Pseudomonas knackmussii</i> B13	Fusaric acid resistance protein fusA	CDF82313.1	502
<i>Burkholderia cepacia</i>	Fusaric acid resistance protein FusC	P24128.1	346
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fusaric acid resistance protein fusA	CEI03673.1	506
<i>Serratia marcescens</i> WW4	Fusaric acid resistance protein	AGE18235.1	645
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Fusaric acid resistance protein	KFZ94465.1	361

Tabella 1. Geni batterici codificanti per enzimi coinvolti nella detossificazione o resistenza all'acido fusarico. (A. number = numero di accesso associato al gene; AA = numero di amminoacidi).

Tabella 2. Ceppi batterici utilizzati nel presente lavoro di tesi.

Specie	Ceppo	Descrizione	Riferimenti bibliografici
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CHA0	Wild Type	(Stutz <i>et al.</i> , 1986)
	CHA661	Δ <i>phl::Tn5</i>	(Baehler <i>et al.</i> , 2005)
	CHA1196	Δ <i>gcd</i>	(de Werra <i>et al.</i> , 2009)
	CHA1197	Δ <i>gad</i>	(de Werra <i>et al.</i> , 2009)
	CHA1198	Δ <i>gcd</i> Δ <i>gad</i>	(de Werra <i>et al.</i> , 2009)
	CHA1241	Δ <i>dapg</i>	Non pubblicato
	CHA1242	Δ <i>dapg</i> Δ <i>gcd</i>	Non pubblicato
	CHA1244	Δ <i>dapg</i> Δ <i>gcd</i> Δ <i>gad</i>	Non pubblicato
<i>Rahnella aquatilis</i>	36	Wild Type	Questo studio
	#3	Δ <i>gcd::Kanamicin</i>	Questo studio
	#4	Ectopico:: <i>Kanamicin</i>	Questo studio
	#5	Δ <i>gcd::Kanamicin</i>	Questo studio
<i>Escherichia coli</i>	TOP10	Ceppo utilizzato per la conservazione e replicazione di plasmidi, ampliconi PCR e costrutti ricombinanti.	

Tabella 3. Ceppi fungini utilizzati nel presenta lavoro di tesi. (AF::*HYGR* = mutante *knockout* per la biosintesi dell'acido fusarico).

Specie	Ceppo/razza	Descrizione	Riferimenti bibliografici
--------	-------------	-------------	---------------------------

<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	4287	Wild Type razza 2	Prof. A. Di Pietro; Cordova; Spagna
	Δ <i>fmk1</i>	<i>fmk1</i> :: PHLE	(Di Pietro <i>et al.</i> , 2001)
	Δ <i>mpk1</i>	<i>mpk1</i> :: HYGR	(Turrà <i>et al.</i> , 2015)
	Δ <i>hog1</i>	<i>hog1</i> ::HYGR	Non pubblicato
	Δ <i>meaB</i>	<i>meaB</i> :: HYGR	(López-Berges <i>et al.</i> , 2010)
	Δ <i>mepB</i>	<i>mepB</i> :: HYGR	Non pubblicato
	Δ <i>bck1</i>	<i>bck1</i> :: HYGR	(Turrà <i>et al.</i> , 2015)
	Δ <i>mkk2</i>	<i>mkk2</i> :: HYGR	(Turrà <i>et al.</i> , 2015)
	Δ <i>ste2</i>	<i>ste2</i> :: HYGR	(Turrà <i>et al.</i> , 2015)
	Δ <i>pacC</i>	<i>pacC</i> :: HYGR	(Caracuel <i>et al.</i> , 2003)
Δ <i>hapX</i>	<i>hapX</i> :: HYGR	(López-Berges <i>et al.</i> , 2012)	
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i>	#8	AF::HYGR	Non pubblicato
	0	Patotipo yellowing	(Kelly <i>et al.</i> , 1994)
	0	Patotipo yellowing	(Kelly <i>et al.</i> , 1994)
	0	Patotipo yellowing	(Kelly <i>et al.</i> , 1994)
	1	Patotipo wilting	(Kelly <i>et al.</i> , 1994)
	2	Patotipo wilting	(Kelly <i>et al.</i> , 1994)
	3	Patotipo wilting	(Kelly <i>et al.</i> , 1994)
	4	Patotipo wilting	(Kelly <i>et al.</i> , 1994)
5	Patotipo wilting	(Kelly <i>et al.</i> , 1994)	

Tabella 4. Oligotidi utilizzati nel presente lavoro di tesi. I nucleotidi in rosso ed in blu presentano complementarità tra loro (figura 10).

Primer	Sequenza 5'→3'
Gcd for	ACGCGCCGATCAGTACAACG
Gcd for nested	CCTGATGACTTATCACGGCG
Gcd rev + Kan prom rev	gagcgtcagacc ccgtagaaAGAAGCGTAGCCCATGTTGCG
Gcd for + Kan term for	caaataggggt tcgcgcac TTCGTGTCTAAACTGATCCAC
Gcd rev	TGTGGTGATTTACGAACCCGC
Gcd rev nested	CGGGCCCTTTGTGGAAATTC
Kan prom rev	TTCTACGGGGTCTGACGCTC
Kan term for	GTGCGCGGAACCCCTATTG

Tabella 5. Composizione e ciclo termico delle reazioni PCR per l'amplificazione delle regioni al 5' e 3' del gene Gcd.

Reazione PCR amplificazione regione 5' e 3'					
Composizione della reazione		Ciclo termico della reazione PCR			
Reagente	Quantità	Fase	T °C	Tempo	Cicli
PCR Master mix 2X Promega	10 µl	Denaturazione iniziale	94	5 sec.	30
DNA genomico <i>R. aquatilis</i>	1 µl	Denaturazione	94	30 sec.	
Primer f (10 mM)	0,8 µl	Ibridazione	60	30 sec.	
Primer r (10 mM)	0,8 µl	Estensione	72	1 min.	1
Nuclease free water	7,4 µl	Estensione finale	72	5 min.	
Totale	20 µl				

Tabella 6. Composizione e ciclo termico della reazione PCR per l'amplificazione della cassetta di resistenza alla kanamicina.

Reazione PCR amplificazione cassetta resistenza alla kanamicina					
Composizione della reazione		Ciclo termico della reazione PCR			
Reagente	Quantità	Fase	T °C	Tempo	Cicli
PCR Master mix 2X Promega	10 µl	Denaturazione iniziale	94	5 sec.	30
DNA plasmide pET-28a-C	1 µl	Denaturazione	94	30 sec.	
Primer f (10 mM)	0,8 µl	Ibridazione	60	30 sec.	
Primer r (10 mM)	0,8 µl	Estensione	72	1 min.	1
Nuclease free water	7,4 µl	Estensione finale	72	5 min.	
Totale	20 µl				

Tabella 7. Composizione e ciclo termico della reazione PCR di fusione.

Reazione PCR di fusione					
Composizione della reazione		Ciclo termico della reazione PCR			
Reagente	Quantità	Fase	T °C	Tempo	Cicli
PCR Master mix 2X Promega	25 µl	Denaturazione iniziale	94	5 sec.	1
DNA amplicone 5'	1 µl	Denaturazione	94	30 sec.	30
DNA amplicone 3'	1 µl	Ibridazione <i>temperature gradient protocol Δ6</i>	60	30 sec.	
DNA resistenza Kan	1 µl	Estensione	72	3 min.	
Primer Gcd for nested (10 mM)	1.6 µl	Estensione finale	72	10 min.	1
Primer Gcd rev nested (10 mM)	1.6 µl				
Nuclease-free water	18,8 µl				
Totale	50 µl				

Tabella 8. Reazione di ligazione del prodotto della PCR di fusione nel plasmide pGEM-T®.

Reazione di ligazione del prodotto PCR di fusione in pGEM-T®	
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µl
pGEM®-T (50ng)	1 µl
Prodotto PCR (fusione)	1 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
Nuclease-free water	2 µl
Totale	10 µl

Tabella 9. Plasmidi commerciali utilizzati nel presente lavoro di tesi.

Plasmide	Descrizione
pGem-T® Promega	Vettore linearizzato con enzima EcoRV e con una Timina in ciascun estremità 3'. Questa caratteristica permette la clonazione di frammenti PCR con Adenina alle estremità. Conferisce resistenza all'ampicillina.
pET-28a-c(+) Addgene	Vettore con sito multiplo di clonaggio che permette la clonazione direzionale del gene di interesse. L'espressione delle sequenze inserite è sotto il controllo promotore T7lac ed il terminatore della trascrizione T7, entrambe riconosciuti dalla T7 RNA polimerasi. Nel sito di clonaggio multiplo è presente una sequenza His Tag codificante un oligopeptide composto da 6 residui di istidina, che viene fuso all'N-terminale della proteina di interesse e ne permette la purificazione. Tra His Tag e la sequenza nucleotidica è presente un sito di taglio della trombina che permette la rimozione dell'estremità His Tag. Il marker di selezione è la resistenza alla kanamicina

Tabella 10. Genomi sequenziati e depositati in banca dati NCBI di *R. aquatilis*.

Tabella 11. Plasmidi sequenziati e depositati in banca dati NCBI di *R. aquatilis*.

<i>Rahnella</i> strain	Plasmid name	Size (Kb)	Gene	GC (%)
<i>Rahnella aquatilis</i> CIP 78.65 = ATCC 33071	pRahaq201	463.91	398	52.3
	pRahaq202	115.49	104	50.7
	pRahaq203	8.41	6	44.9
<i>Rahnella aquatilis</i> HX2	PRA1	570.95	503	52
	PRA2	48.52	48	54.2
	PRA22	75.16	66	48.7
<i>Rahnella</i> sp. Y9602	pRAHAQ01	616.55	578	52.1
	pRAHAQ02	133.49	120	48.3

<i>Rahnella</i> strain	Strain	Size (Mb)	Gene	Protein	GC (%)
<i>Rahnella aquatilis</i> CIP 78.65 = ATCC 33071	CIP 78.65	5.4489	4920	4767	52.3
<i>Rahnella aquatilis</i> HX2	HX2	5.6568	5131	4942	50.7
<i>Rahnella aquatilis</i>	OV588	5.37089	4819	4669	52.2
<i>Rahnella aquatilis</i>	OV744	5.48298	4980	4792	52.1
<i>Rahnella aquatilis</i> CIP 78.65 = ATCC 33071	ATCC 33071	5.3846	4898	4673	52.1
<i>Rahnella aquatilis</i>	1133_RAQU	4.74583	4276	4157	48
<i>Rahnella</i> sp. WP5	WP5	5.44411	4972	4827	52.1
<i>Rahnella</i> sp. Y9602	Y9602	5.6142	5141	5010	52.18

Figure

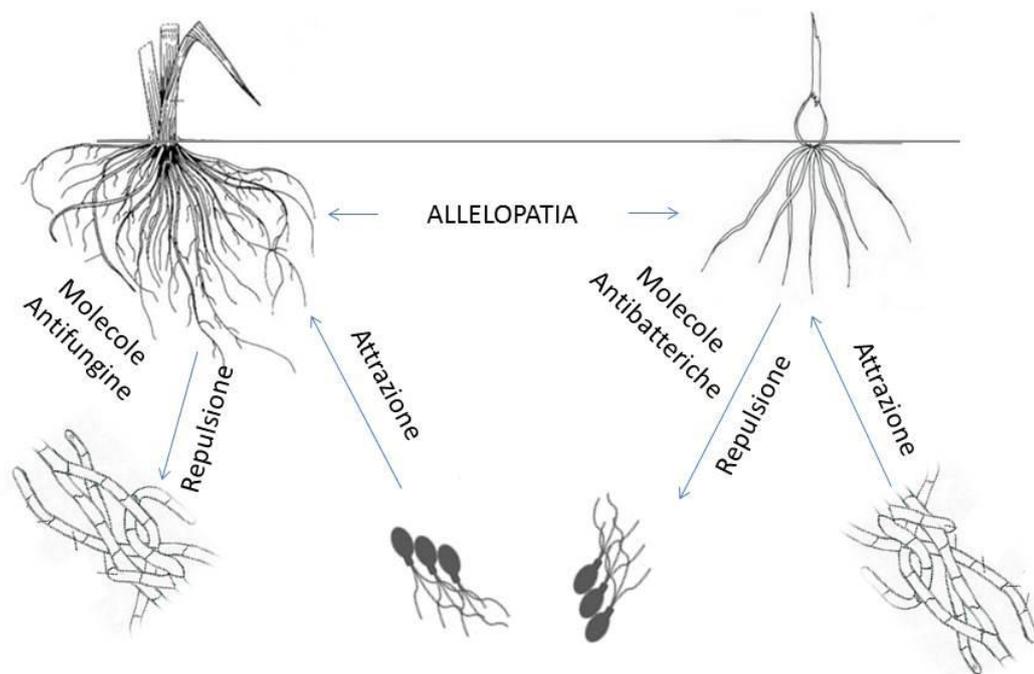


Figura 1. Rappresentazione delle interazioni nella rizosfera (pianta-pianta e pianta-microbioma). La secrezione di essudati radicali è un importante meccanismo attraverso il quale le piante comunicano tra loro e con il microbioma (es. allelopatia, attrazione o repulsione).

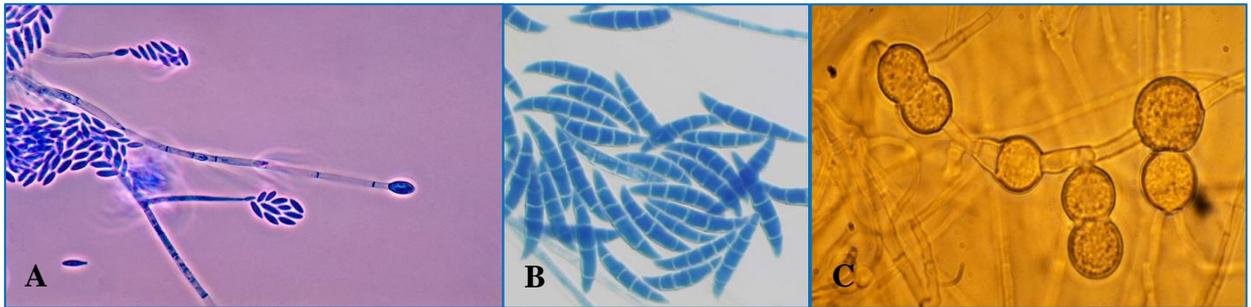


Figura 2. Tipologie conidiche prodotte dal genere *Fusarium*. (A) Microconidi. (B) Macroconidi. (C) Clamidospore

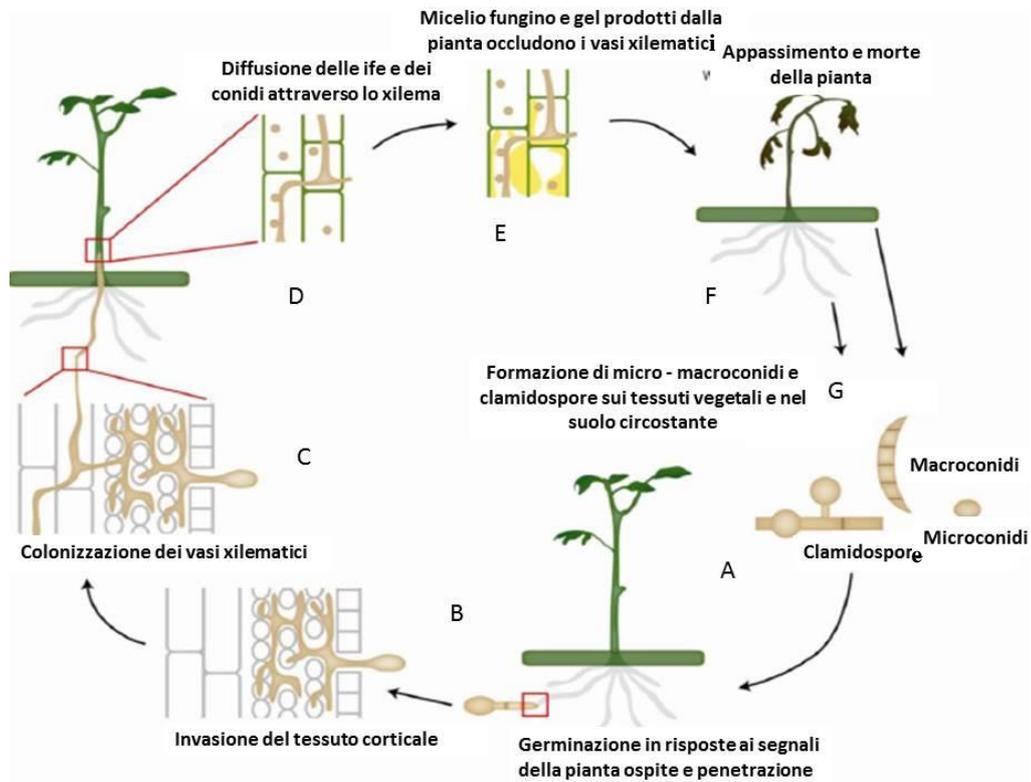


Figura 3. Ciclo biologico di *F. oxysporum*. (A) Germinazione dei conidi in risposta ai segnali dell'ospite e penetrazione diretta della radice. (B) Invasione dello strato corticale della radice. (C) Colonizzazione dei vasi xilematici. (D) Diffusione delle ife e dei conidi attraverso lo xilema. (E) Occlusione dei vasi xilematici. (F) Avvizzimento e morte della pianta. (G) Produzione dei conidi sui tessuti vegetali e nel suolo circostante.

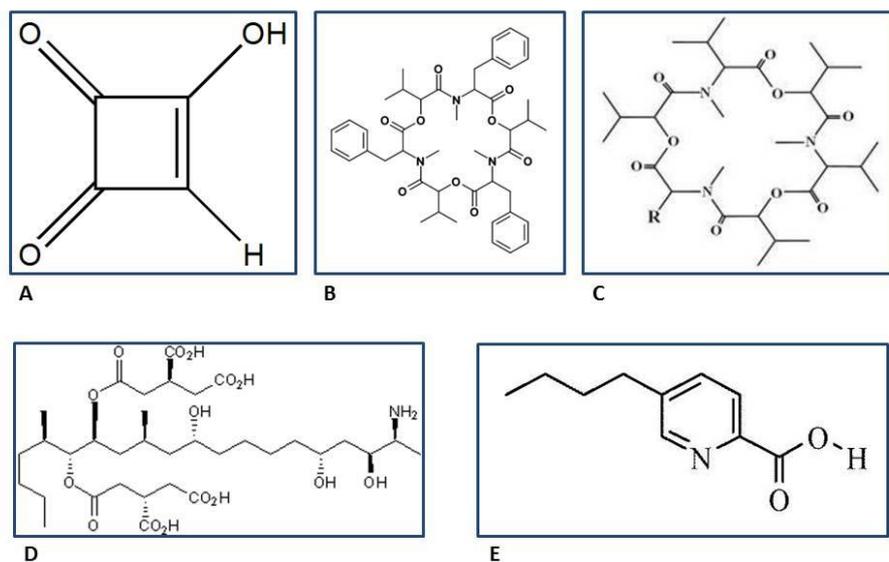


Figura 4. Strutture molecolari delle micotossine prodotte da *F. oxysporum*. (A) Moniliformina. (B) Beauvericina. (C) Enniatine. (D) Fumonisine. (E) Acido Fusarico.

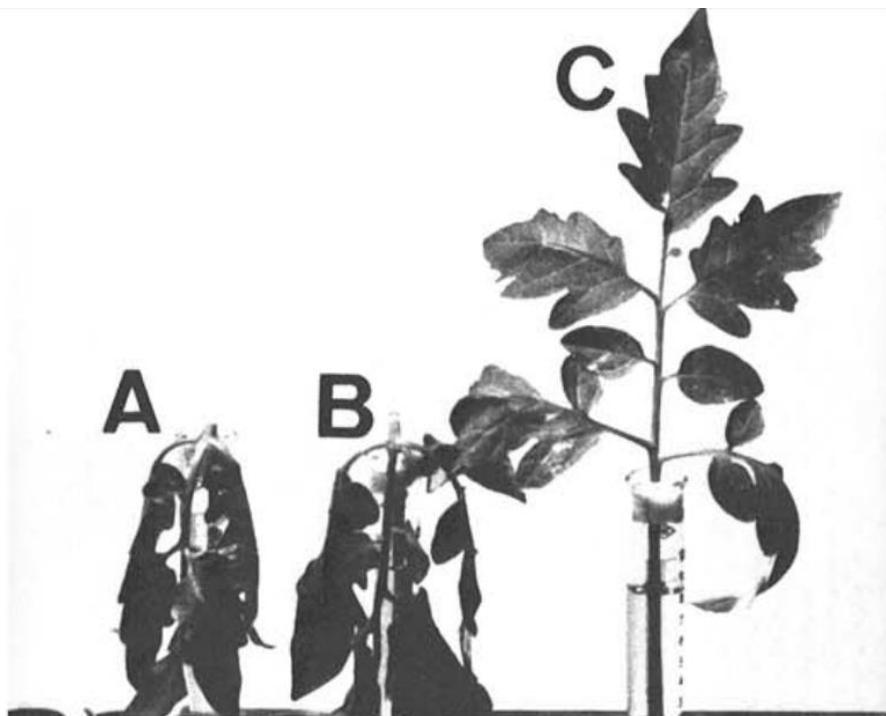


Figura 5. Effetto fitotossico dell'acido fusarico su foglie di pomodoro (A e B) e capacità detossificante di *Ralstonia solanacearum* (C) (Toyoda *et al.*, 1988).

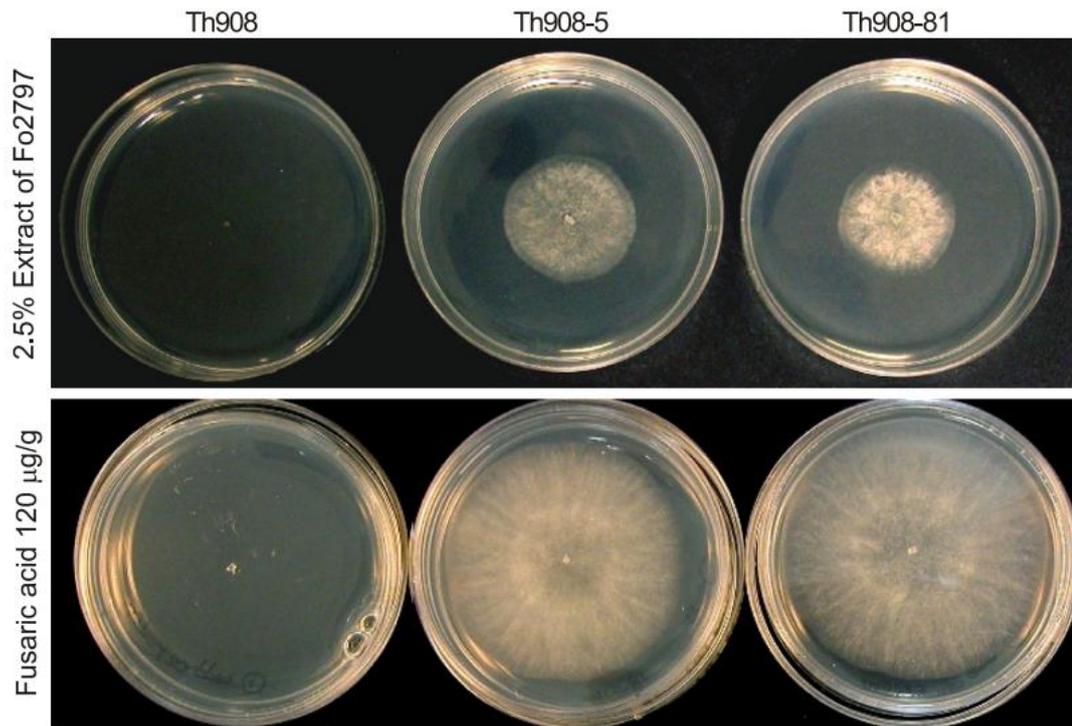


Figura 6. Effetto dell'acido fusarico sull'accrescimento radiale di *Trichoderma harzianum* ceppo wild type (Th908) e mutanti (Th908-5 e Th908-81) (Marzano *et al.*, 2013).



Figura 7. Distinti stadi della tracheofusariosi del pomodoro. Scala empirica, con cinque gradi di malattia, utilizzata nelle prove di patogenicità.

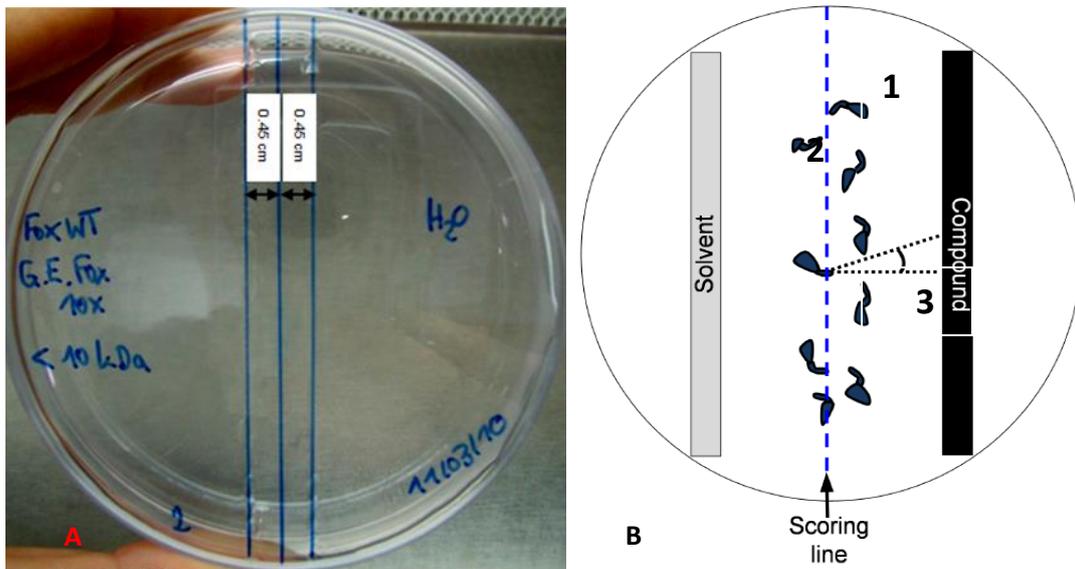


Figura 8. Immagine A: piastra Petri allestita per il saggio di chemiotropismo. Immagine B: rappresentazione schematica delle possibili alternative rinvenibili durante la lettura di un saggio di chemiotropismo: germinule con apice ifale proiettato verso: (1) il solvente; (2) il composto oggetto di saggio; (3) con andamento neutrale (Turrà *et al.*, 2015).

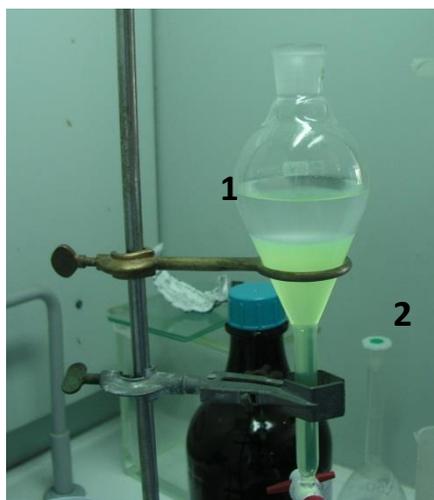


Figura 9. Estrazione in etilacetato del brodo di coltura del ceppo batterico CHA1242. Imbuto separatore dopo 30 minuti di sedimentazione, sono evidenti le due fasi: (1) etilacetato; (2) fase acquosa.

Gcd for + Kan term for **caaataggggttccgcgcac**TTCGTGTCTAAACTGATCCCAC
 Kan term for **GTTTATCCCAAGGCGG**

Gcd rev + Kan prom rev **gagcgtcagaccccgtagaa**AGAAGCGTAGCCCATGTTGCG

Figura 10. Complementarietà tra i primer utilizzati per amplificare le regioni 5' e 3' del gene Gcd con i primer utilizzati per amplificare la cassetta di resistenza alla kanamicina.

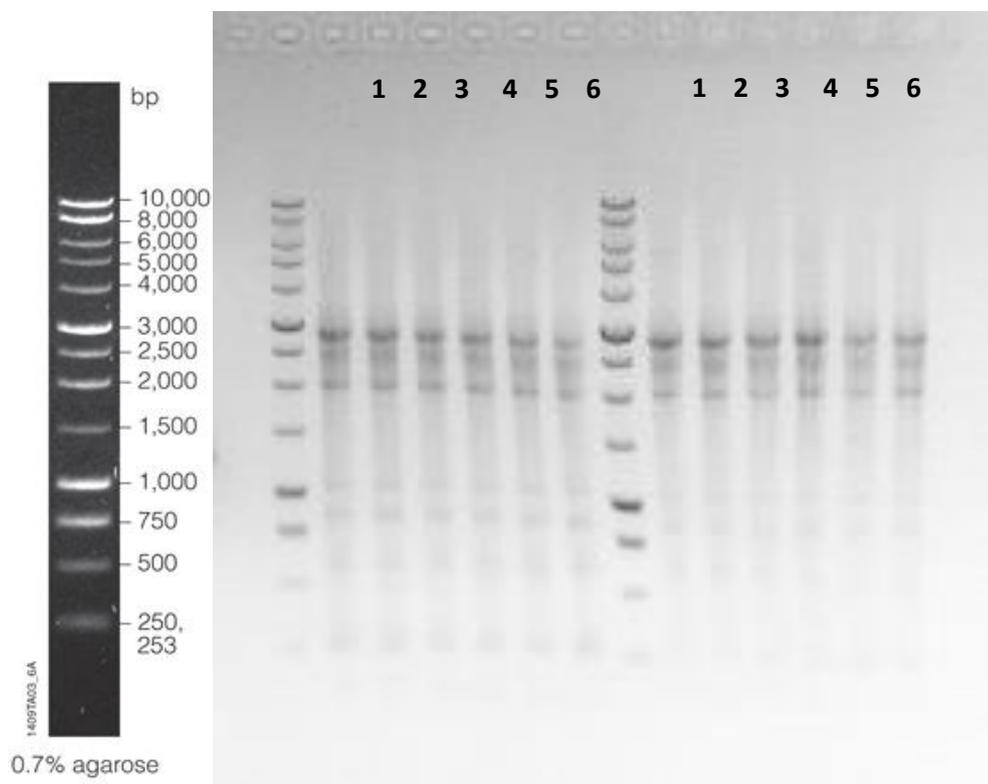


Figura 11. Corsa elettroforetica della PCR di fusione eseguita in *Temperature Gradient Protocol* $\Delta 6$ (1= 60,5 °C; 2= 61,3 °C; 3= 62,3 °C; 4=63,1 °C; 5=64,3 °C; 6= 65,5 °C). Dal gel di elettroforesi sono evidenti gli ampliconi aspecifici derivanti da assemblaggi alternativi dei 3 DNA stampo durante la reazione PCR. DNA ladder 1Kb Promega.

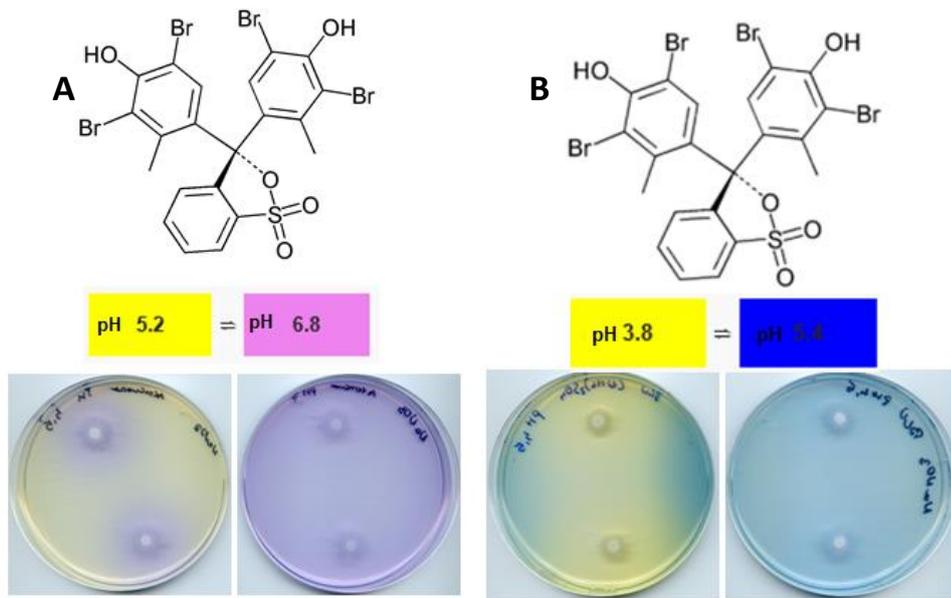


Figura 12. Indicatori di pH *Bromocresol purple* (A) e *Bromocresol green* (B). Nell'immagine è riportata la struttura molecolare, il pH di viraggio colorimetrico e il colore reale in piastra Petri inglobati in substrato agarizzato.

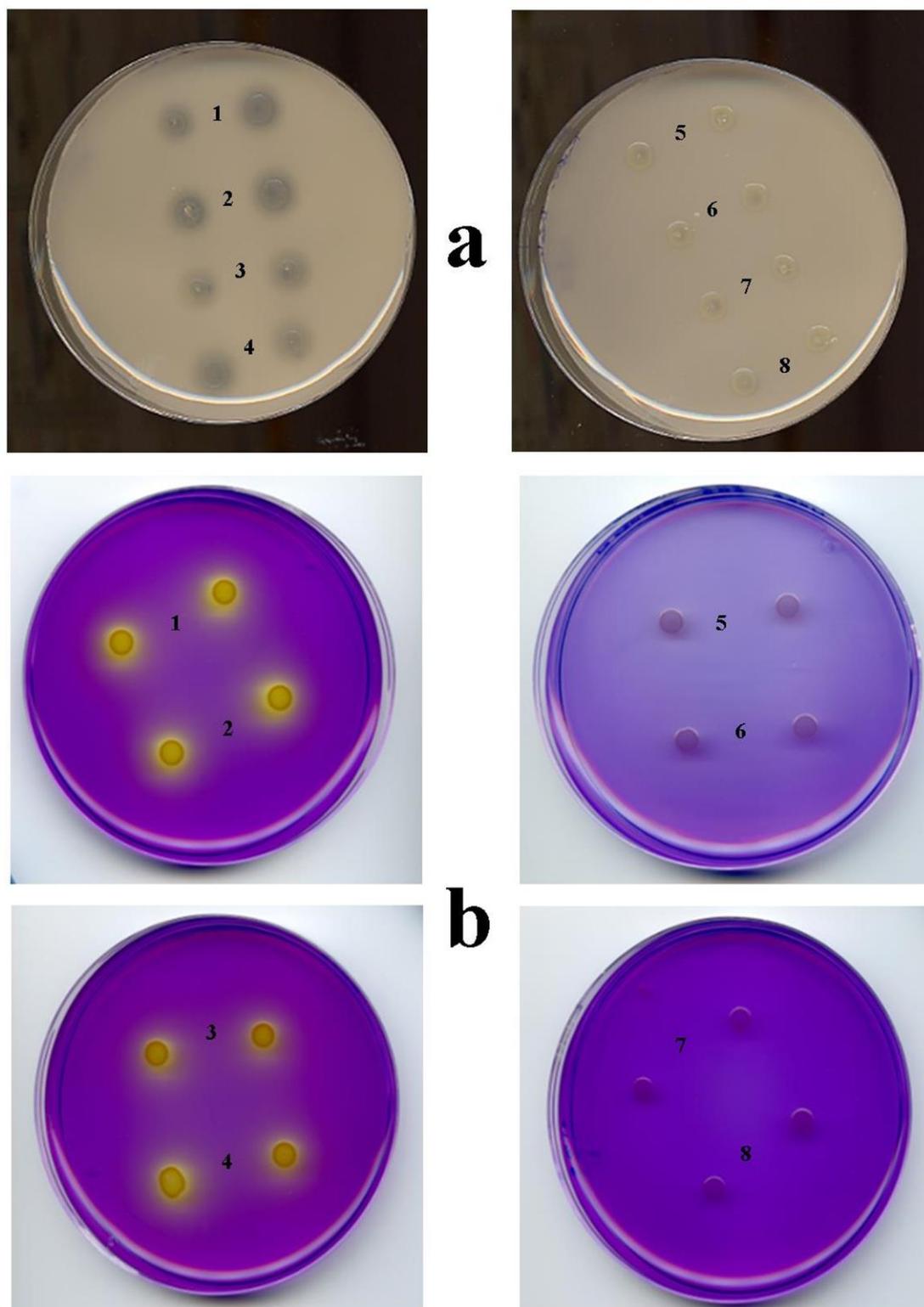


Figura 13. Fenotipo dei ceppi *wild type* e mutanti di *P. fluorescens* su substrato agarizzato NBRIP (A) e in presenza di *Bromocresol purple* (B). I ceppi batterici riportati nelle immagini sono: 1) CHA0; 2) CHA661; 3) CHA1241; 4) CHA1197; 5) CHA1196; 6) CHA1198; 7) CHA1242; 8) CHA1244.

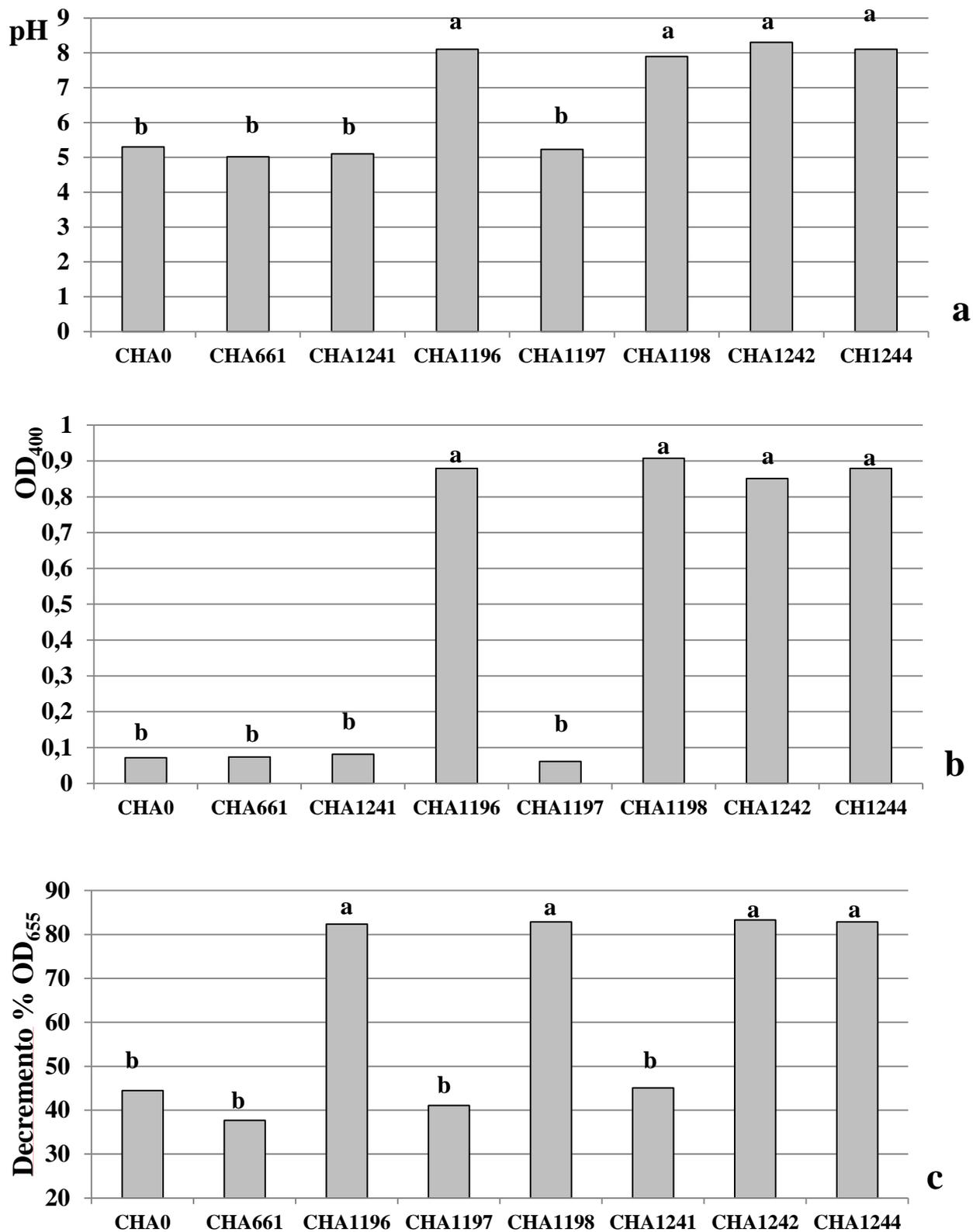
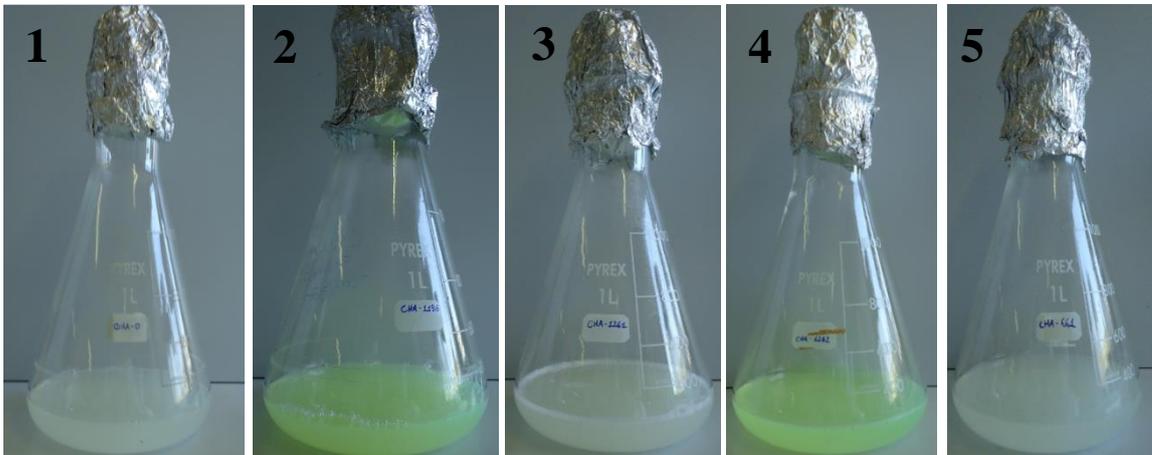


Figura 14. Caratterizzazione del brodo culturale dei ceppi *wild type* e mutanti di *P. fluorescens* CHA0. Le rappresentazioni grafiche riportano (A) i valori medi di pH; (B) la OD₄₀₀; (C) la capacità chelante del brodo di coltura batterico dopo 72 ore d'incubazione in MMU. A lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$ (Tukey's test).

A



B

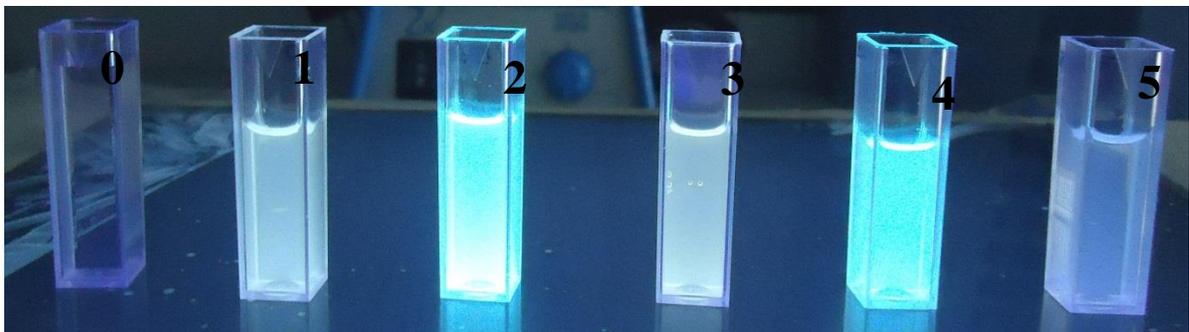


Figura 15. Differenti pigmentazione del brodo di coltura dei ceppi di *P. fluorescens* dopo 72 ore di incubazione (A) e la differente fluorescenza degli stessi alla luce UV (B). Nelle immagini sono riportati i brodi colturali di alcuni dei ceppi batterici caratterizzati, tra cui CHA0 (1), CHA1196 (2), CHA661 (3), CHA1242 (4), CHA1197 (5). Nell'immagine B in posizione 0 una cuvette con acqua distillata.

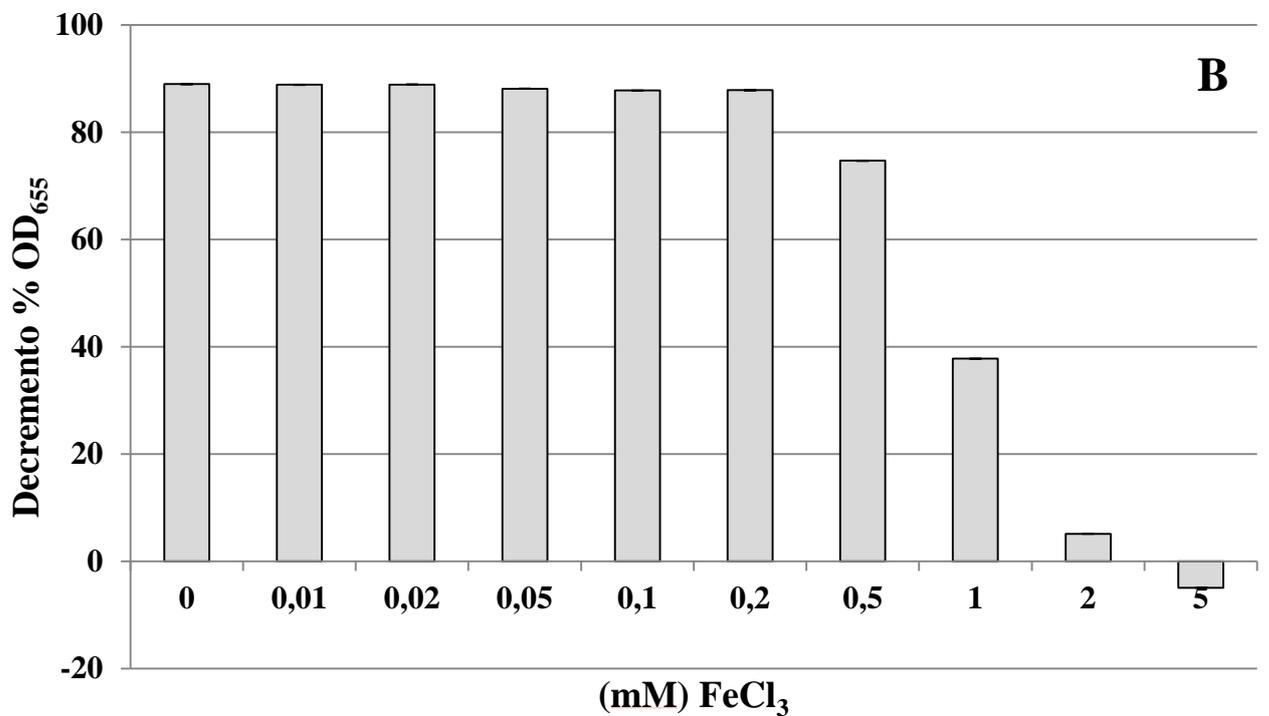
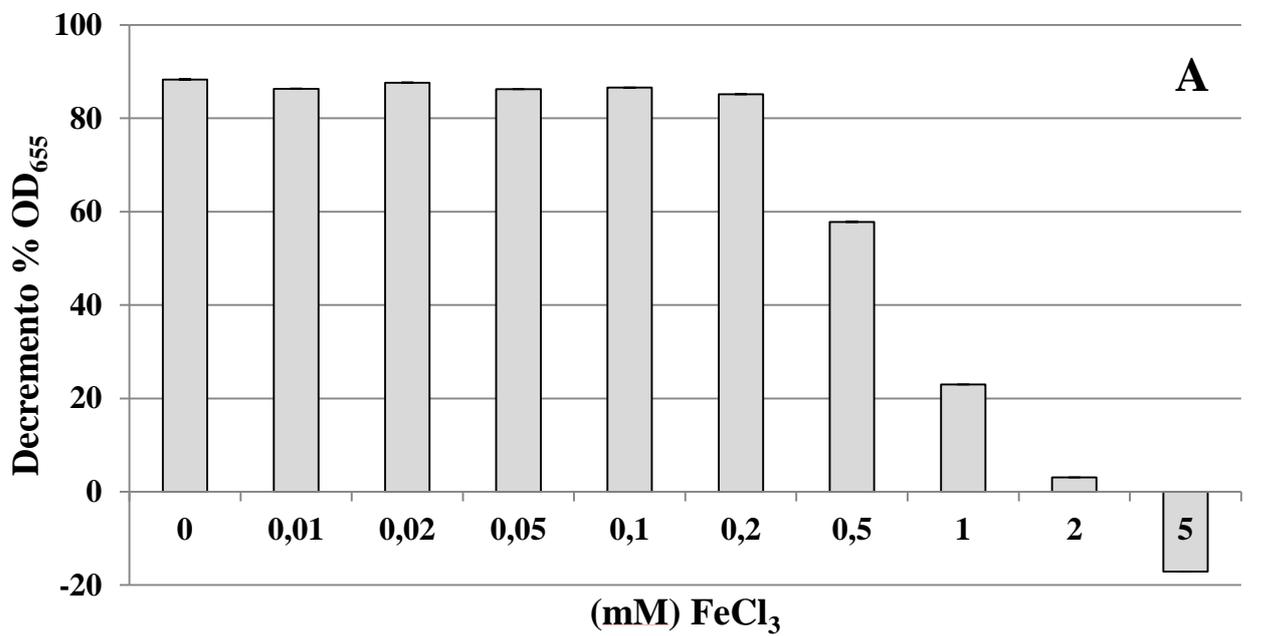


Figura 16. Capacità chelante del brodo di coltura dei ceppi batterici CHA1196 (A) e CHA1242 (B) trattato con concentrazioni crescenti di FeCl₃.

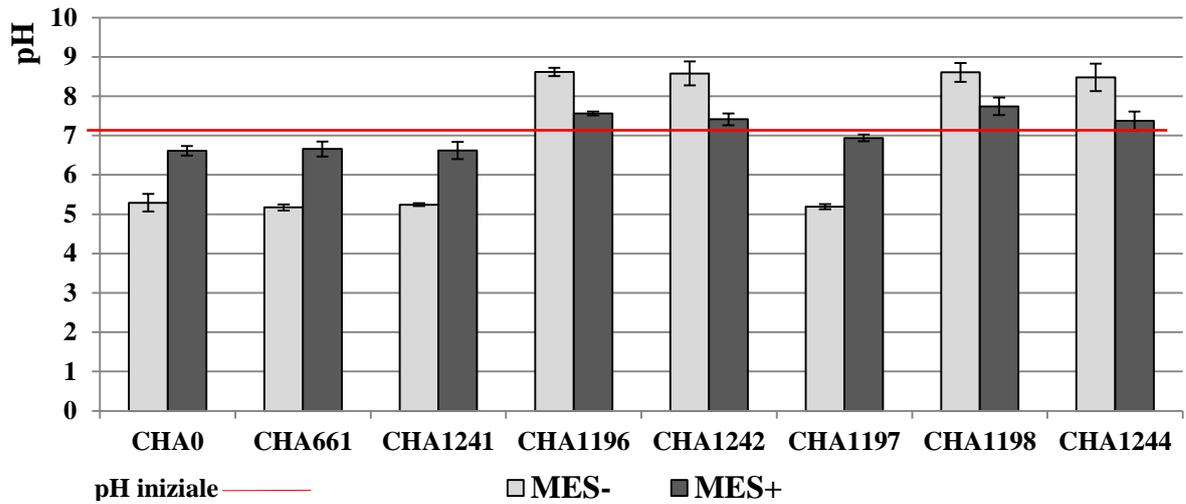


Figura 17a. pH del brodo culturale dei ceppi di *P. fluorescens* dopo 72 ore d'incubazione in MMU con o senza MES a pH 7. Le barre indicano la deviazione standard dalla media utilizzando 3 repliche per trattamento.

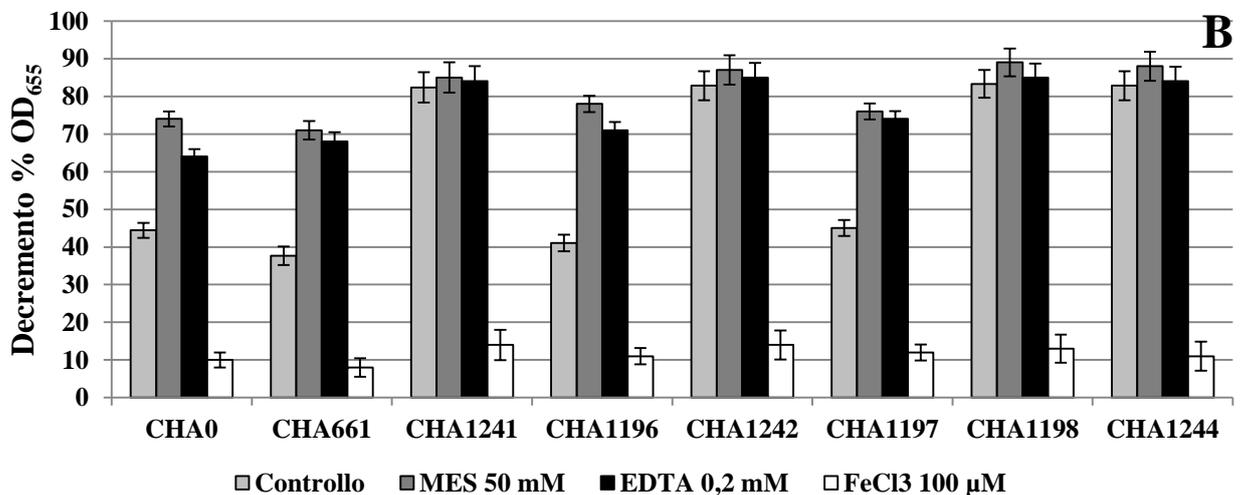
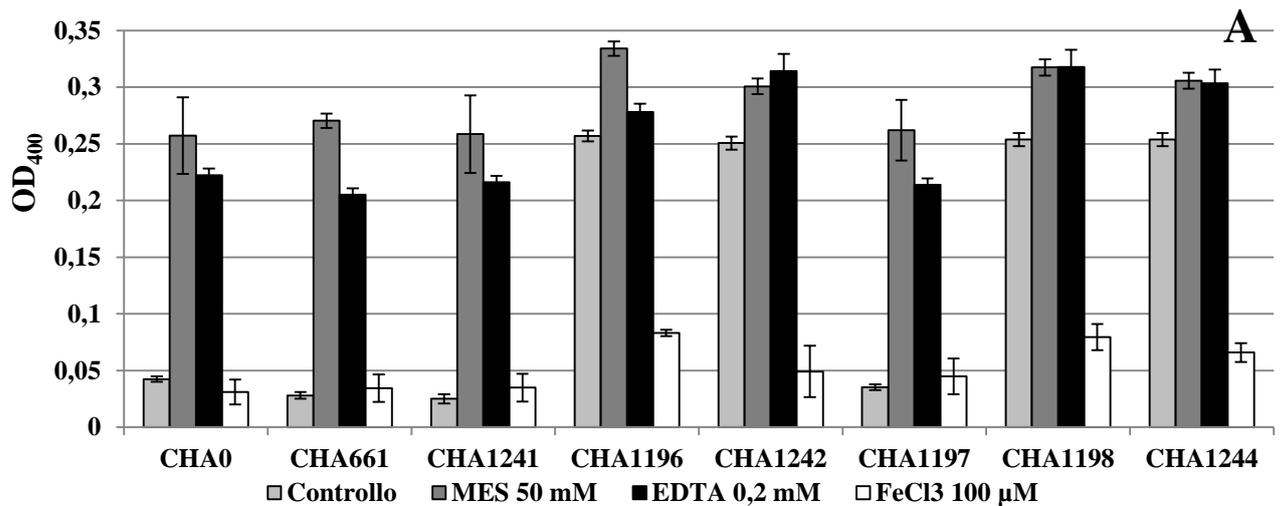


Figura 17b. Alterazione nella produzione di pigmenti fluorescenti (A) e nella capacità chelante (B) in presenza di MES 50 mM pH 7, EDTA 0,2 mM e FeCl₃ 100 μM. Le barre indicano la deviazione standard dalla media utilizzando 3 repliche per trattamento.

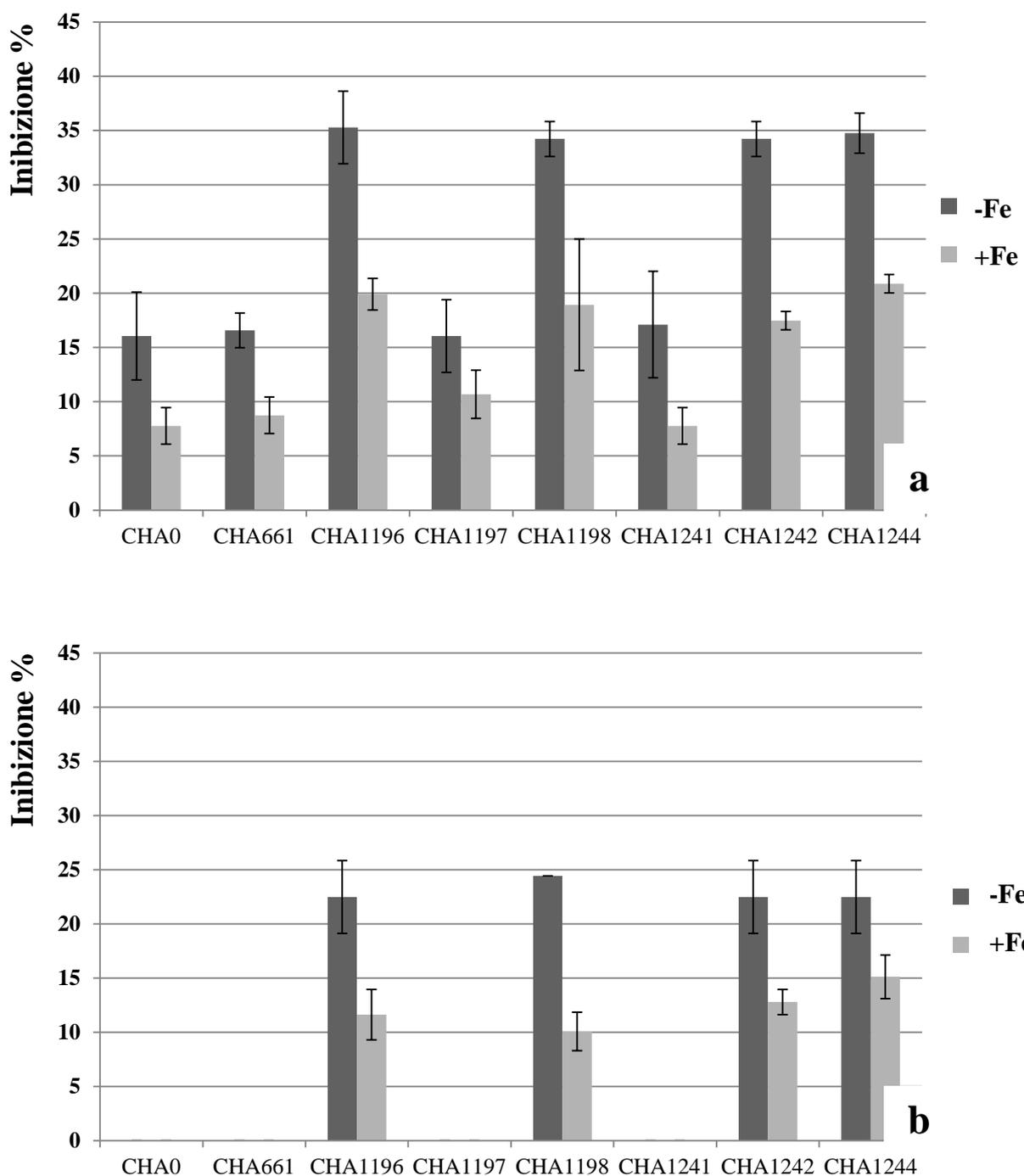


Figura 18.1. Attività antagonistica dei ceppi *wild type* e mutanti di *P. fluorescens* nei confronti di *F. oxysporum f.sp. lycopersici* ceppo *wild type* dopo 5 (a) e 10 (b) giorni di incubazione su MMU agarizzato arricchito (+Fe) o meno (-Fe) di FeCl₃ 5mM. Le barre indicano la deviazione standard dalla media utilizzando 3 repliche per trattamento.

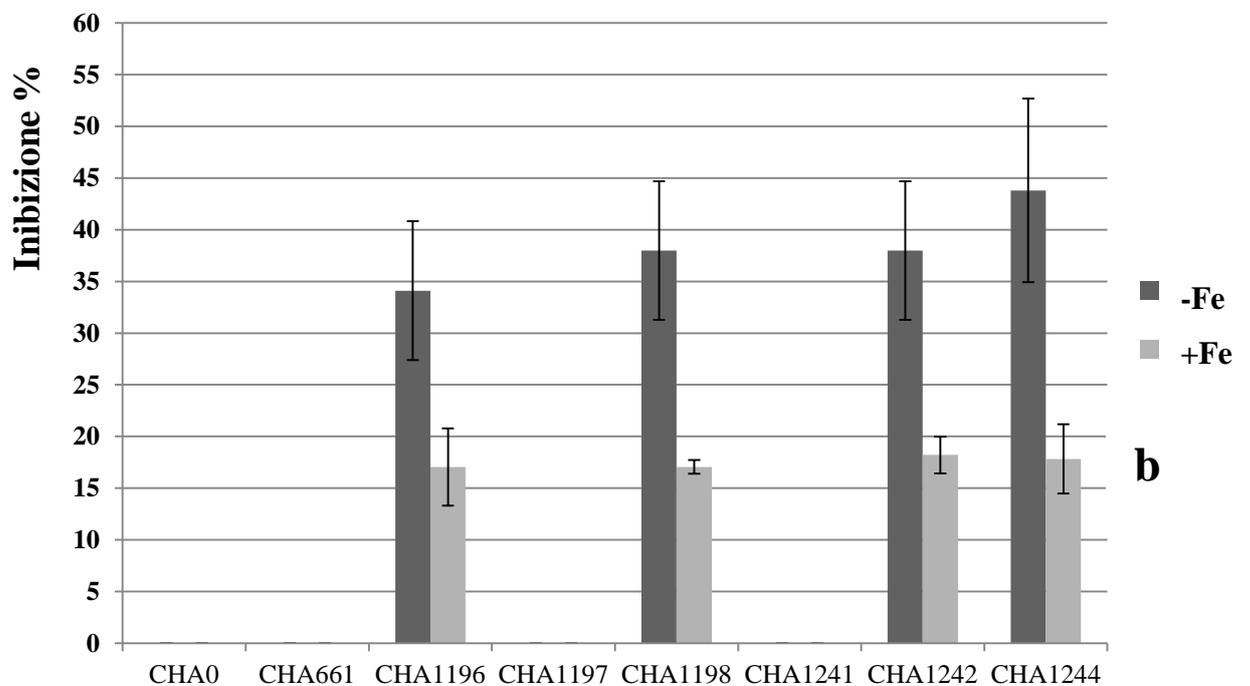
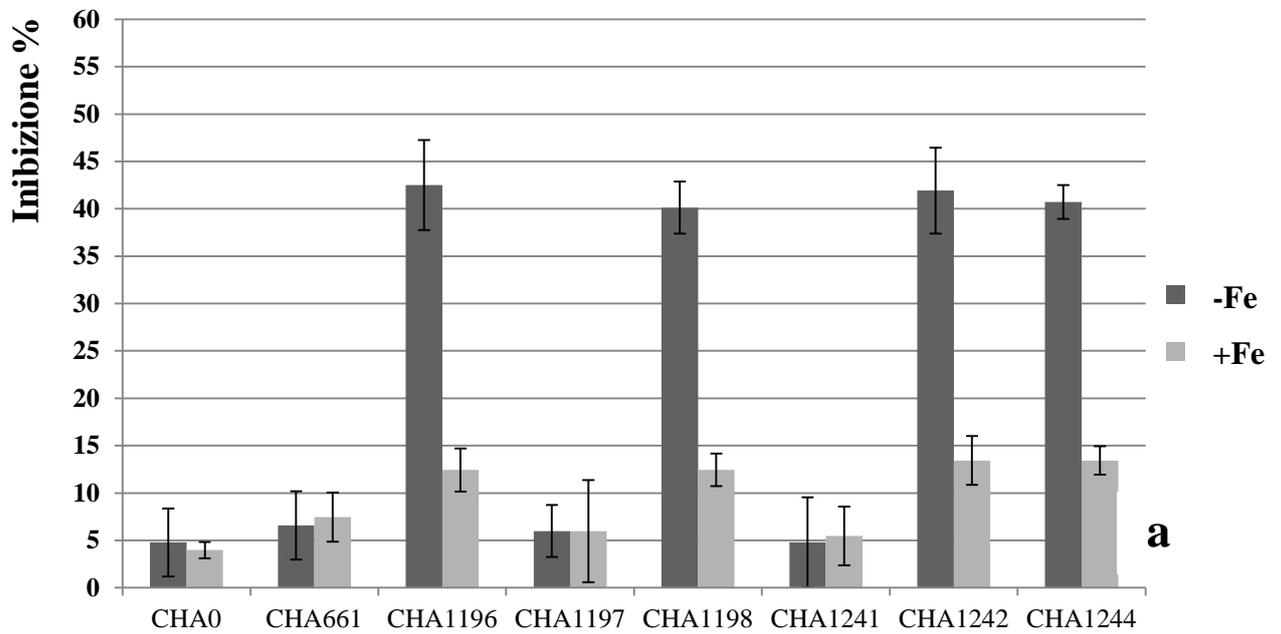


Figura 18.2. Attività antagonistica dei ceppi *wild type* e mutanti di *P. fluorescens* nei confronti di *F. oxysporum f.sp. lycopersici* ceppo $\Delta hapX$ dopo 5 (a) e 10 (b) giorni di incubazione su MMU agarizzato arricchito (+Fe) o meno (-Fe) di $FeCl_3$ 5mM. Le barre indicano la deviazione standard dalla media utilizzando 3 repliche per trattamento.

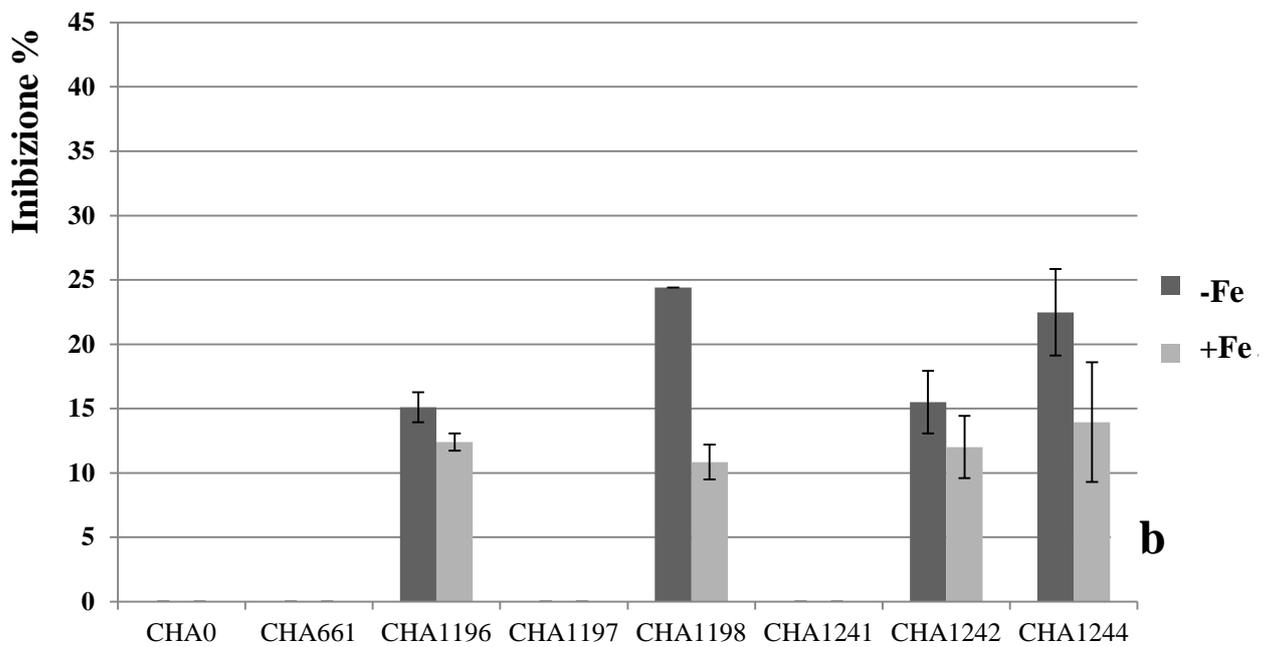
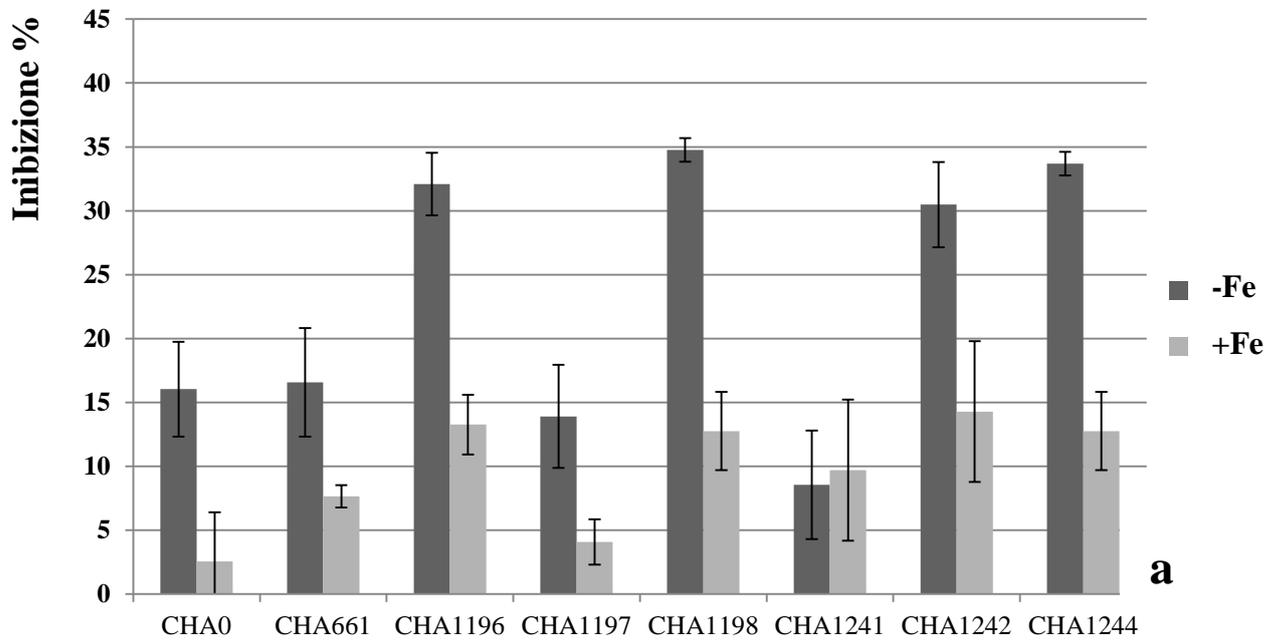


Figura 18.3. Attività antagonistica dei ceppi *wild type* e mutanti di *P. fluorescens* nei confronti di *F. oxysporum f.sp. lycopersici* ceppo Δhog dopo 5 (a) e 10 (b) giorni di incubazione su MMU agarizzato arricchito (+Fe) o meno (-Fe) di $FeCl_3$, 5mM. Le barre indicano la deviazione standard dalla media utilizzando 3 repliche per trattamento.

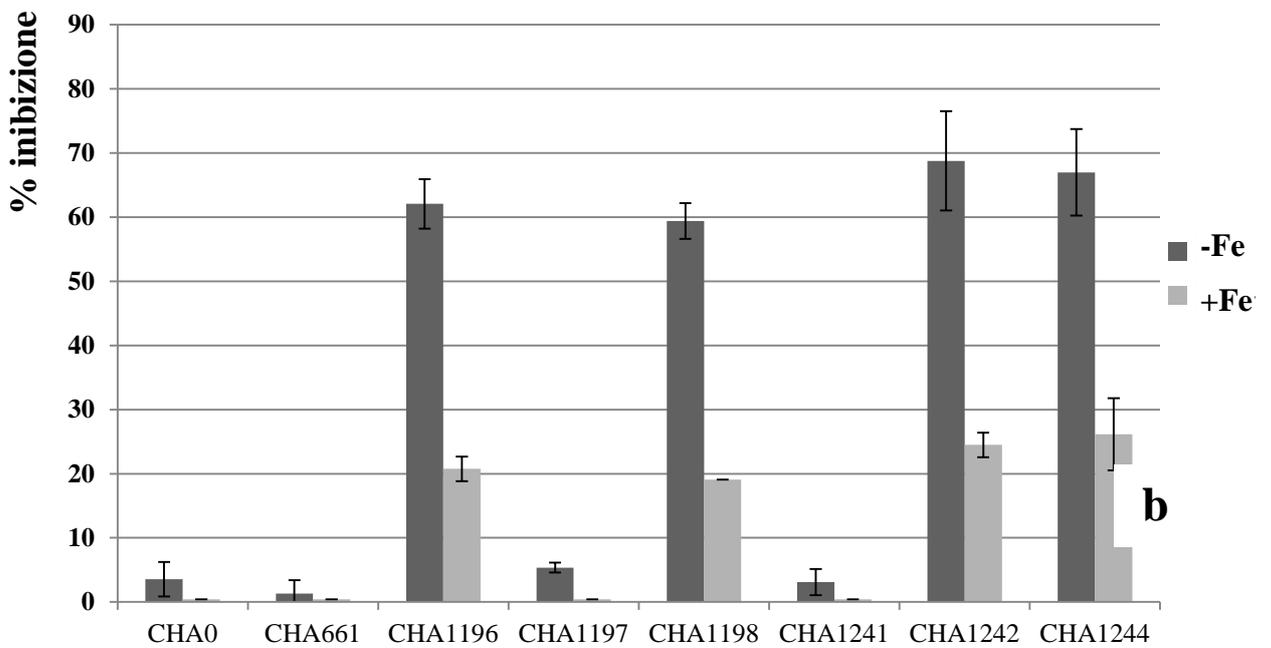
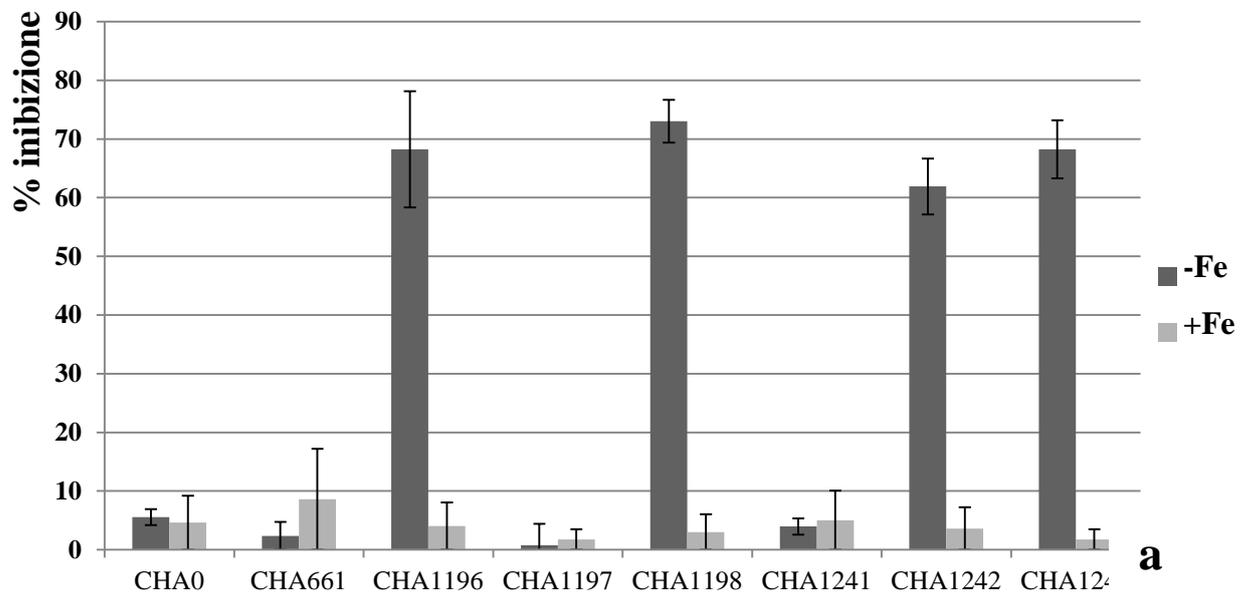


Figura 18.4. Attività antagonistica dei ceppi *wild type* e mutanti di *P. fluorescens* nei confronti di *F. oxysporum f.sp. lycopersici* ceppo $\Delta mpk1$ dopo 5 (a) e 10 (b) giorni di incubazione su MMU agarizzato arricchito (+Fe) o meno (-Fe) di $FeCl_3$ 5mM. Le barre indicano la deviazione standard dalla media utilizzando 3 repliche per trattamento.

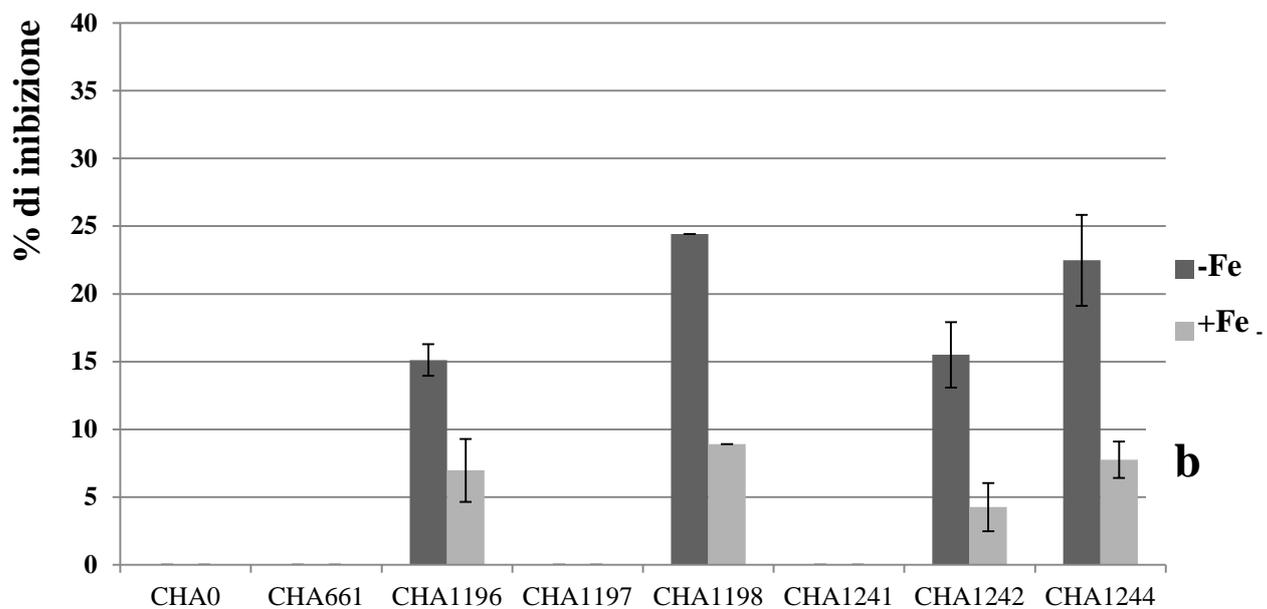
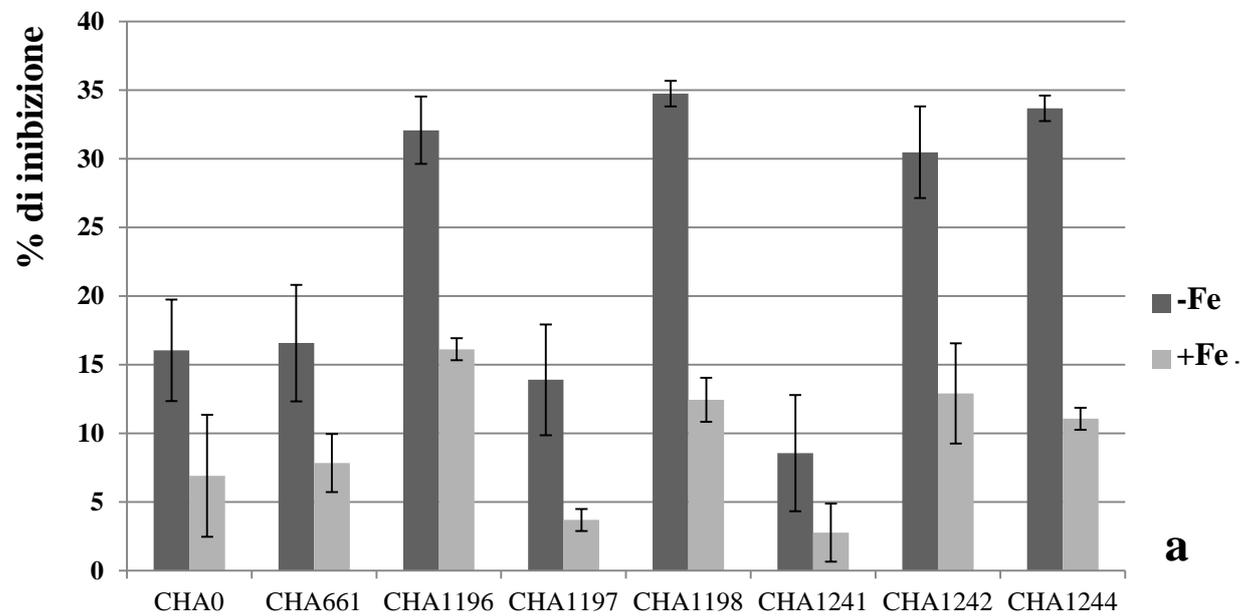


Figura 18.5. Attività antagonistica dei ceppi *wild type* e mutanti di *P. fluorescens* nei confronti di *F. oxysporum f.sp. lycopersici* ceppo $\Delta fmk1$ dopo 5 (a) e 10 (b) giorni di incubazione su MMU agarizzato arricchito (+Fe) o meno (-Fe) di $FeCl_3$ 5mM. Le barre indicano la deviazione standard dalla media utilizzando 3 repliche per trattamento.

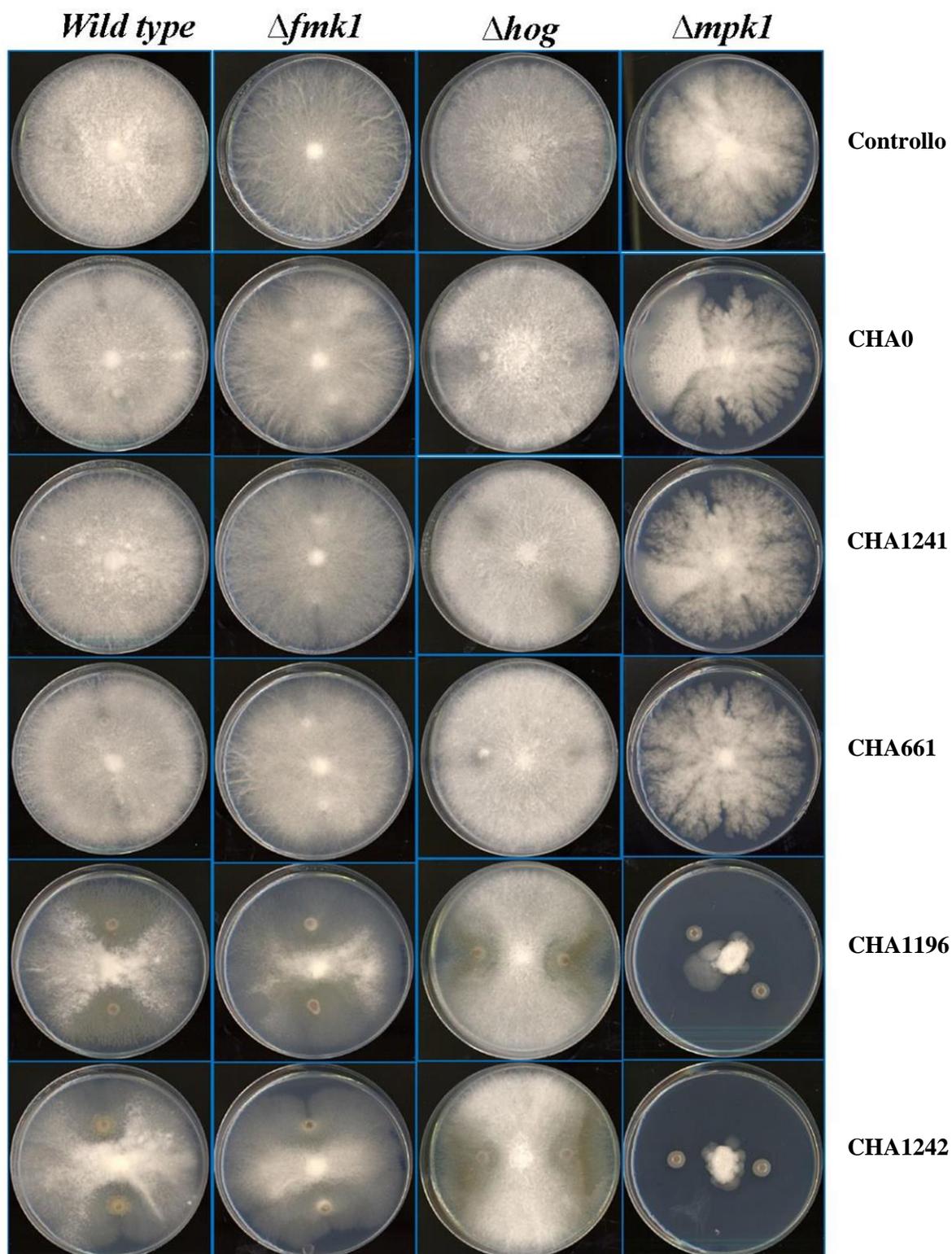


Figura 19. Coltura duale tra i ceppi *wild type* ed i mutanti MAPK di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* con i ceppi *wild type* e mutanti di *P. fluorescens* dopo 10 giorni di incubazione. Nell'immagine sono riportate alcune delle combinazioni saggiate.

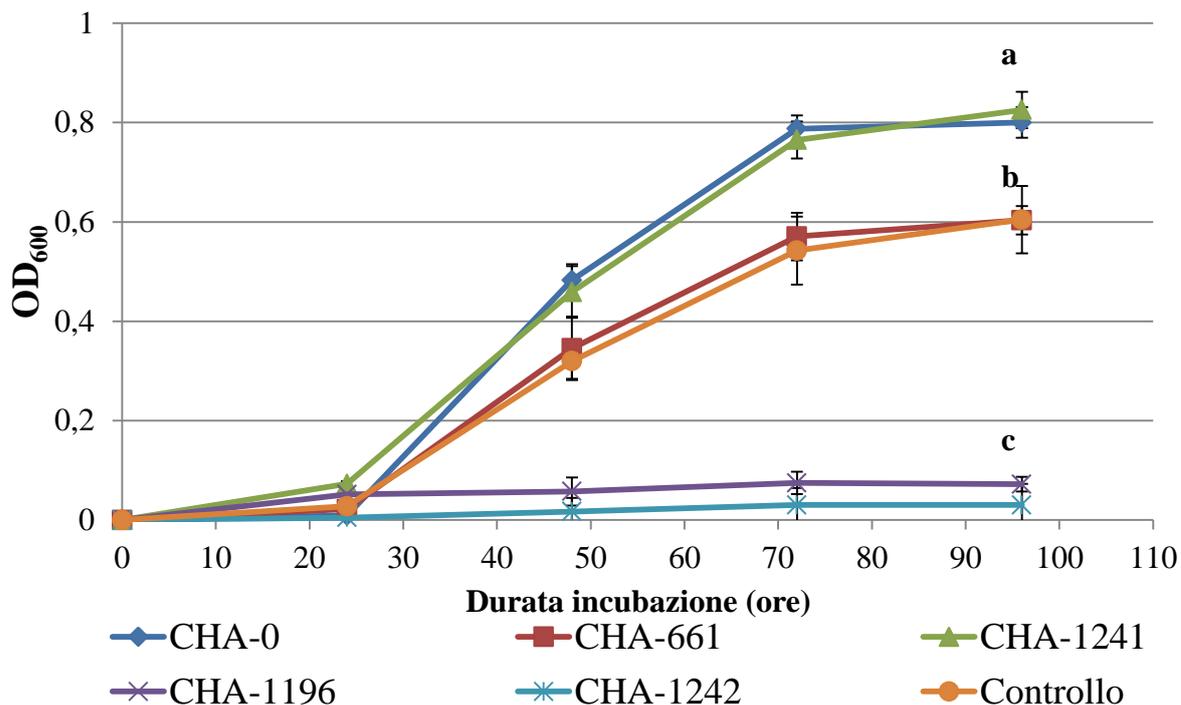


Figura 20. Prova di inibizione in liquido di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ceppo *wild type* in presenza del brodo di coltura batterico filtro-sterilizzato. A lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$ (Tukey's test).

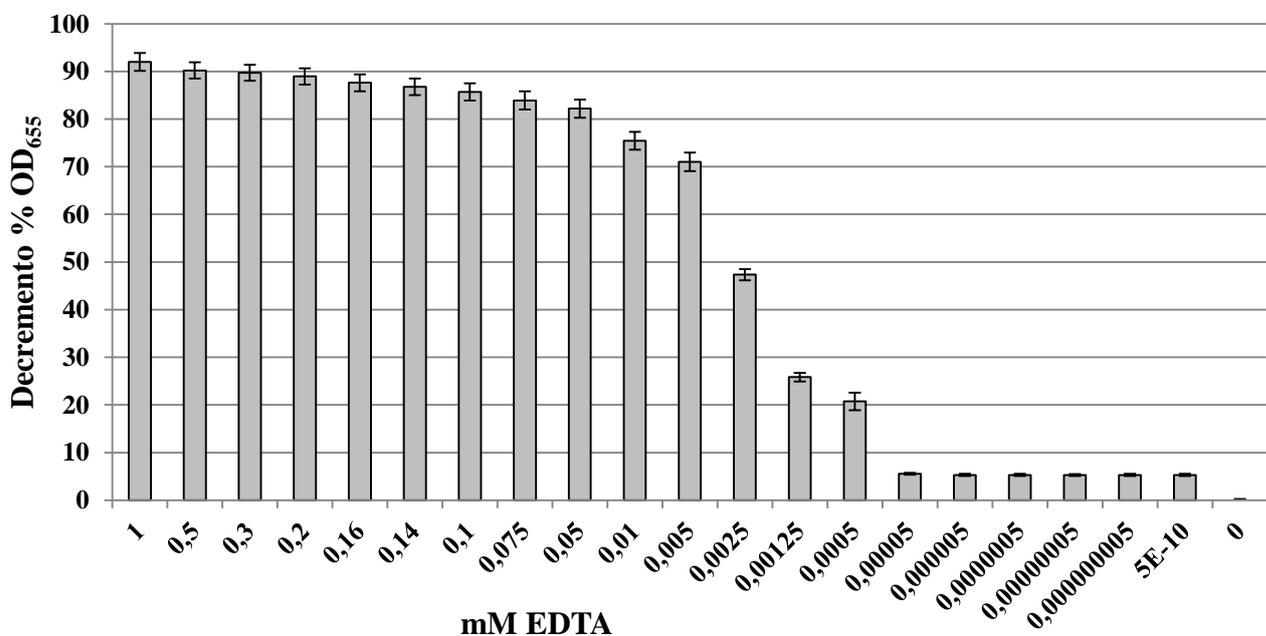


Figura 21. Capacità chelante di soluzioni di EDTA a concentrazione crescente.

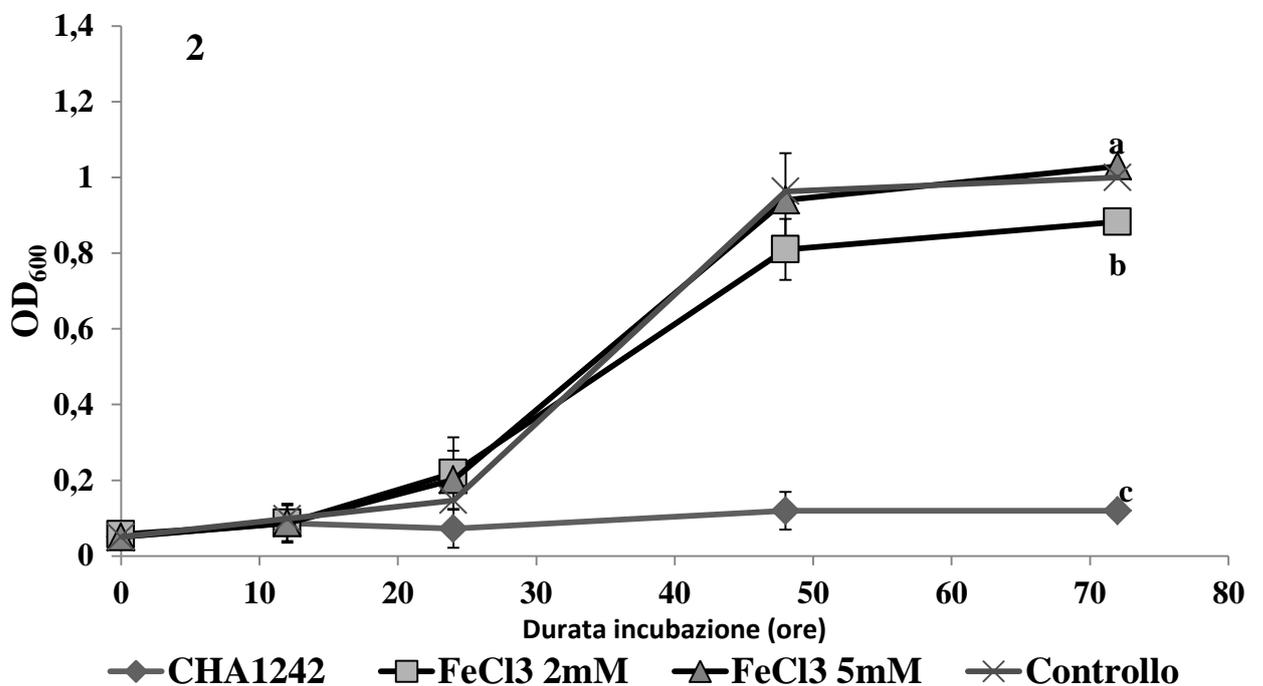
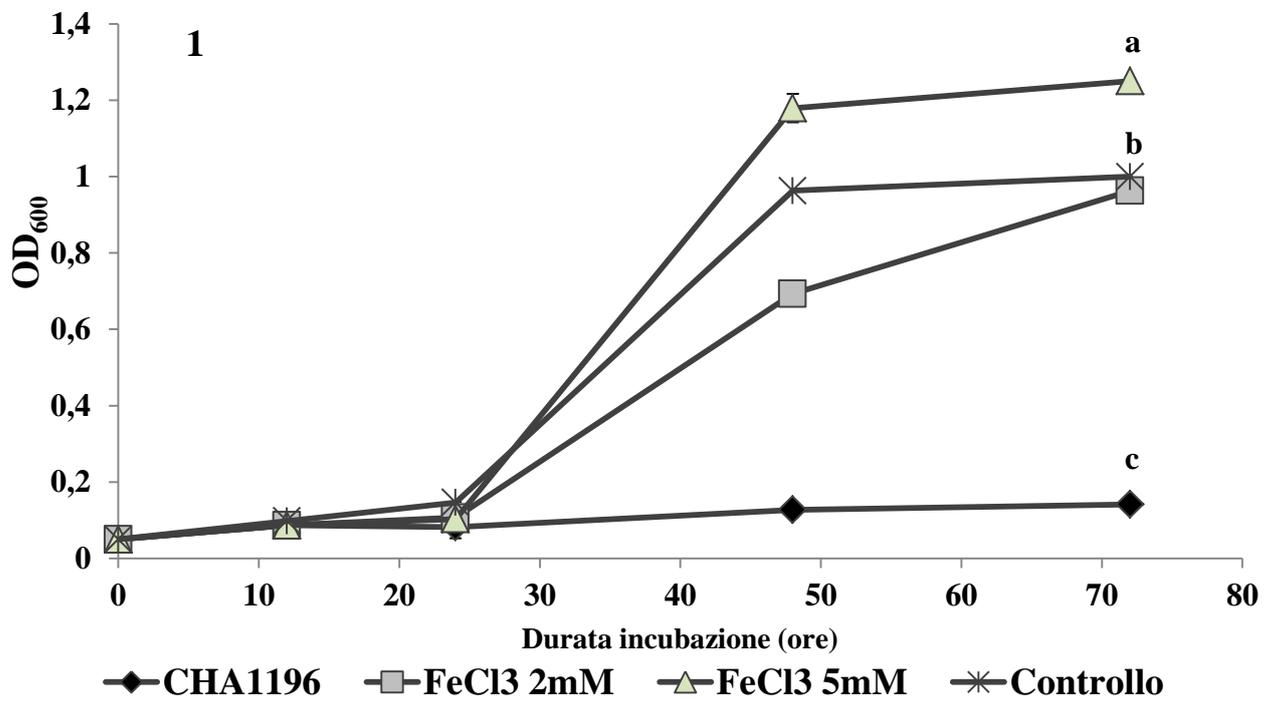


Figura 22. Attività inibente del brodo di coltura batterico dei ceppi CHA1196 (1) e CHA1242 (2) nei confronti di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, in presenza di FeCl₃. A lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$ (Tukey's test).

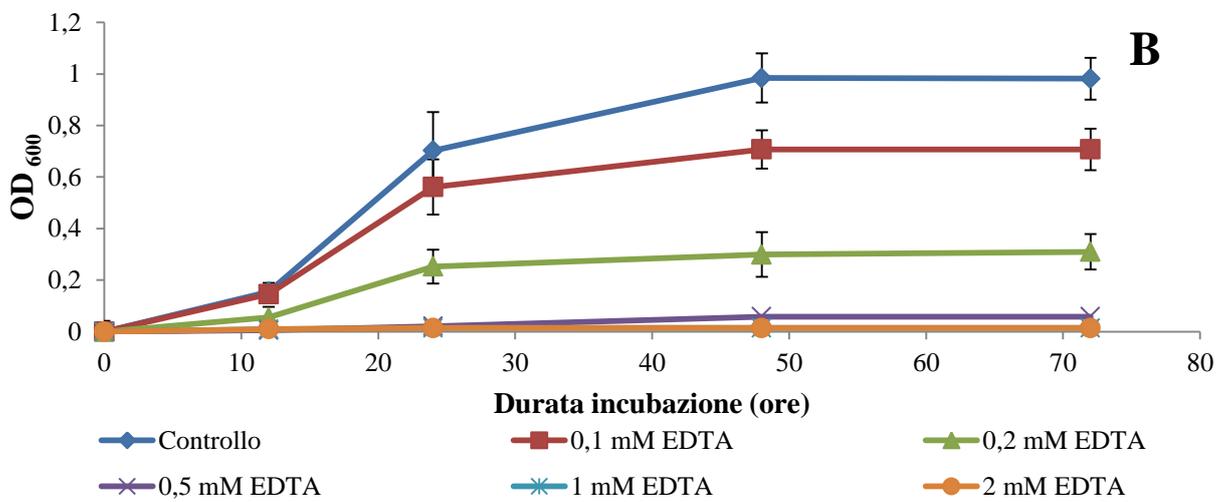
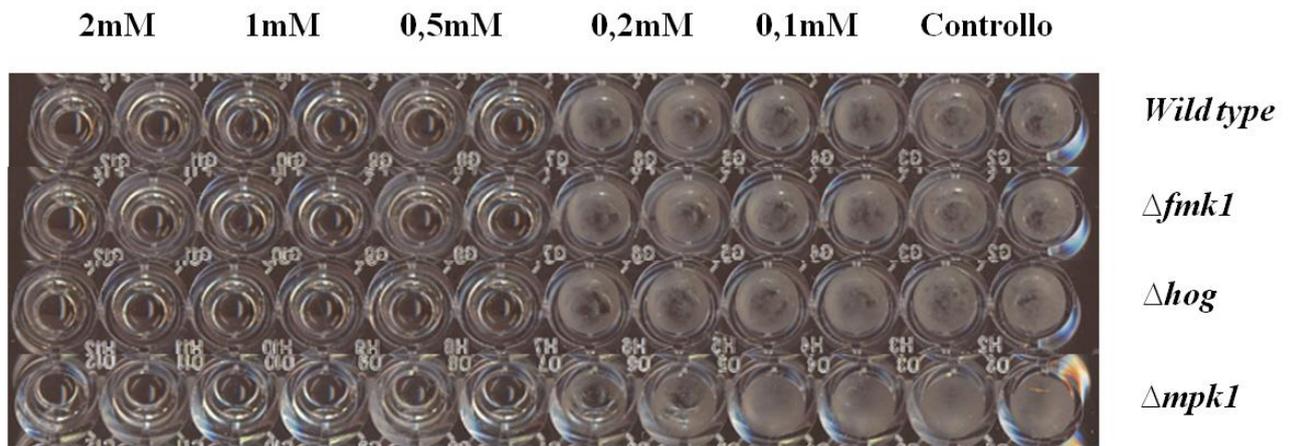


Figura 23. Crescita di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ceppo *wild type* (A e B) e dei mutanti MAPK (A) in presenza di EDTA. Le barre indicano la deviazione standard dalla media utilizzando 8 repliche per trattamento.

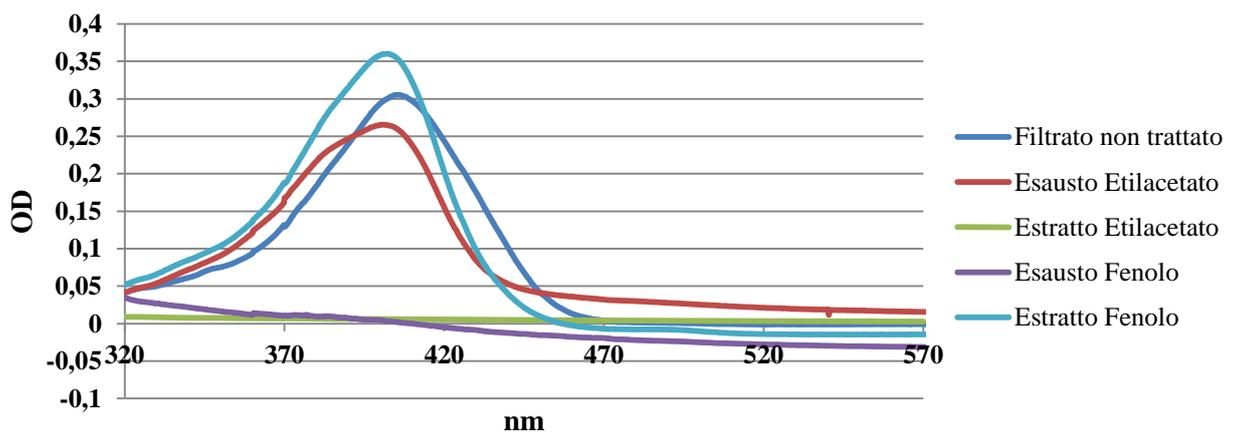


Figura 24. Spettro d'assorbanza del brodo di coltura del ceppo CHA1242 tal quale e degli estratti ed esausti in fenolo ed etilacetato.

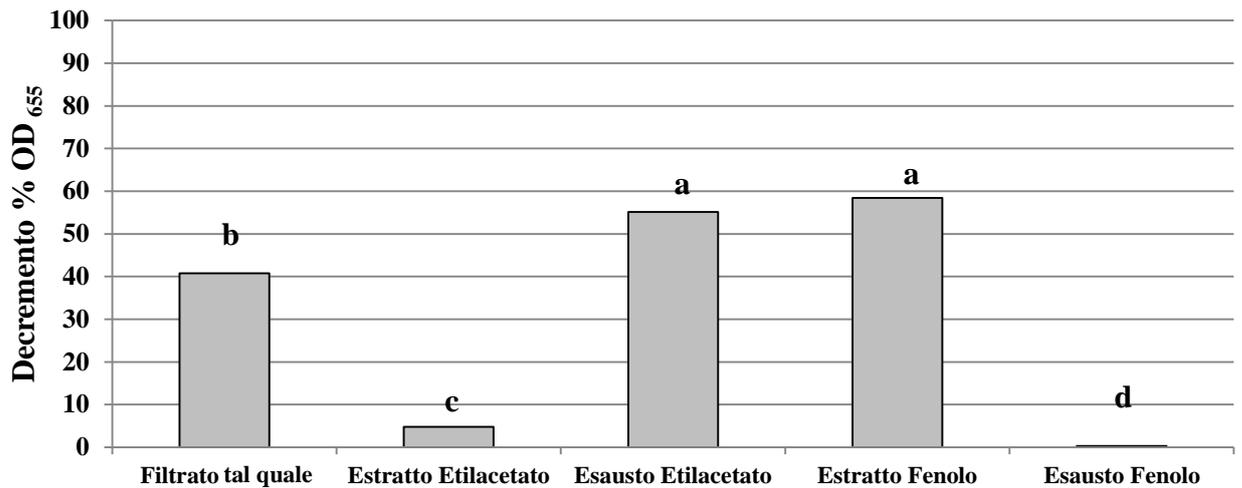


Figura 25. Capacità chelante del filtrato culturale del ceppo CHA1242 tal quale e delle fasi estratte ed esauste in fenolo ed etilacetato. A lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$ (Tukey's test).

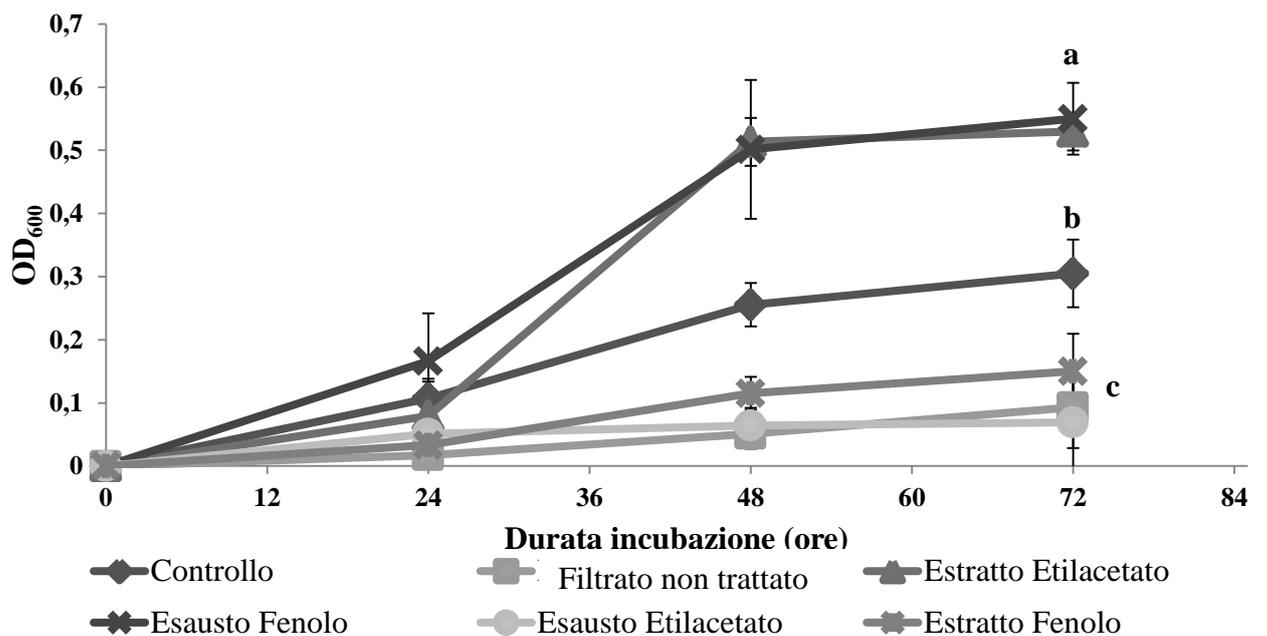


Figura 26. Crescita di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* in presenza del filtrato culturale del ceppo CHA1242 tal quale o degli estratti ed esausti in fenolo ed etilacetato. A lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$ (Tukey's test).

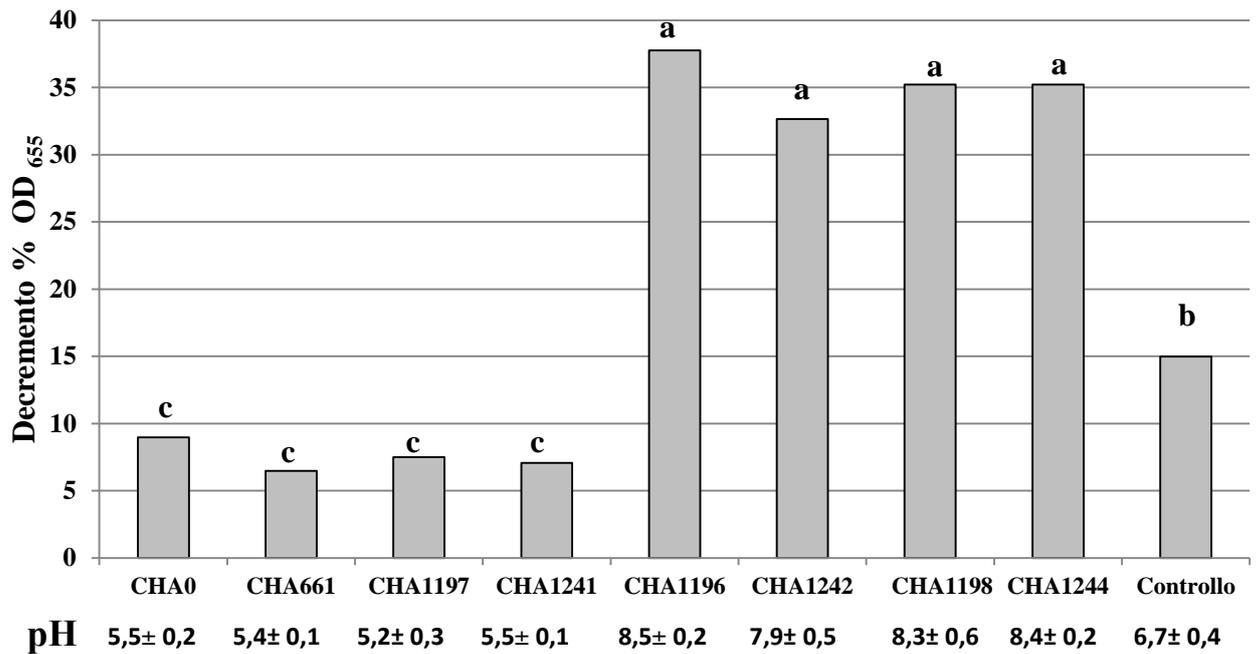


Figura 27. pH e capacità chelante degli essudati radicali prodotti in presenza dei ceppi *wild type* e mutanti di *P. fluorescens*. A lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$ (Tukey's test).

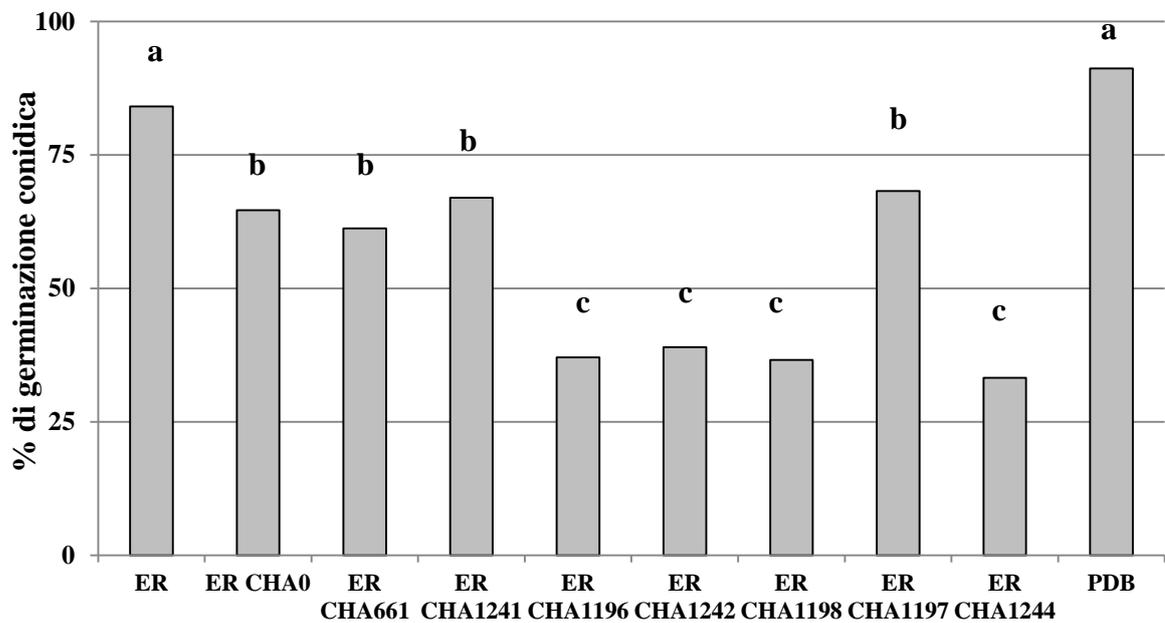


Figura 28. Percentuale di germinazione conidica negli essudati radicali prodotti presenta dei ceppi *wild type* e mutanti di *P. fluorescens*, rispetto alla germinazione conidica negli essudati prodotti da piante non batterizzate e in PDB (ER= essudato radicale). A lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$ (Tukey's test).

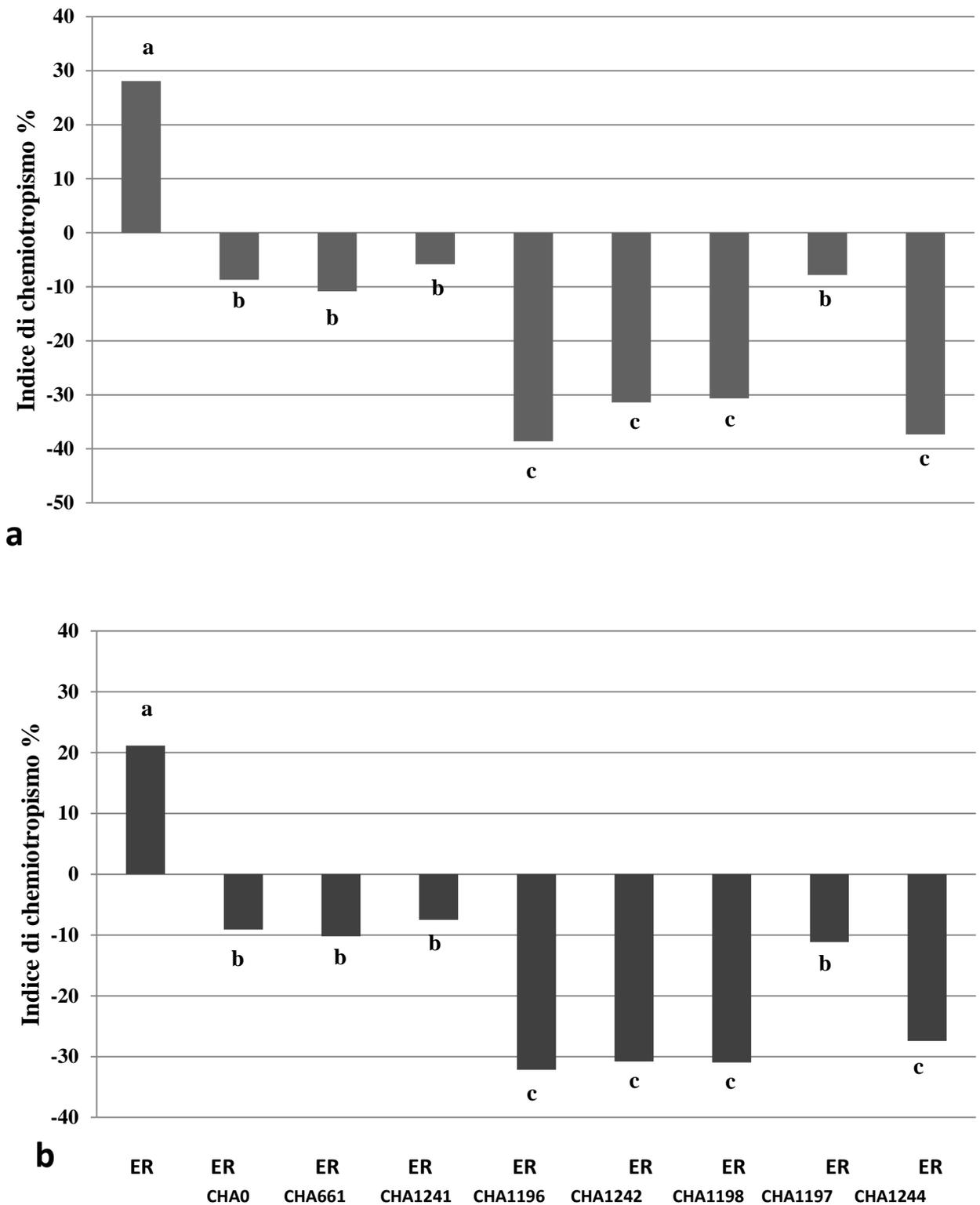


Figura 29. Indice di chemiotropismo dei ceppi *wild type* (a) e $\Delta fmk1$ (b) di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* nei confronti degli essudati radicali prodotti da piante batterizzate e non (ER= essudato radicale). A lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$ (Tukey's test).

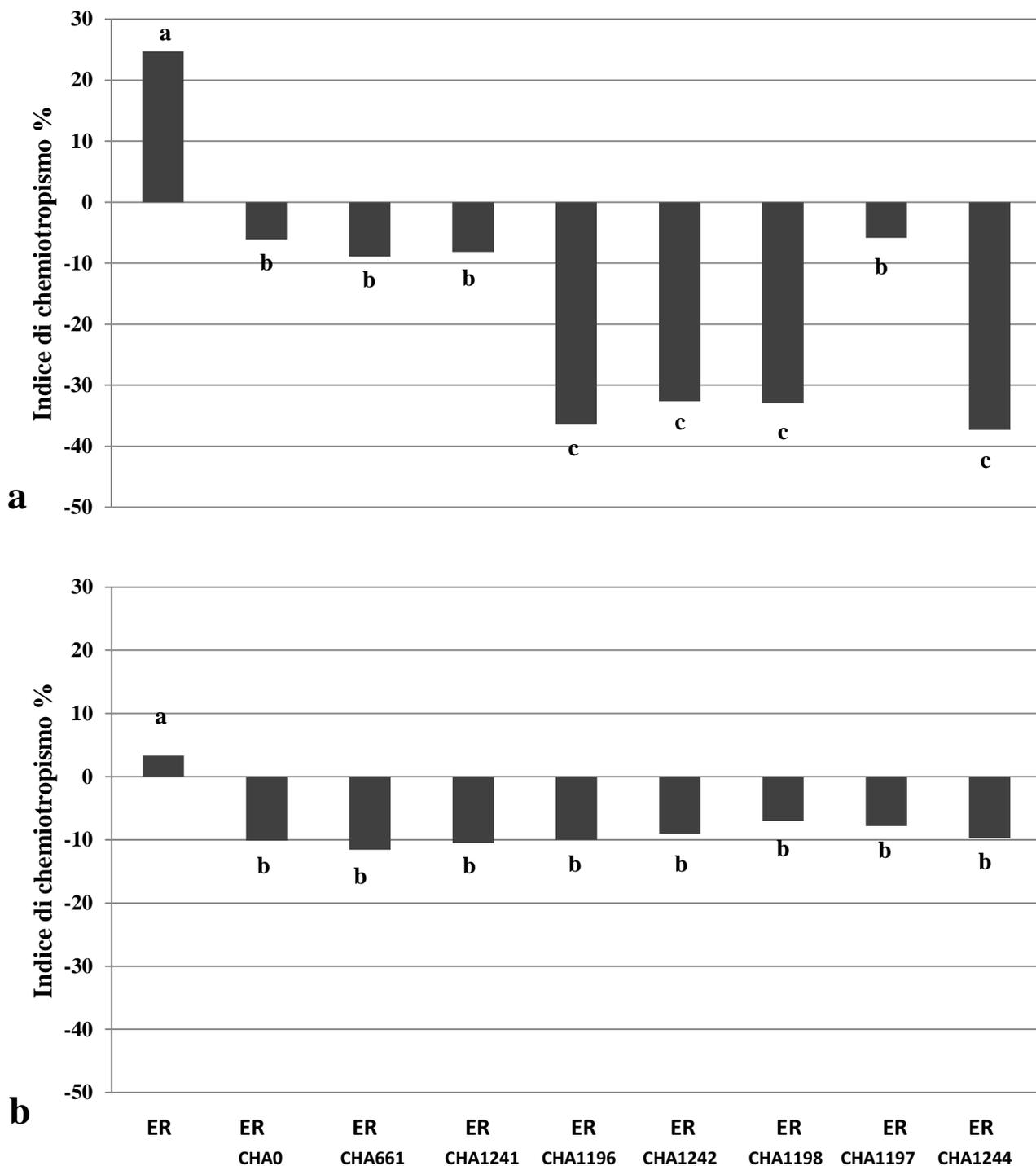


Figura 30. Indice di chemiotropismo del ceppi Δhog (a) e $\Delta mpk1$ di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* nei confronti degli essudati radicali prodotti da piante batterizzate e non. (ER= essudato radicale). A lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$ (Tukey's test).

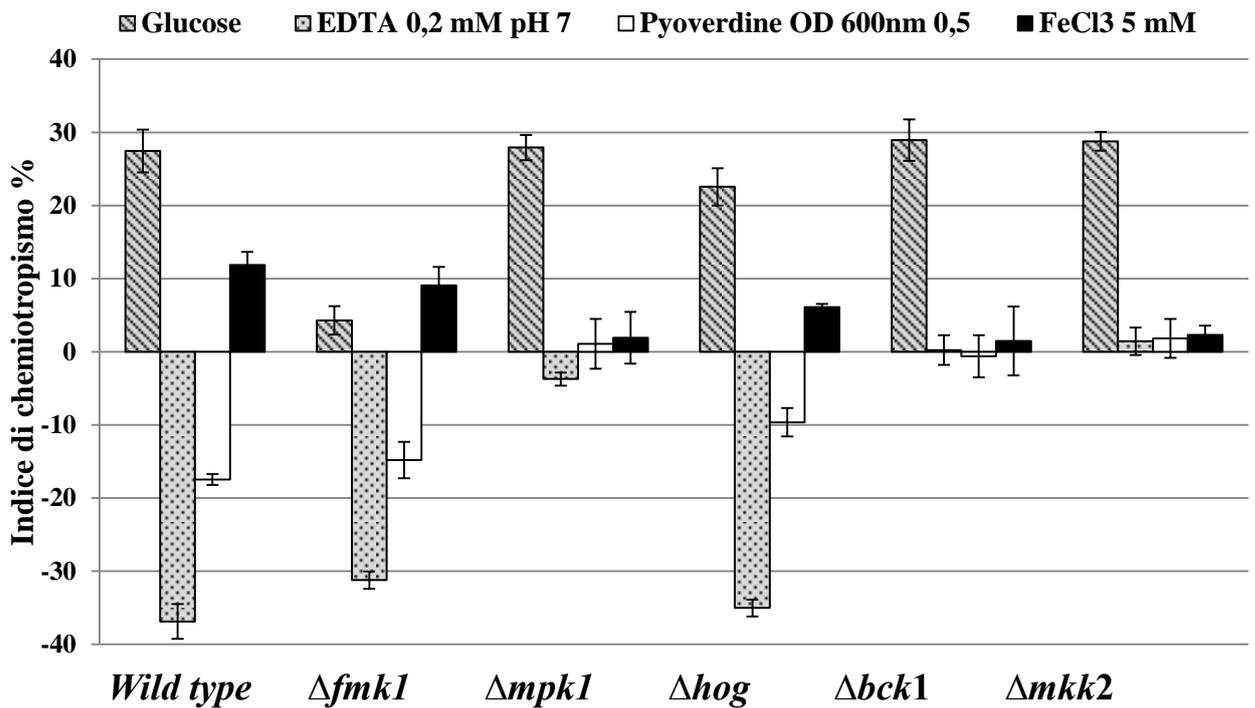


Figura 31. Indice di chemiotropismo del ceppo *wild type*, dei mutanti MAPK e dei ceppi $\Delta bck1 \Delta mkk2$ di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* nei confronti del glucosio, dell'EDTA, della piovverdina e del cloruro di ferro. Le barre indicano la deviazione standard dalla media utilizzando 6 repliche per trattamento.

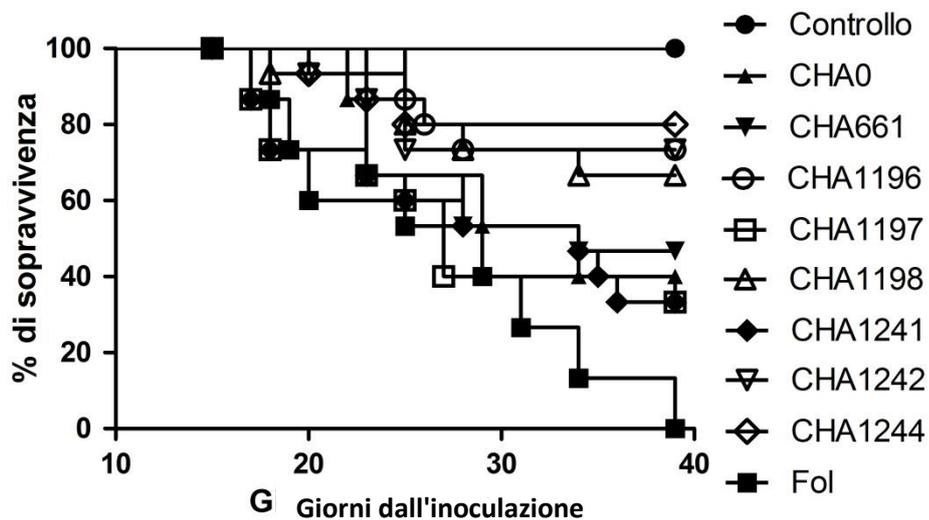


Figura 32. Percentuale di sopravvivenza delle piante di pomodoro nella prova di controllo biologico nei confronti del ceppo *wild type* di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

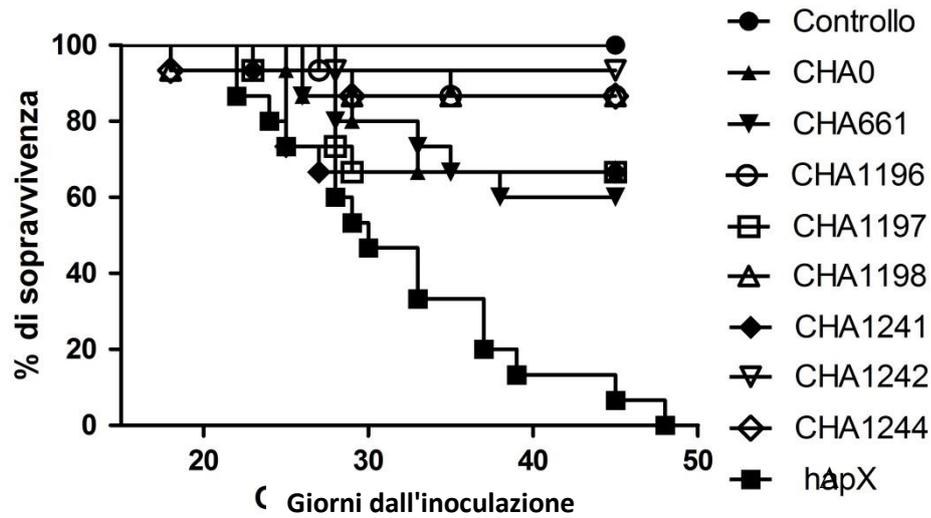


Figura 33. Percentuale di sopravvivenza delle piante di pomodoro nella prova di controllo biologico nei confronti del ceppo $\Delta hapX$ di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

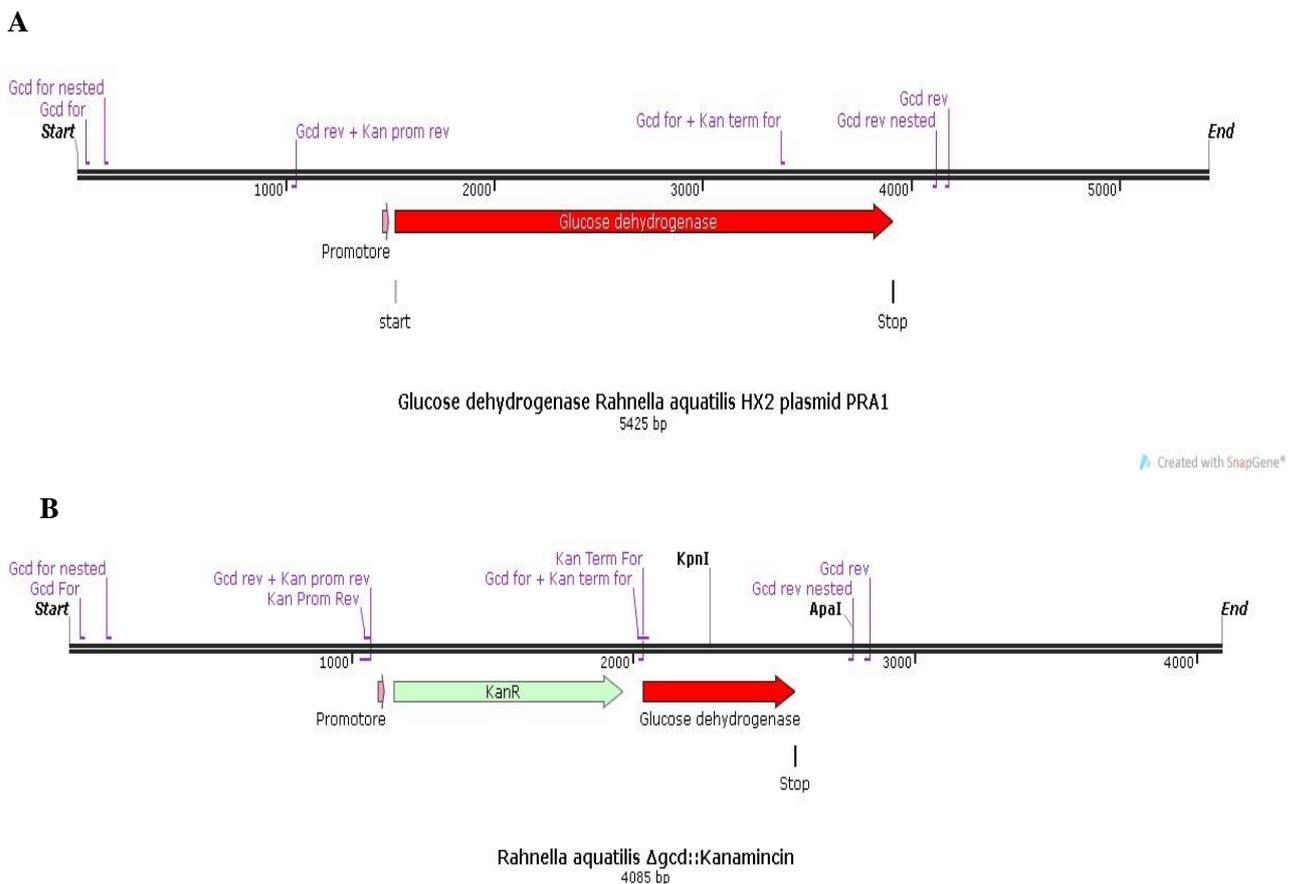


Figura 34. Mappa del gene *Gcd* nel ceppo *wild type* (A) e nel ceppo Δgcd (B). Per l'elaborazione della mappa è stato utilizzato il programma SnapGene utilizzando la sequenza nucleotidica del ceppo HX2 di *R. aquatilis*. In entrambe le immagini sono riportati i primer utilizzati nelle realizzazioni del costrutto ricombinante.

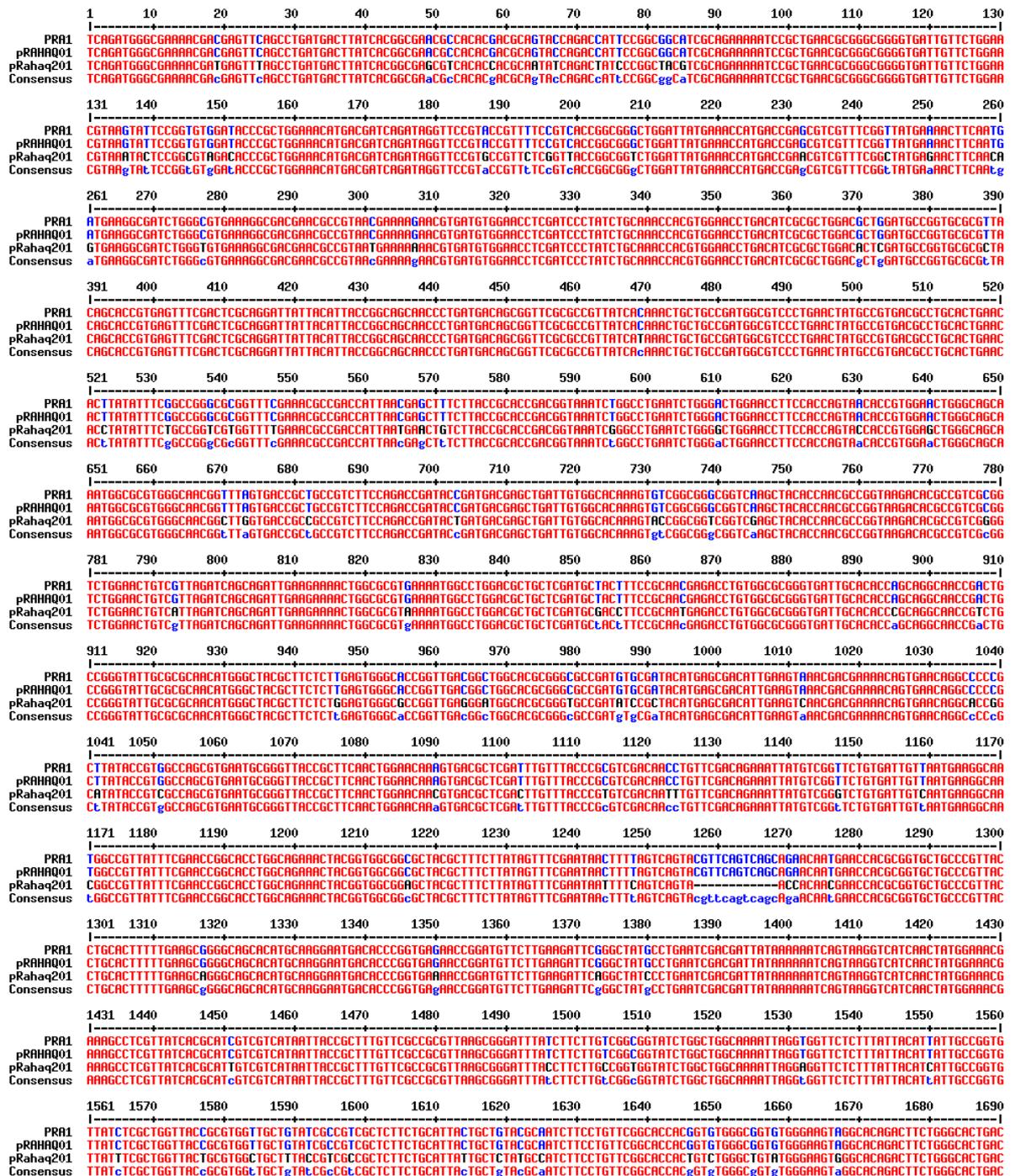


Figura 35. Allineamento della regione al 5' del gene Gcd dei ceppi di *R. aquatilis* ceppi HX2, CIP 78.65 e Y9602. In rosso le regioni conservate mentre in blu quelle polimorfiche.

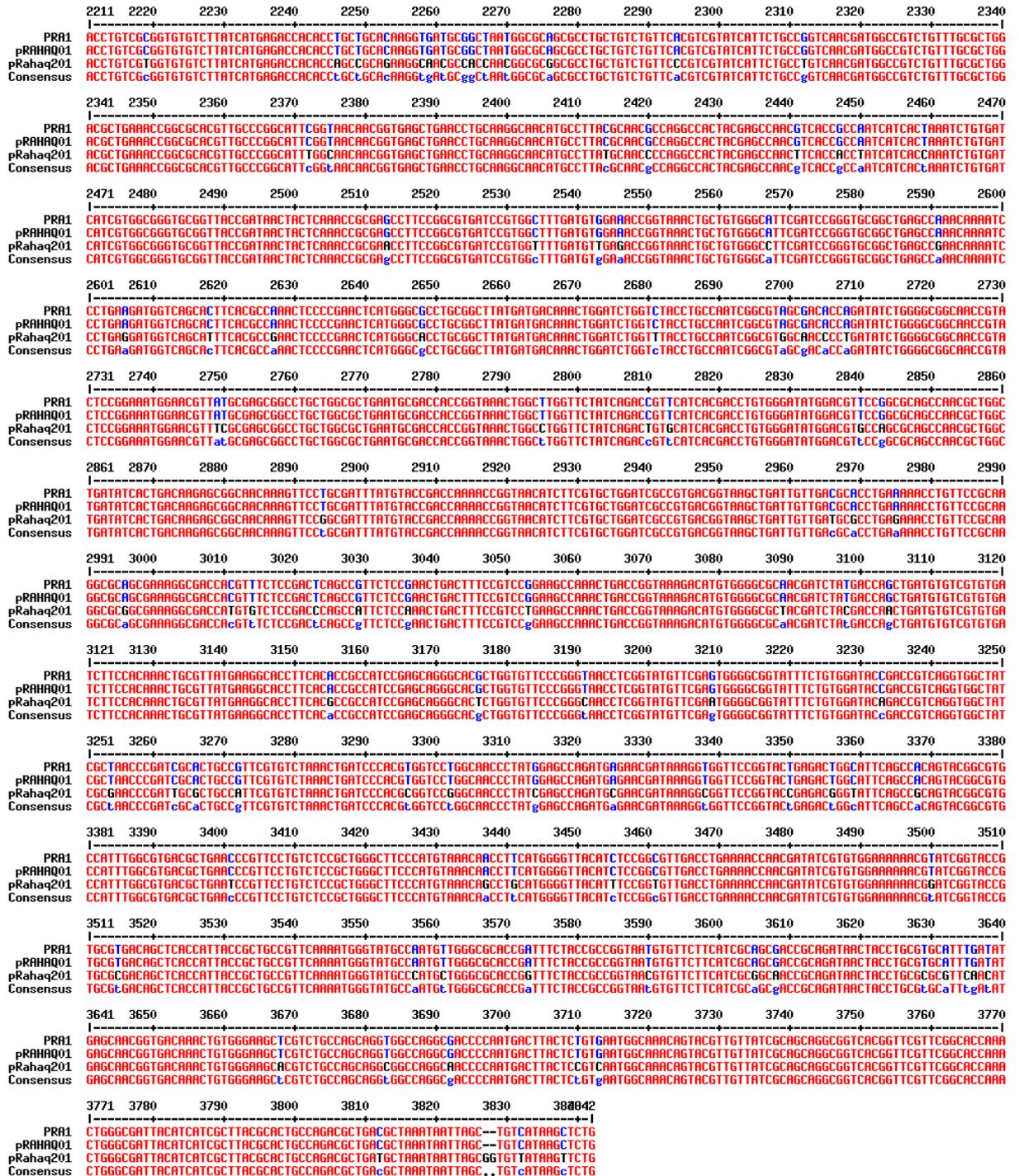


Figura 36. Allineamento della regione al 3' del gene *Gcd* dei ceppi di *R. aquatilis* ceppi HX2, CIP 78.65 e Y9602. In rosso le regioni conservate mentre in blu quelle polimorfiche.

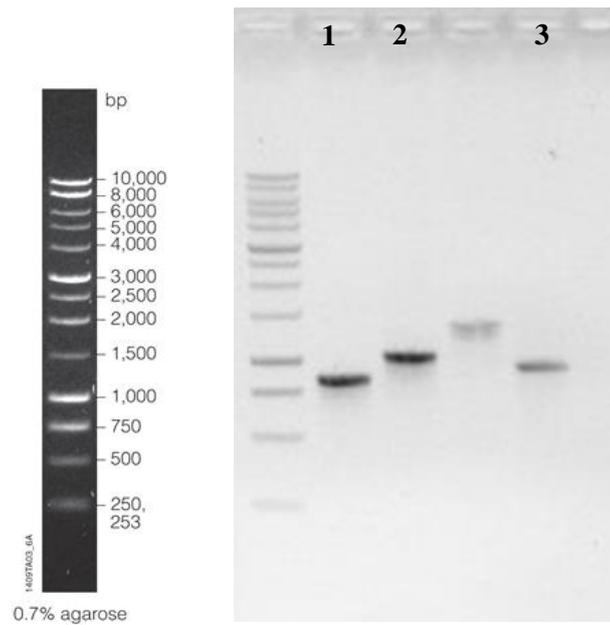


Figura 37. Corsa elettroforetica in gel di agarosio, in posizione 1 e 2 gli ampliconi delle regioni al 3' e al 5' del gene *Gcd*, in posizione 3 l'amplicone della cassetta di resistenza alla Kanamicina. DNA ladder 1Kb Promega.

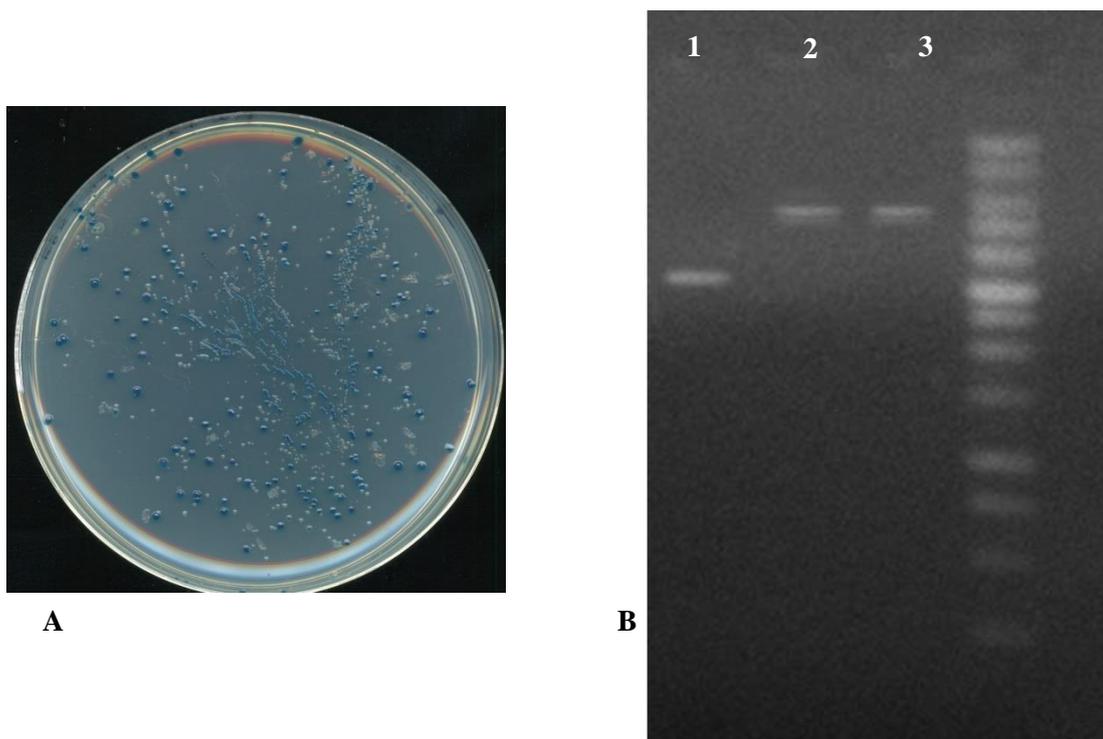


Figura 38. (A) Selezione *blue-white*: le colonie blu hanno inglobato il plasmide pGem-T® senza inserto, mentre le colonie bianche il plasmide con inserto (costrutto ricombinante); (B) corsa elettroforetica in gel di agarosio dei plasmidi pGem-T® linearizzati con enzima di restrizione *NdeI*: in posizione 1 il plasmide senza inserto, in posizione 2 e 3 i plasmidi con inserto. DNA ladder 1Kb Promega.

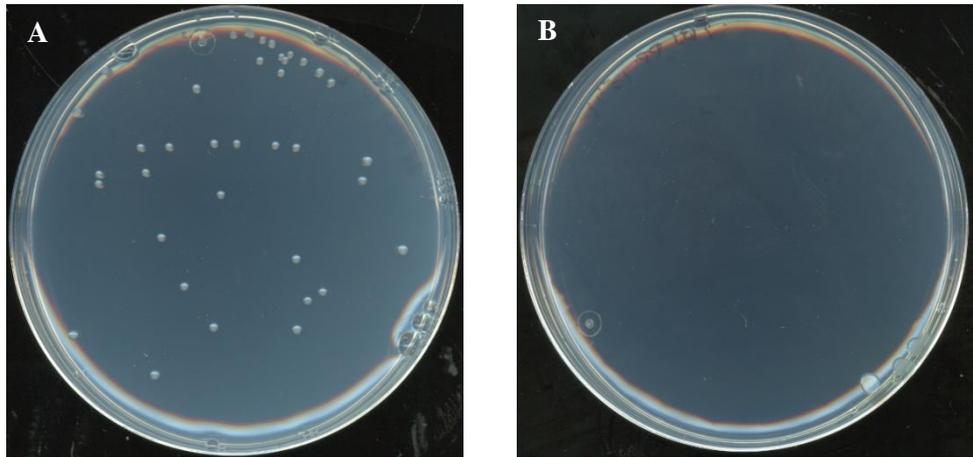


Figura 39. Trasformazione di *R. aquatilis* mediante elettroporazione: (A) reazione di elettroporazione con 1 µg di costrutto ricombinante veicolato in 5 µl di acqua; (B) piastra di controllo con reazione di elettroporazione effettuata con 5 µl di acqua .

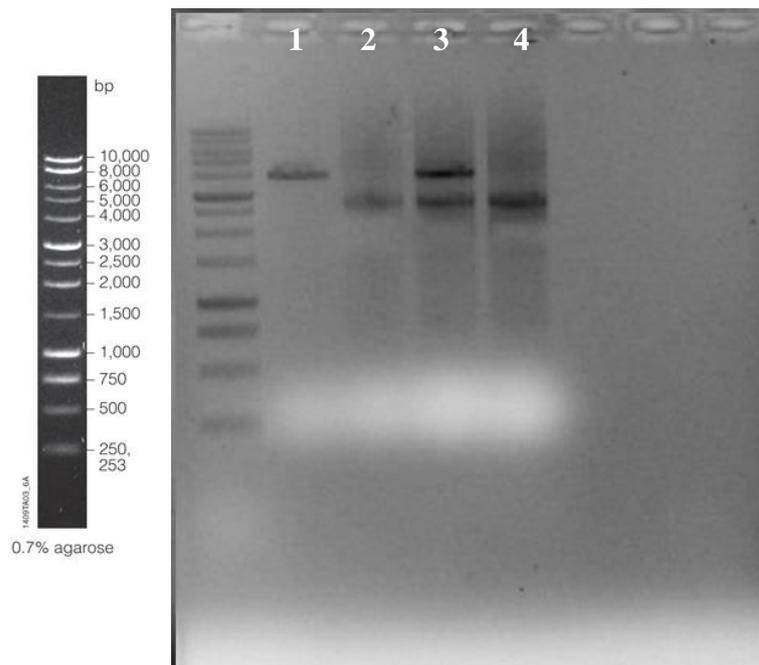


Figura 40. Corsa elettroforetica in gel di agarosio. PCR di conferma: 1) ceppo *wild tipe*; 2) ceppo #3 [Δgcd]; 3) ceppo #4 [ectopico]; 4) ceppo #5 [Δgcd]. DNA ladder 1Kb Promega.

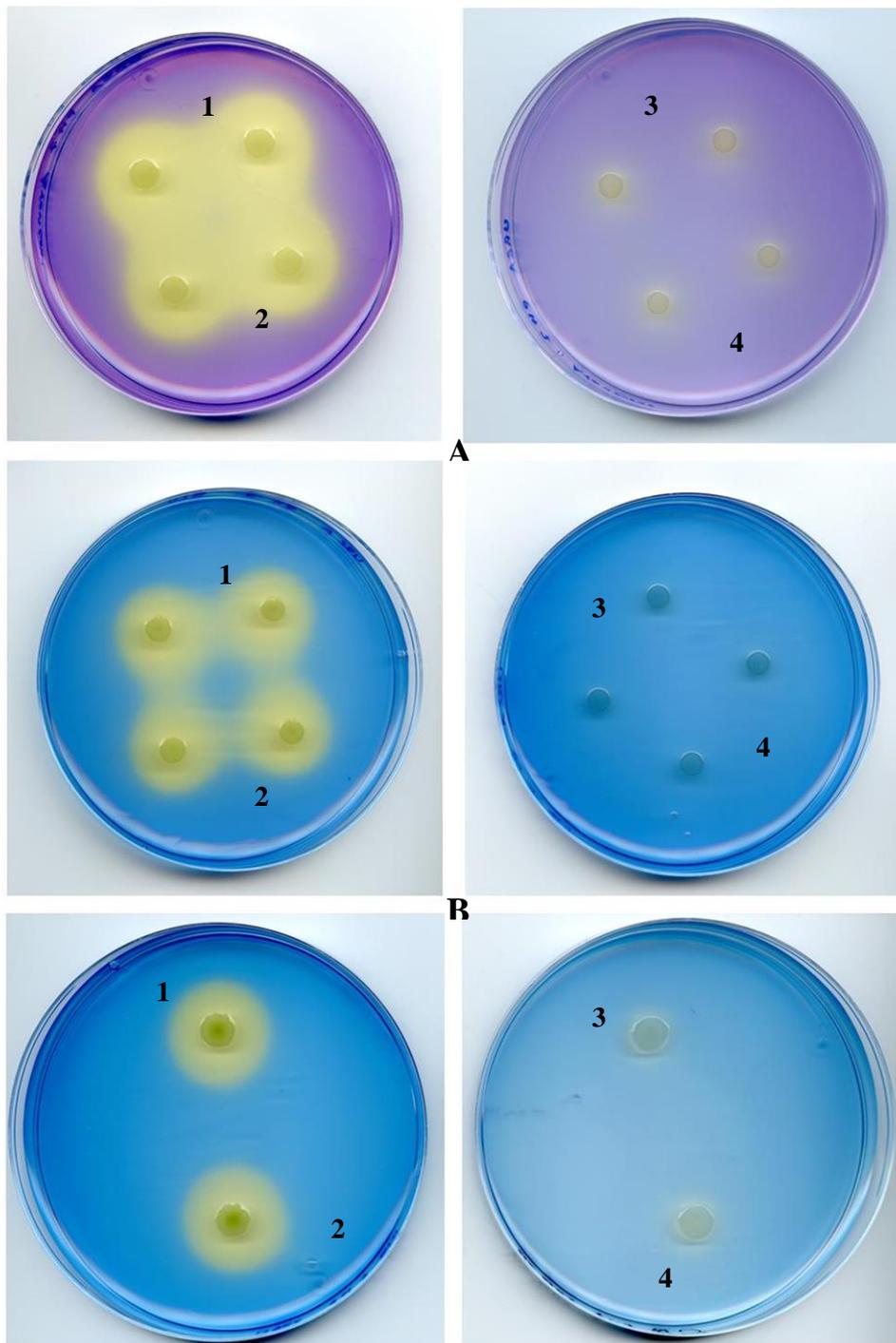


Figura 41. Fenotipo dei ceppi *wild type* e mutanti di *R. aquatilis* in presenza di (A) *bromocresol purple* e (B) *bromocresol green*. I ceppi batterici riportati nelle immagini sono: (1) *wild type*; (2) ceppo #3 [Δgcd]; (3) ceppo #4 [ectopico]; (4) ceppo #5 [Δgcd].

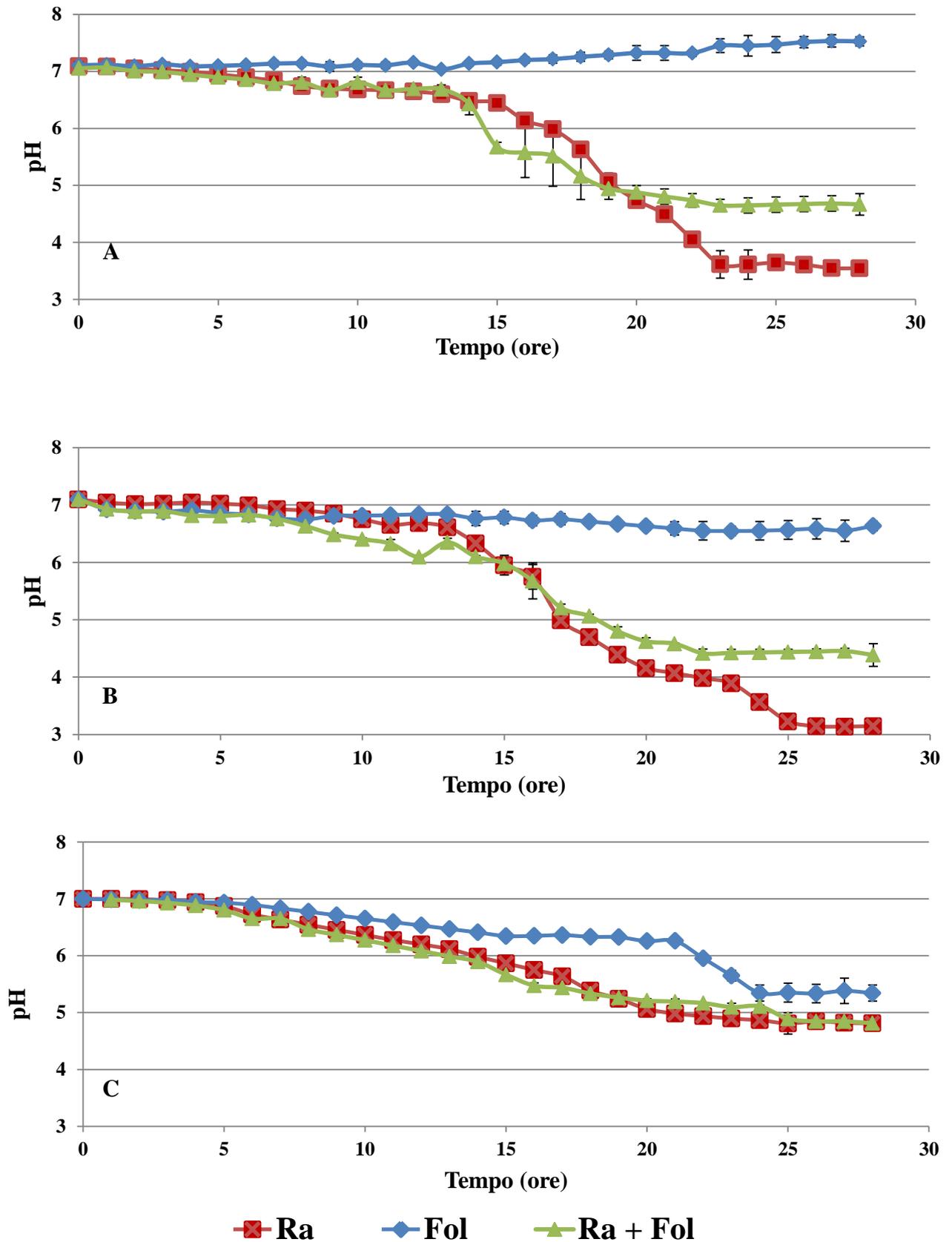


Figura 42. Andamento del pH nel tempo in mezzo minimo con (A) nitrato di sodio, (B) urea; (C) solfato di ammonio. Ra= *R. aquatilis*; Fol= *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*; Ra + Fol= *R. aquatilis* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Le barre indicano la deviazione standard dalla media utilizzando 6 repliche per trattamento.

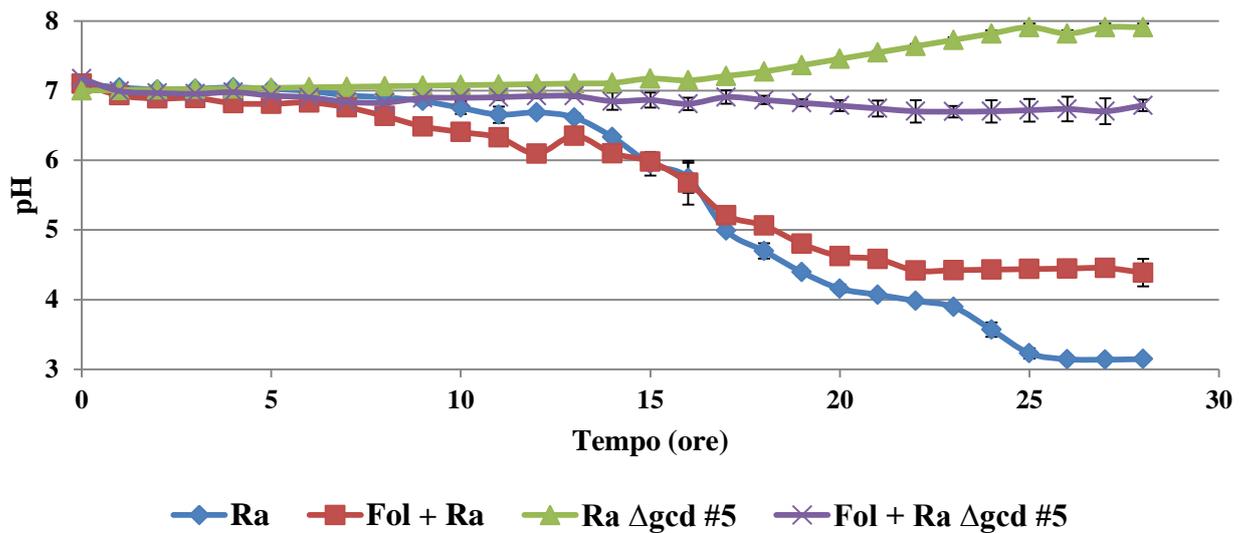


Figura 43. Andamento del pH nel tempo in mezzo minimo con urea. Ra= *R. aquatilis wild type*; Ra Δgcd #5= *R. aquatilis #5 Δgcd*; Fol + Ra= *R. aquatilis wild type*+ *F. oxysporum f.sp. lycopersici*; Fol + Ra Δgcd #5 = *R. aquatilis #5 Δgcd* + *F. oxysporum f.sp. lycopersici*. Le barre indicano la deviazione standard dalla media utilizzando 6 repliche per trattamento.

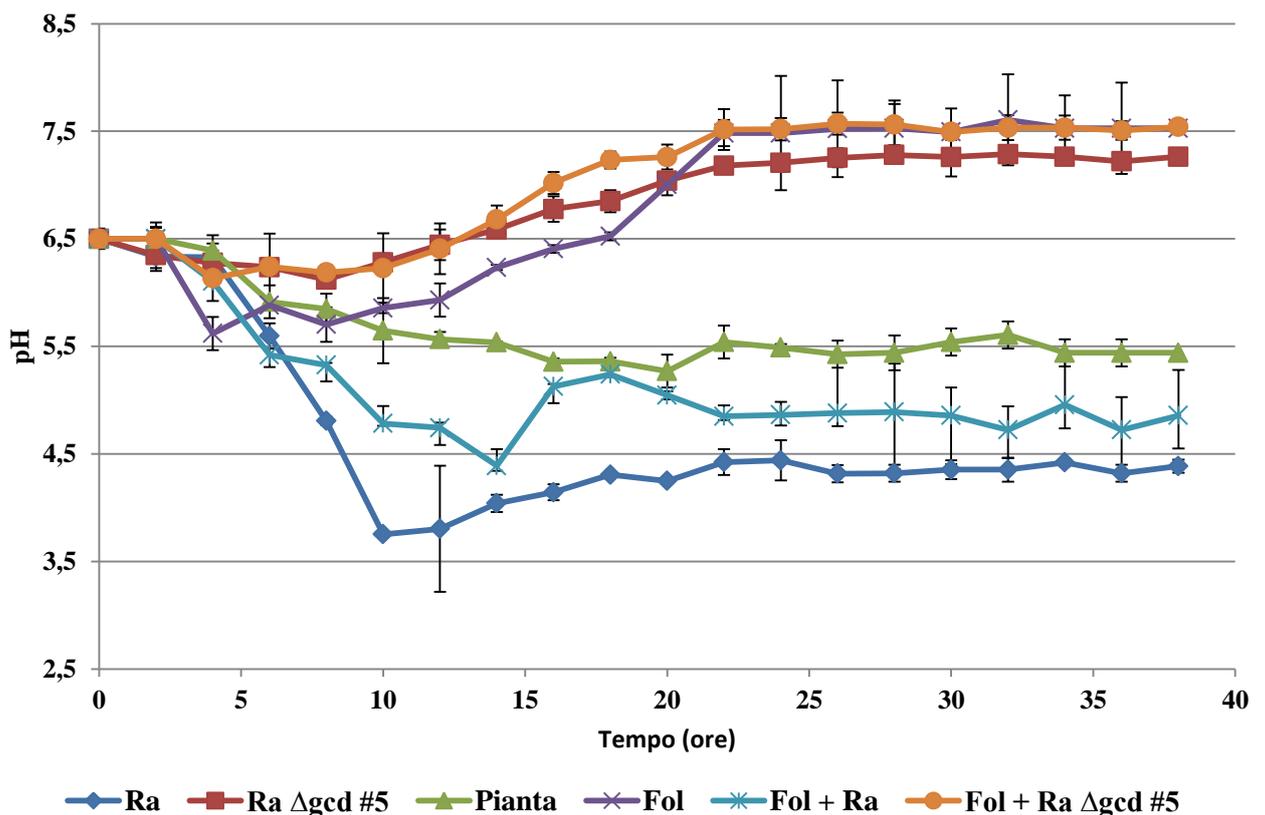


Figura 44. Andamento del pH degli essudati radicali nel tempo. Ra= *R. aquatilis wild type*; Ra Δgcd #5= *R. aquatilis #5 Δgcd*; Fol + Ra= *R. aquatilis wild type*+ *F. oxysporum f.sp. lycopersici*; Fol + Ra Δgcd #5 = *R. aquatilis #5 Δgcd* + *F. oxysporum f.sp. lycopersici*; Fol= *F. oxysporum f.sp. lycopersici*; Pianta= apparato radicale non trattato. Le barre indicano la deviazione standard dalla media utilizzando 3 repliche per trattamento.

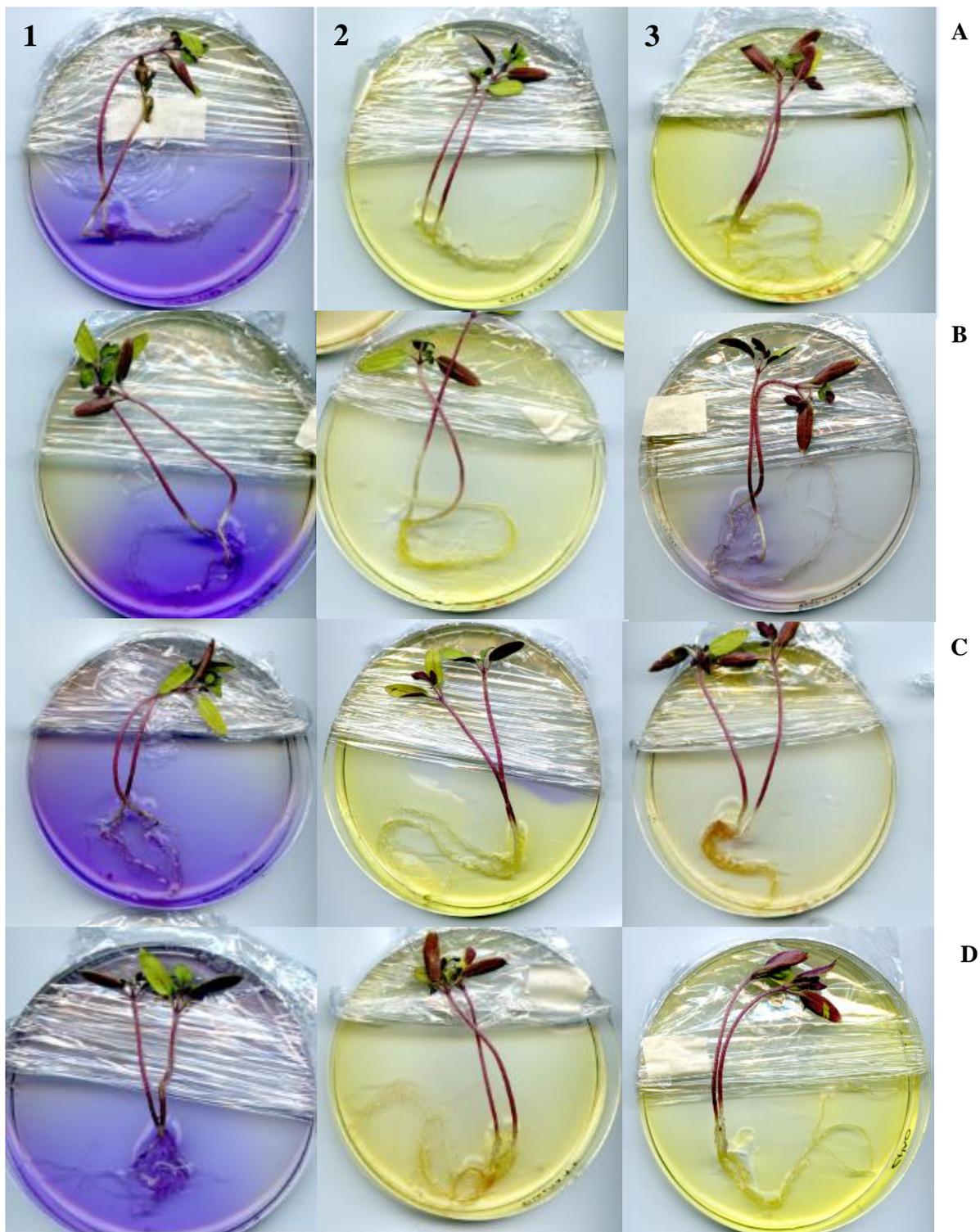


Figura 45. Andamento del pH degli essudati radicali in Top agar con *bromocresol purple*. A) pianta non inoculata; B) pianta inoculata con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*; C) pianta inoculata con *R. aquatilis*; D) pianta inoculata con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* e *R. aquatilis*. I rilevamenti fotografici sono stati eseguiti dopo 0 (1), 24 (2) e 48 ore (3) ore dall'allestimento della prova.

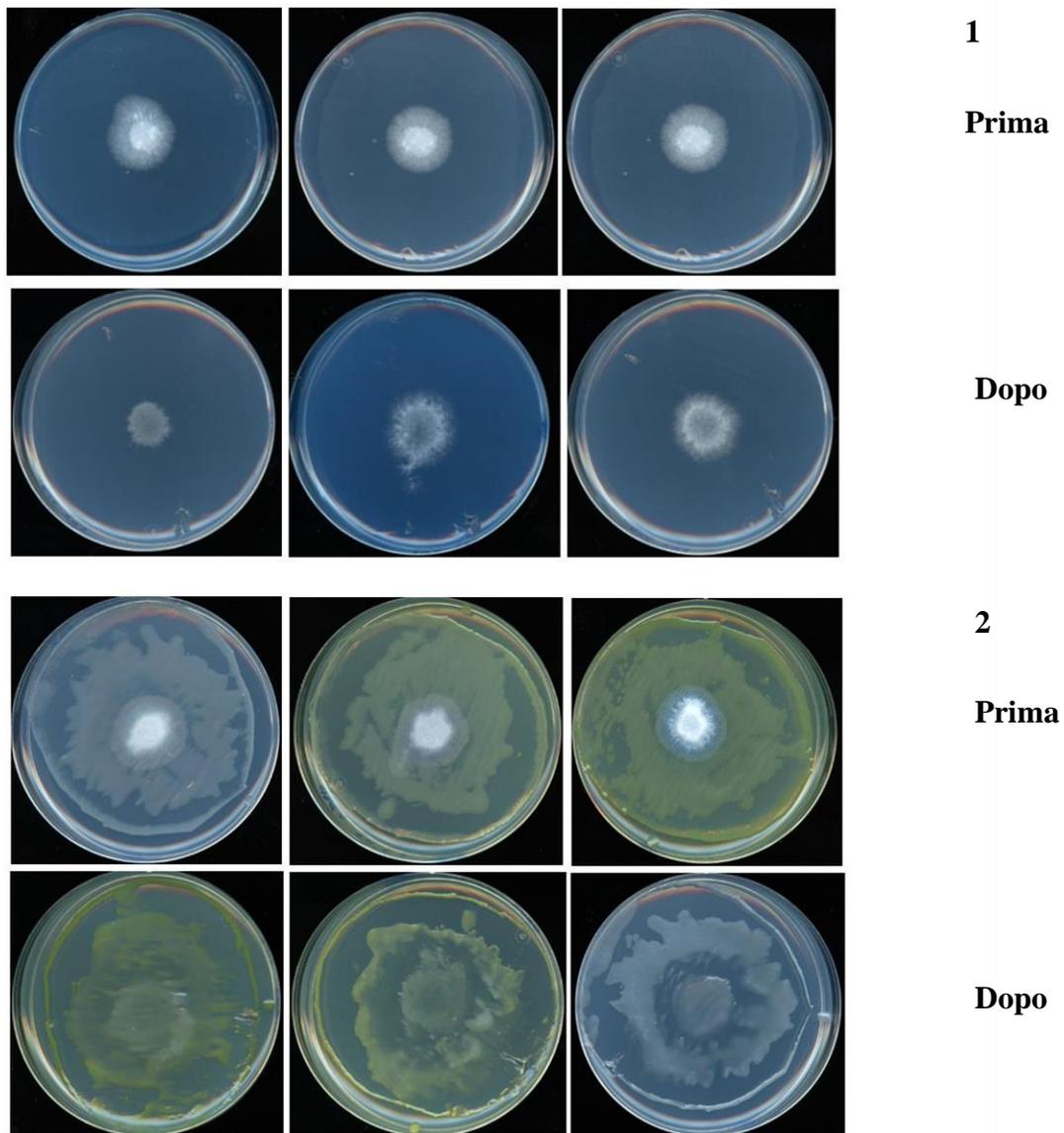


Figura 46. Saggio di penetrazione del *cellophane* in MMU agarizzato (1) ed in presenza di *R. aquatilis* ceppo *wild type* (2); prima e dopo la rimozione della membrana di *cellophane*.

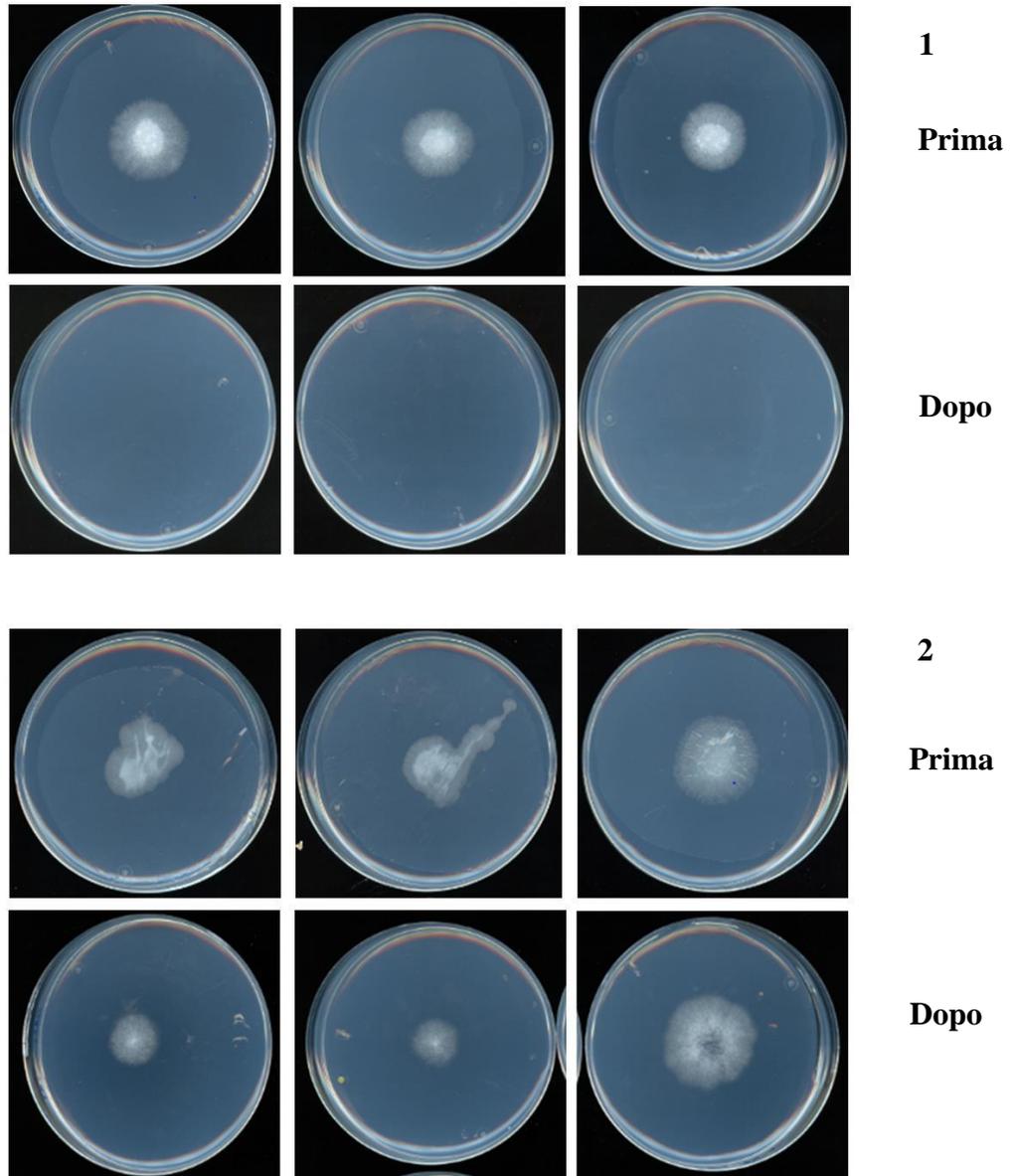


Figura 47. Saggio di penetrazione del *cellophane* in MMU agarizzato tamponato a pH 5 (1) e a pH 7 (2); prima e dopo la rimozione della membrana di *cellophane*.

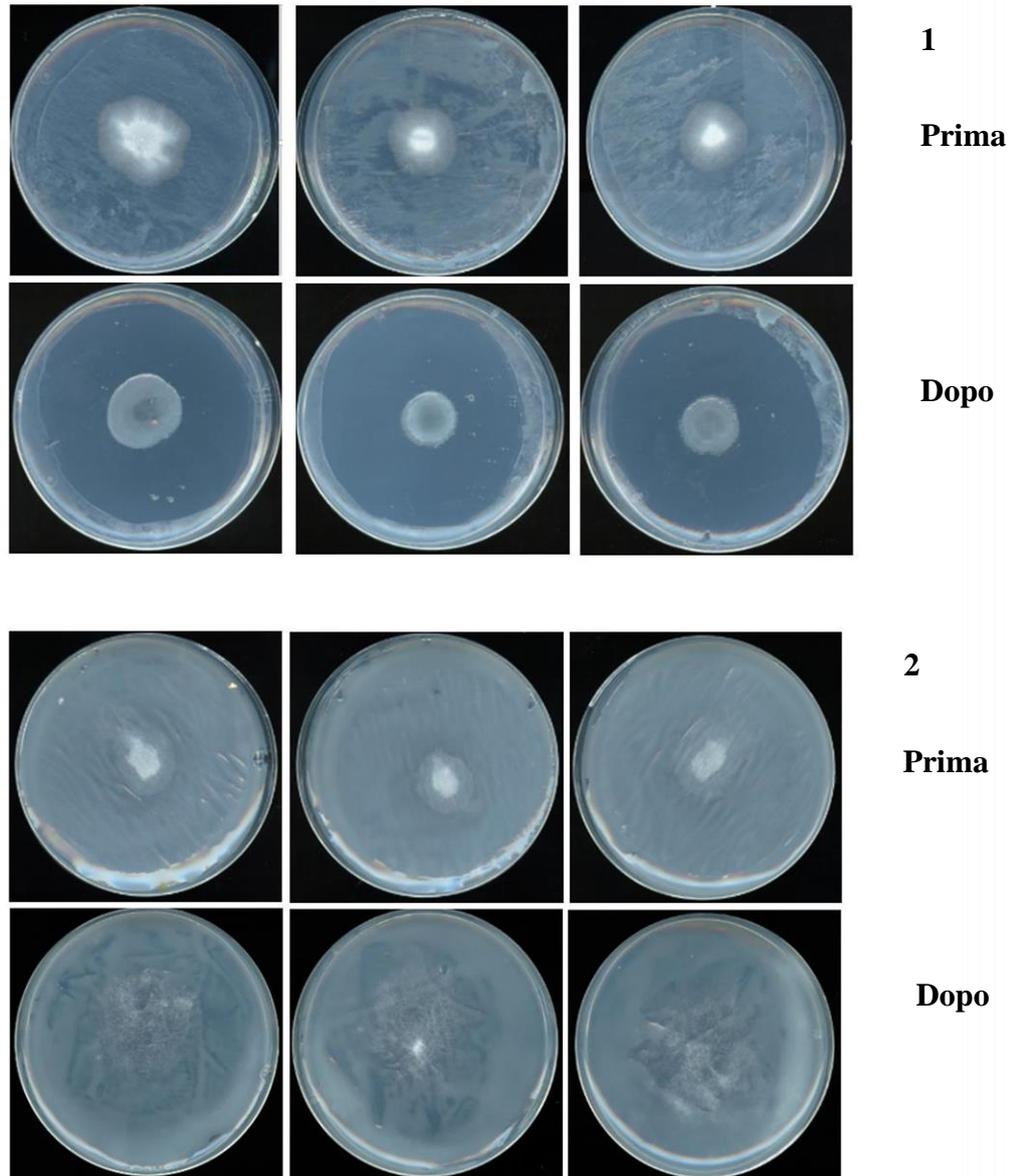


Figura 48. Saggio di penetrazione del *cellophane* in MMU agarizzato tamponato a pH 5 (1) e a pH 7 (2), in presenza di *R. aquatilis* ceppo *wild type*; prima e dopo la rimozione della membrana di *cellophane*.

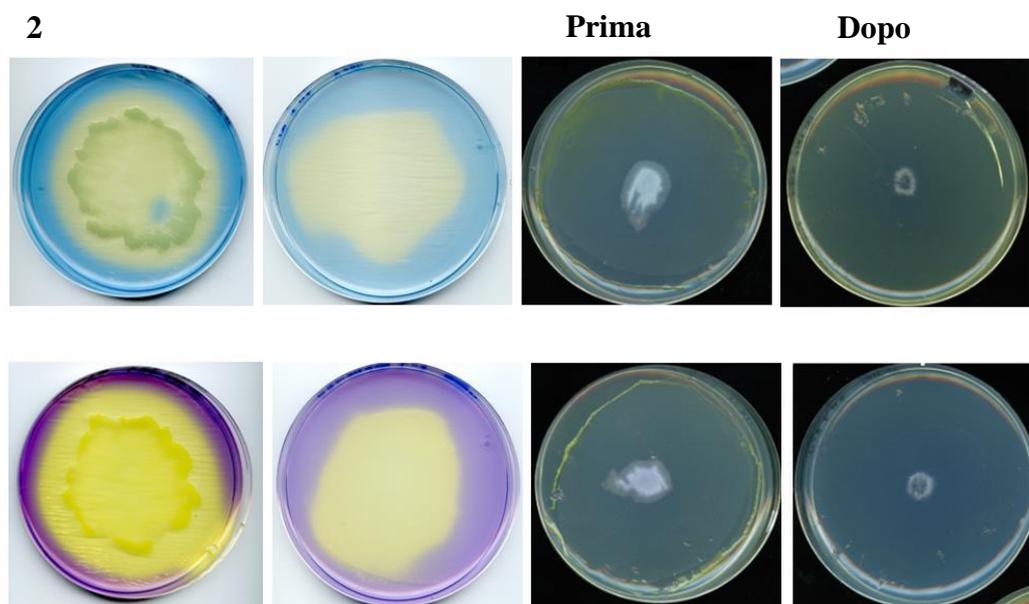
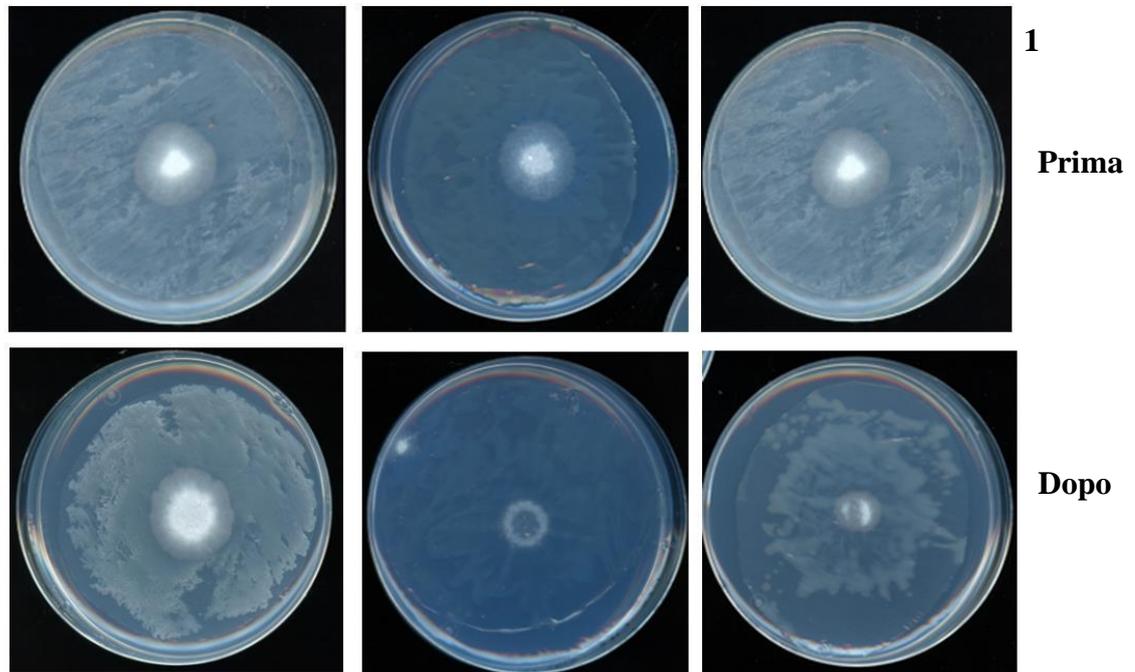


Figura 49. Saggio di penetrazione del *cellophane* in MMU agarizzato in presenza di *R. aquatilis* ceppo #5 Δgcd (1) e di *R. aquatilis* ceppo *wild type* (2); prima e dopo la rimozione della membrana di *cellophane*.

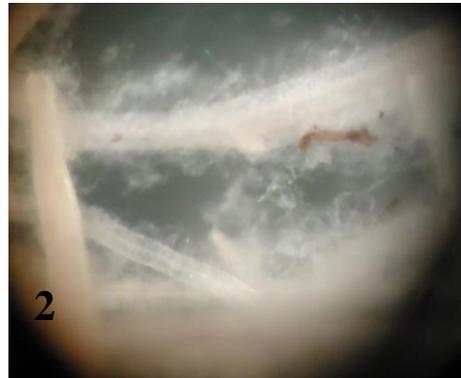
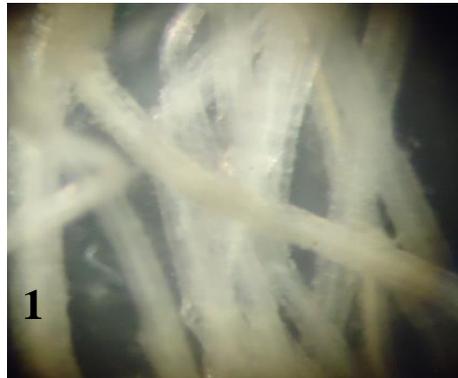


Figura 50. Saggio di adesione radicale. 1) controllo negativo; 2) controllo positivo [*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*]; 3) *R. aquatilis* ceppo wild type + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*; 4) *R. aquatilis* ceppo Δgcd #5 + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Foto allo stereoscopio.



Figura 51. Saggio di crescita invasiva su frutti di pomodoro. La foto è stata scattata al settimo giorno di incubazione a 28 °C e 100% di umidità (controllo trattato con acqua distillata sterile). E' chiaramente visibile il micelio fungino sulla superficie del frutto di pomodoro nei trattamenti 2 e 6, mentre è assente nelle restanti tesi.

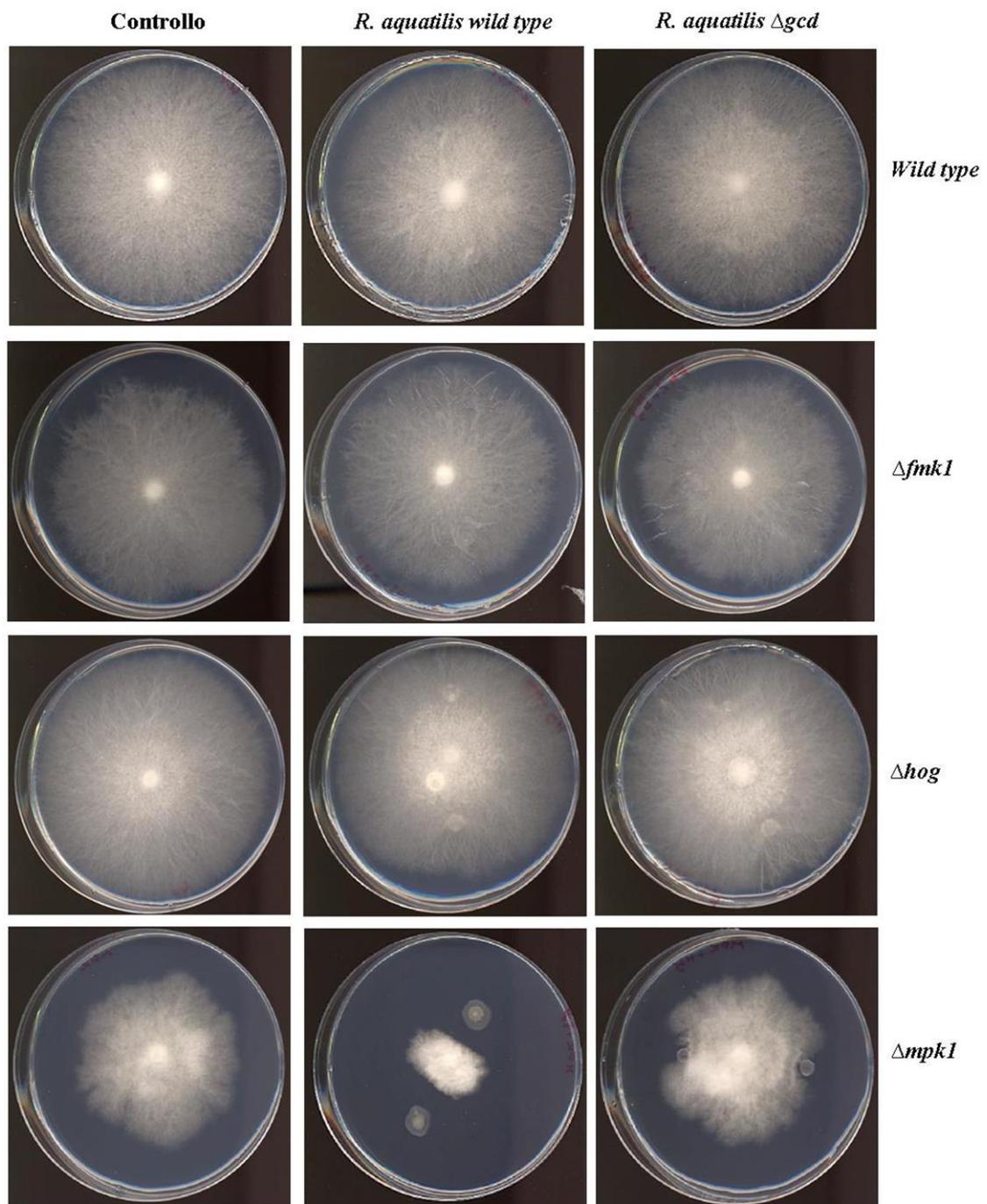


Figura 52. Coltura duale tra i ceppi *wild type* ed i mutanti MAPK di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* con il ceppo *wild type* e mutanti Δgcd di *R. aquatilis*.

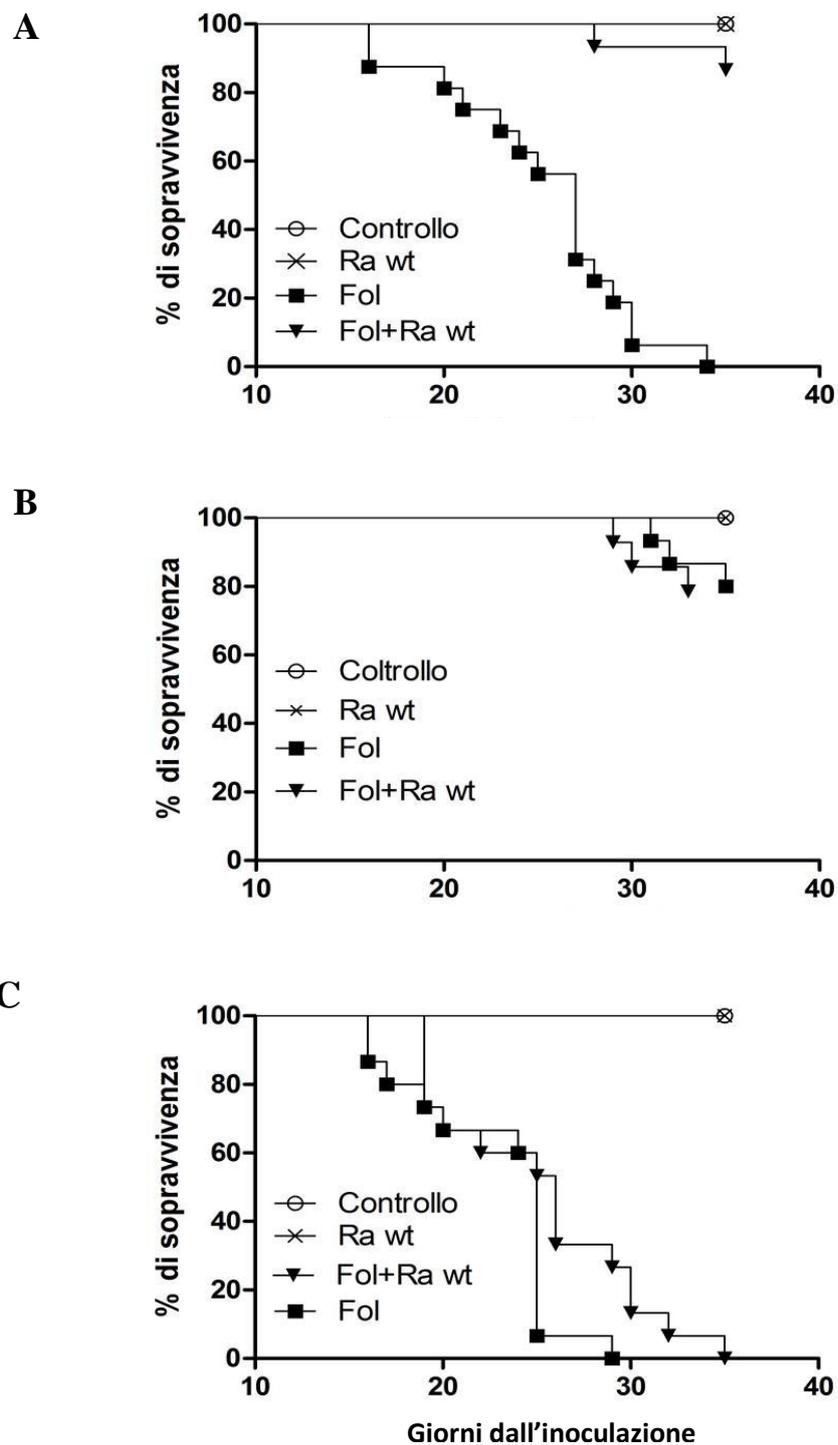


Figura 53. Percentuale di sopravvivenza delle piante di pomodoro nella prova di controllo biologico nei confronti del ceppo *wild type* di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. A) piante irrigate con acqua; B) piante irrigate con tampone a pH 5; piante irrigate con tampone pH 7. Ra wt= *R. aquatilis* ceppo *wild type*; Fol= *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*; Fol+Ra wt= *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + *R. aquatilis* ceppo *wild type*; Controllo= piante non inoculate.

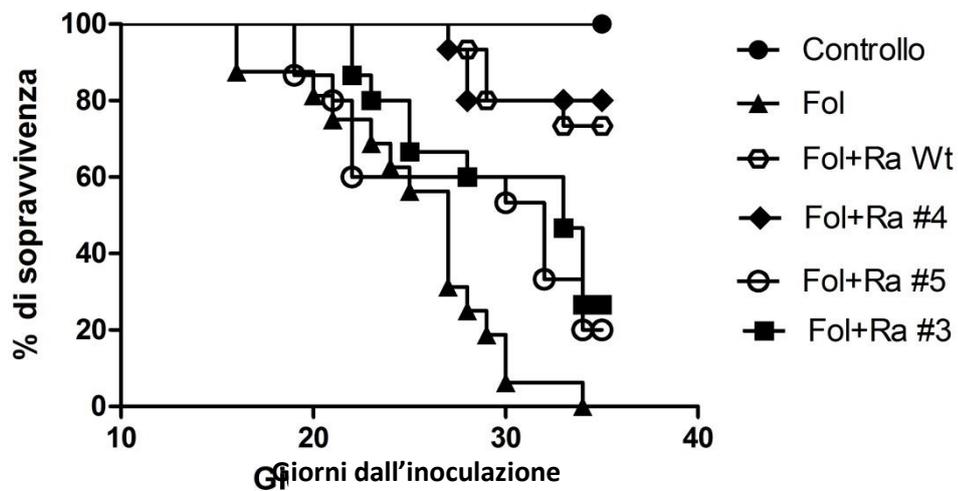


Figura 54. Percentuale di sopravvivenza delle piante di pomodoro nella prova di controllo biologico nei confronti del ceppo *wild type* di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Nella prova, oltre al ceppo *wild type* di *R. aquatilis*, sono stati saggiati i tre ceppi kanamicina resistenti (#3 Δ gcd; #4 ectopico; #5 Δ gcd)

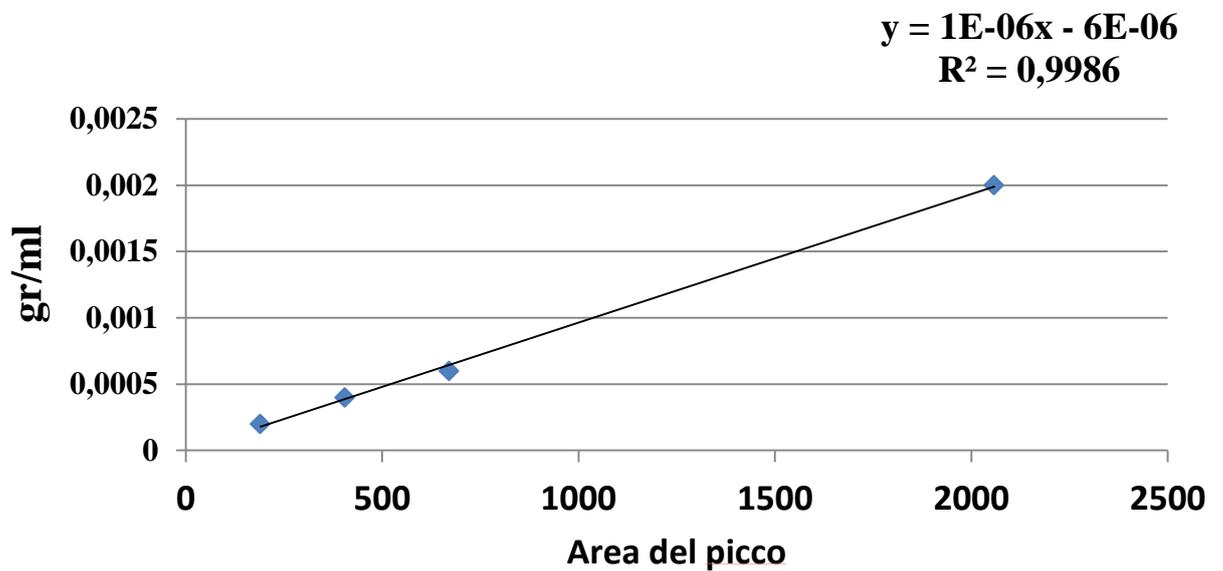


Figura 55. Retta di regressione ottenuta mettendo in correlazione l'area dei picchi di concentrazioni note di acido fusarico analizzate in HPLC.

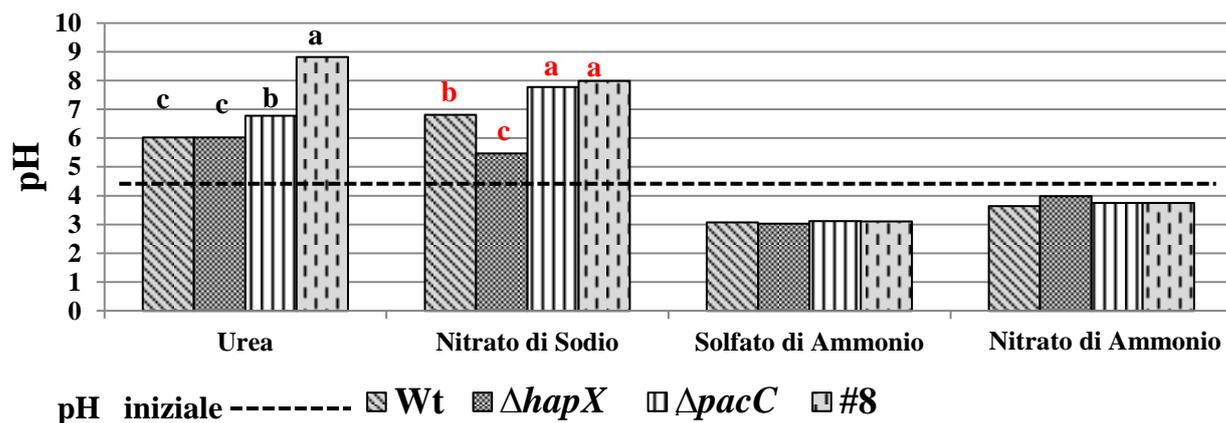
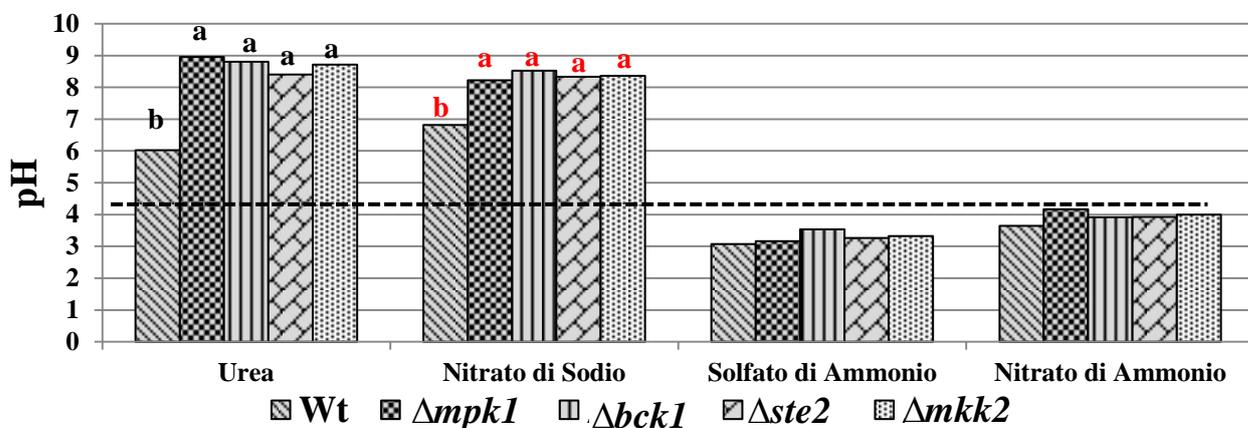
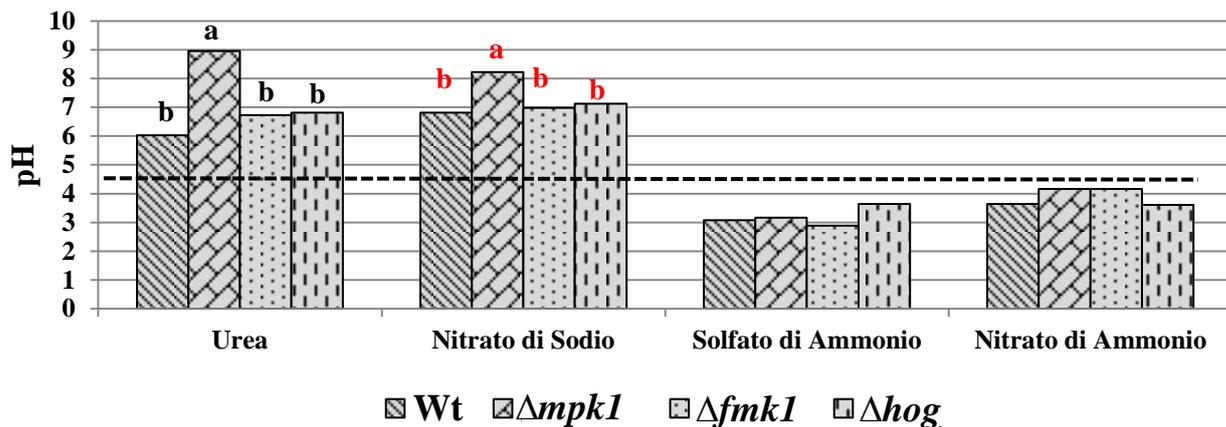


Figura 56. pH rilevato nel brodo colturale fungino al termine dei sette giorni di incubazione, in presenza delle quattro differenti fonti azotate. pH ad inizio prova 4.5. In tutti i grafici. Per ciascun gruppo di istogrammi, a lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$. In solfato di ammonio e nitrato di ammonio i valori osservati non presentano differenze significative (Tukey's test).

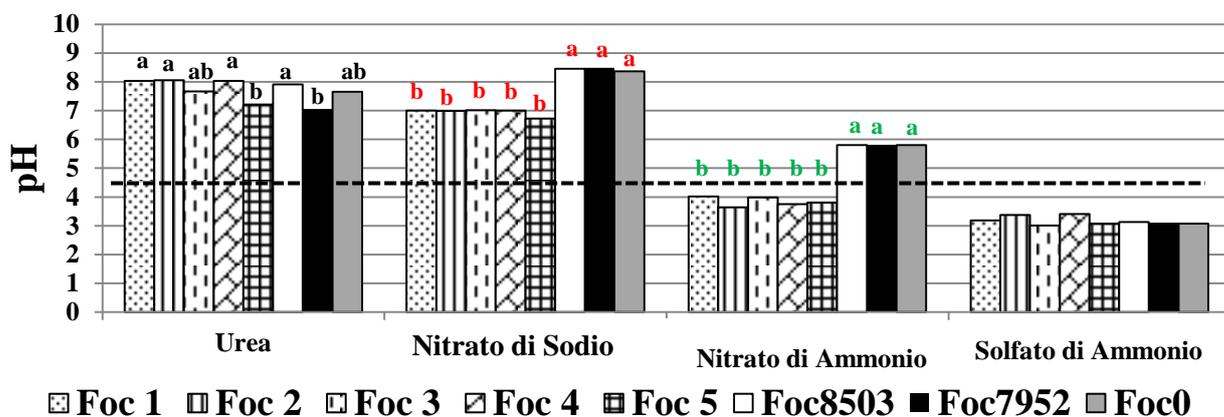
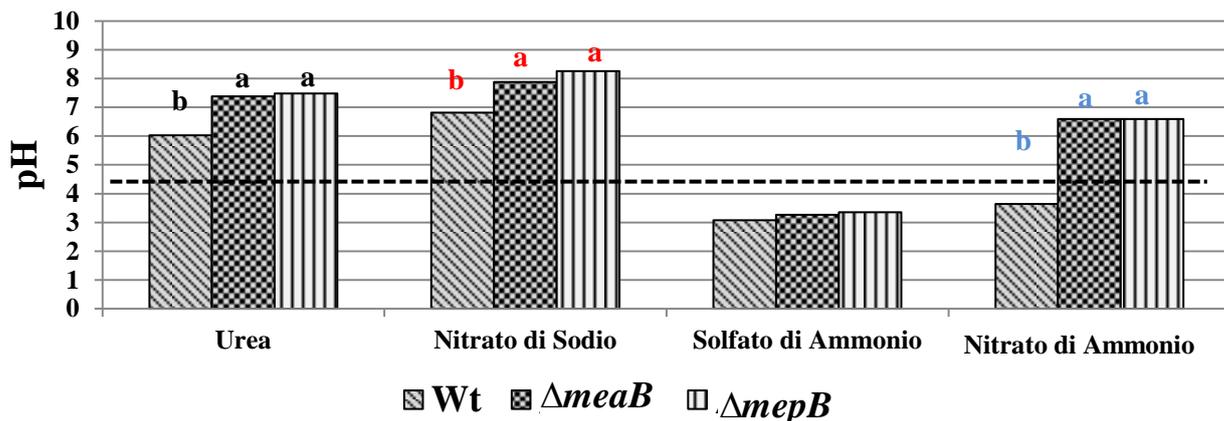


Figura 57. pH rilevato nel brodo culturale fungino al termine dei sette giorni di incubazione, in presenza delle quattro differenti fonti azotate. pH ad inizio prova 4.5. Per ciascun gruppo di istogrammi, a lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$. In solfato di ammonio i valori osservati non presentano differenze significative (Tukey's test). **a**

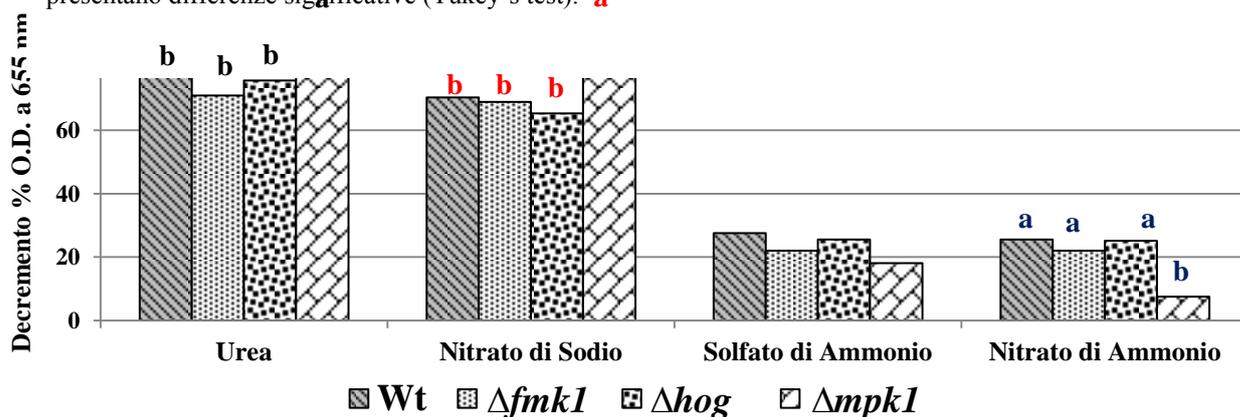


Figura 58. Capacità chelante del brodo di culturale al termine dei sette giorni di incubazione, in presenza di quattro fonti azotate differenti. Per ciascun gruppo di istogrammi, a lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$. In solfato di ammonio i valori osservati non presentano differenze significative (Tukey's test).

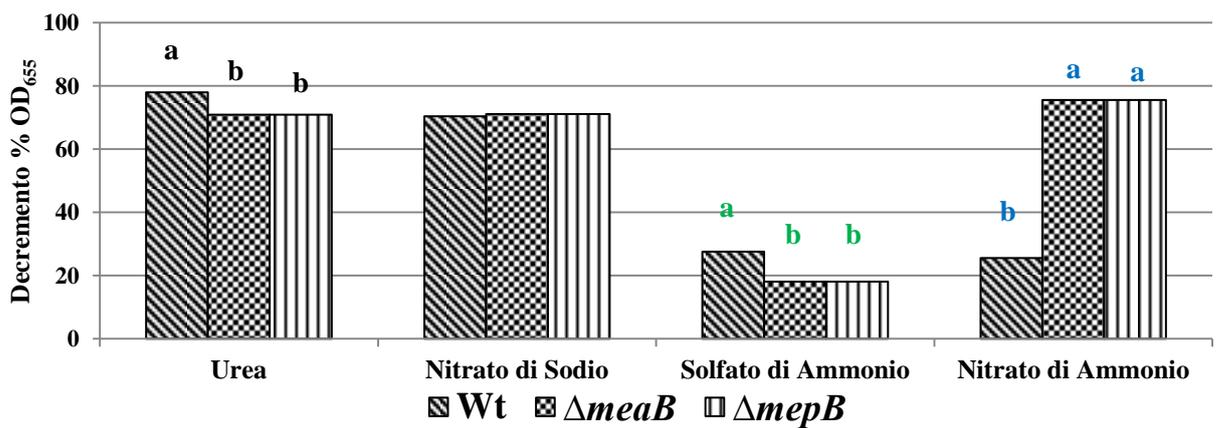
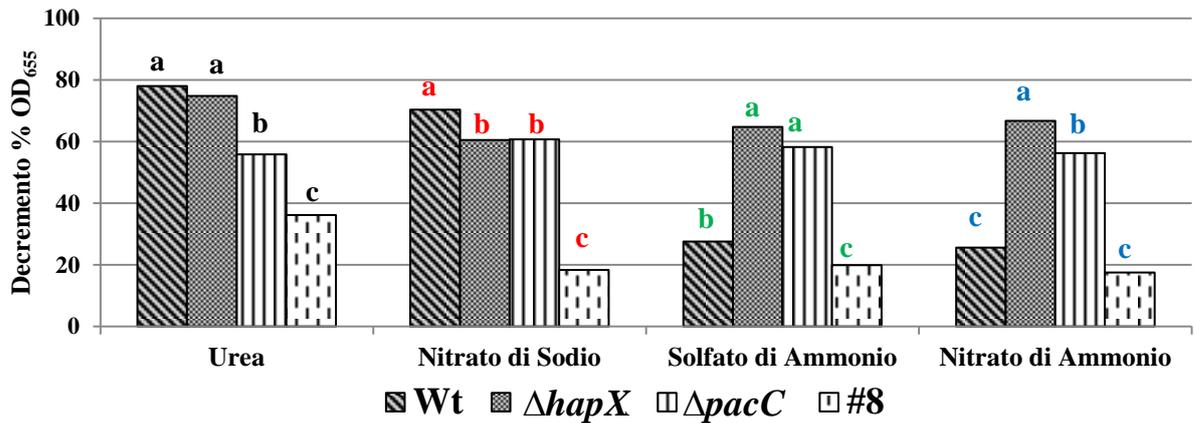
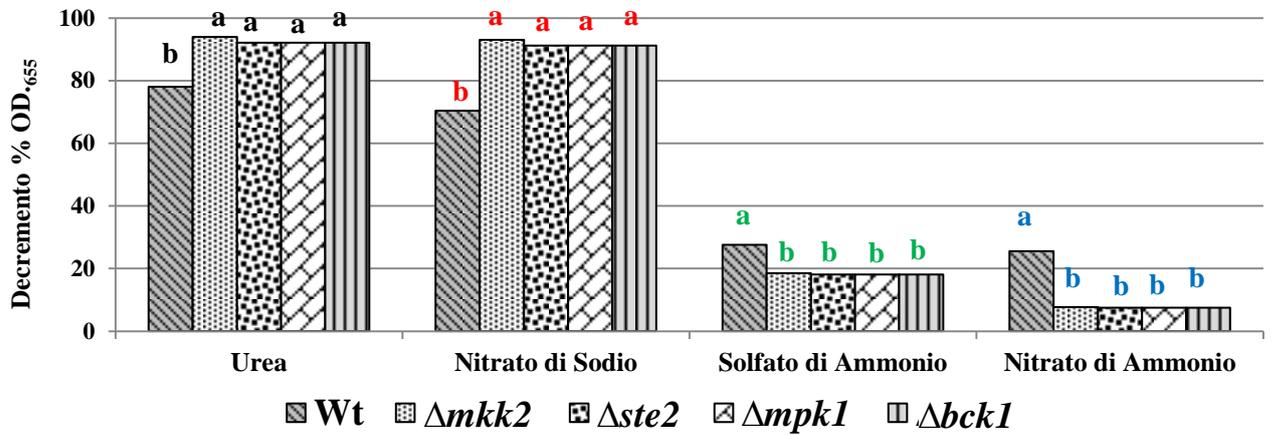


Figura 59. Capacità chelante del brodo culturale fungino al termine dei sette giorni di incubazione, in presenza di quattro fonti azotate differenti. Per ciascun gruppo di istogrammi, a lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$ (Tukey's test), dove non riportate non vi sono differenze significative.

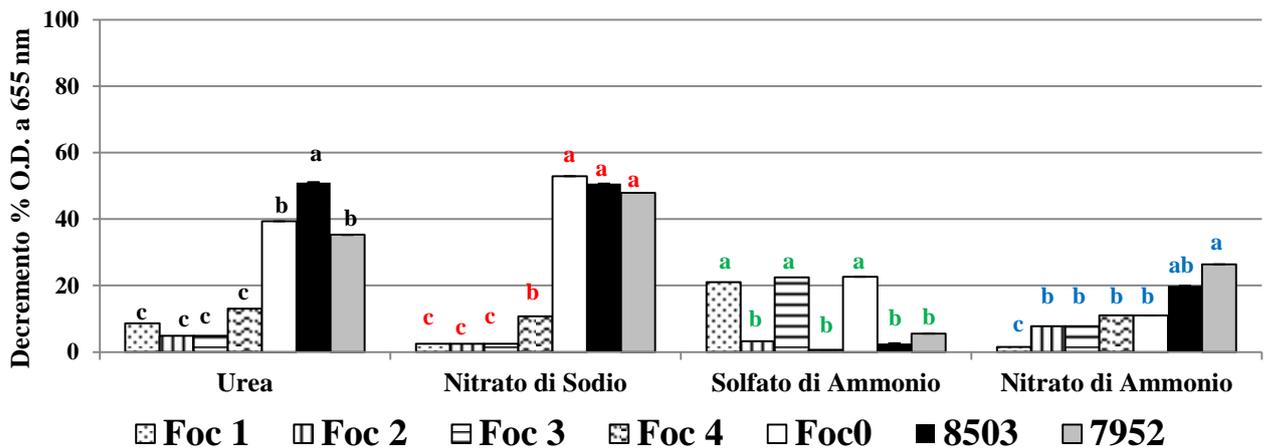


Figura 60. Capacità chelante dei brodi di coltura fungini al termine dei sette giorni di incubazione, in presenza di quattro fonti azotate differenti. Per ciascun gruppo di istogrammi, a lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$ (Tukey's test).

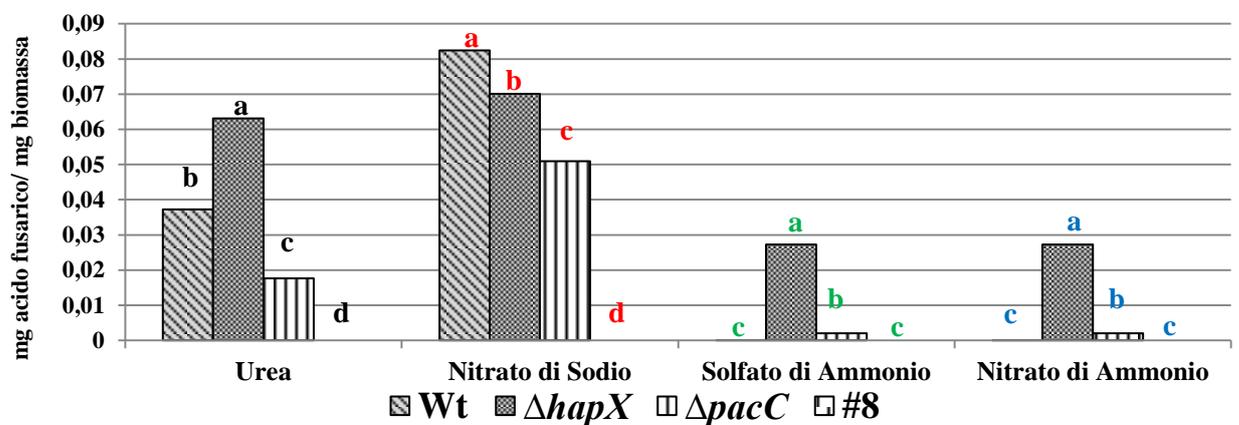
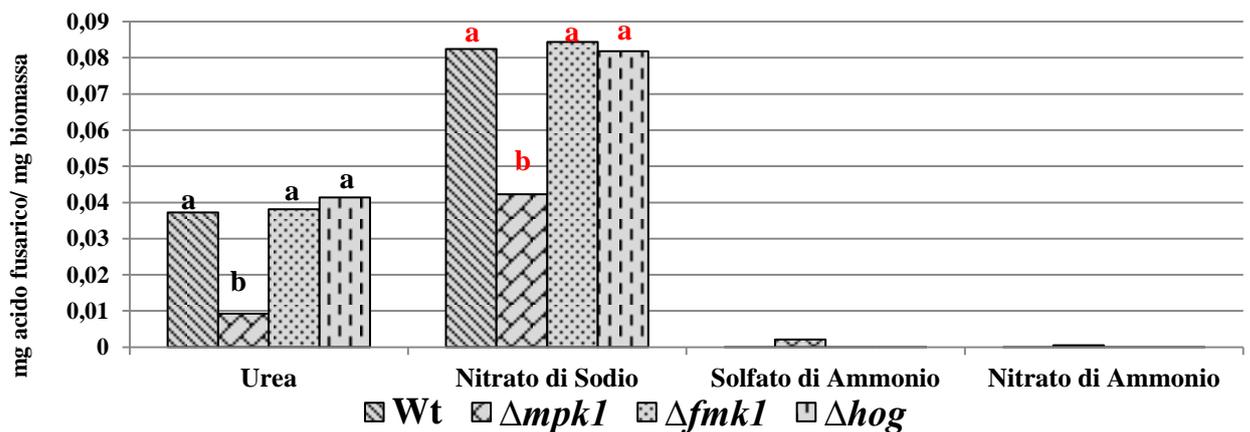


Figura 61. Produzione di acido fusarico da parte dei ceppi fungini saggiati al termine di sette giorni di incubazione nelle quattro differenti fonti azotate. La produzione di questo metabolita è espressa come mg di acido fusarico su mg di biomassa fungina. Per ciascun gruppo di istogrammi, a lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$ (Tukey's test), dove non riportate non sono state osservate differenze significative.

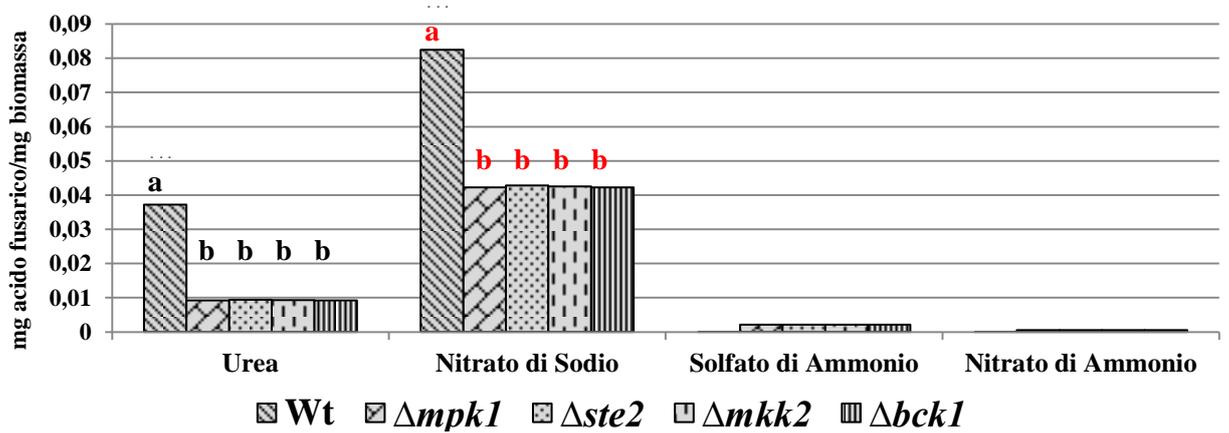
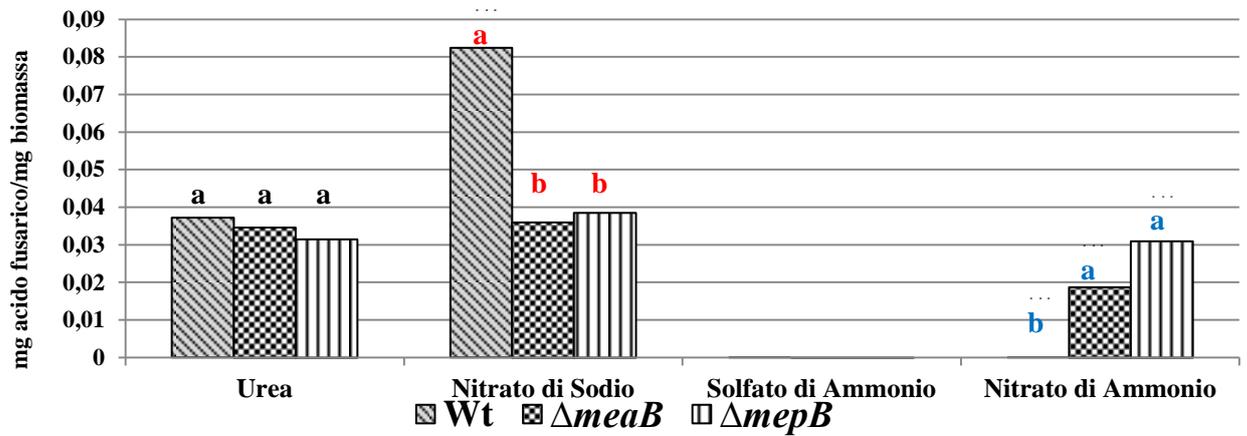


Figura 62. Produzione di acido fusarico da parte dei ceppi fungini saggiati al termine di sette giorni di incubazione nelle quattro differenti fonti azotate. La produzione di questo metabolita è espressa come mg di acido fusarico su mg di biomassa fungina. Per ciascun gruppo di istogrammi, a lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$ (Tukey's test), dove non riportate non sono state osservate differenze significative.

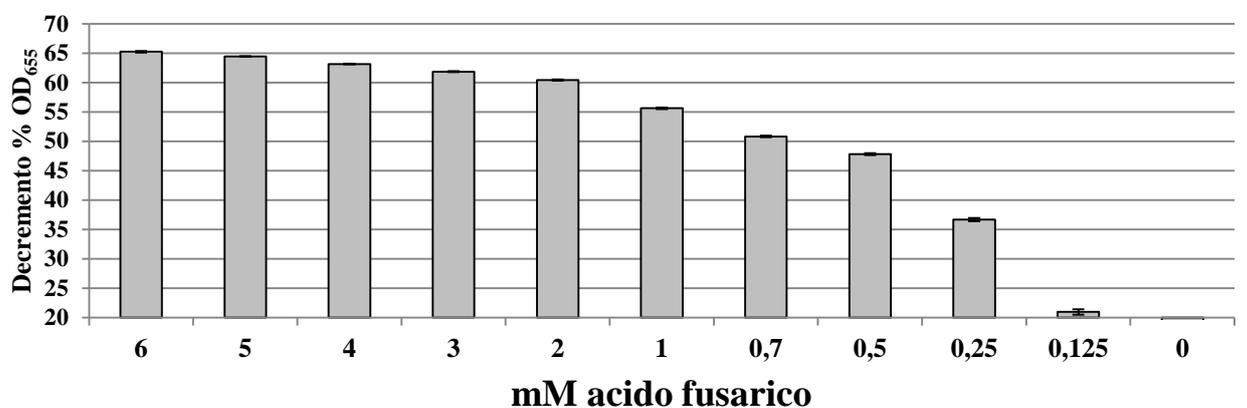


Figura 63. Capacità chelante dell'acido fusarico.

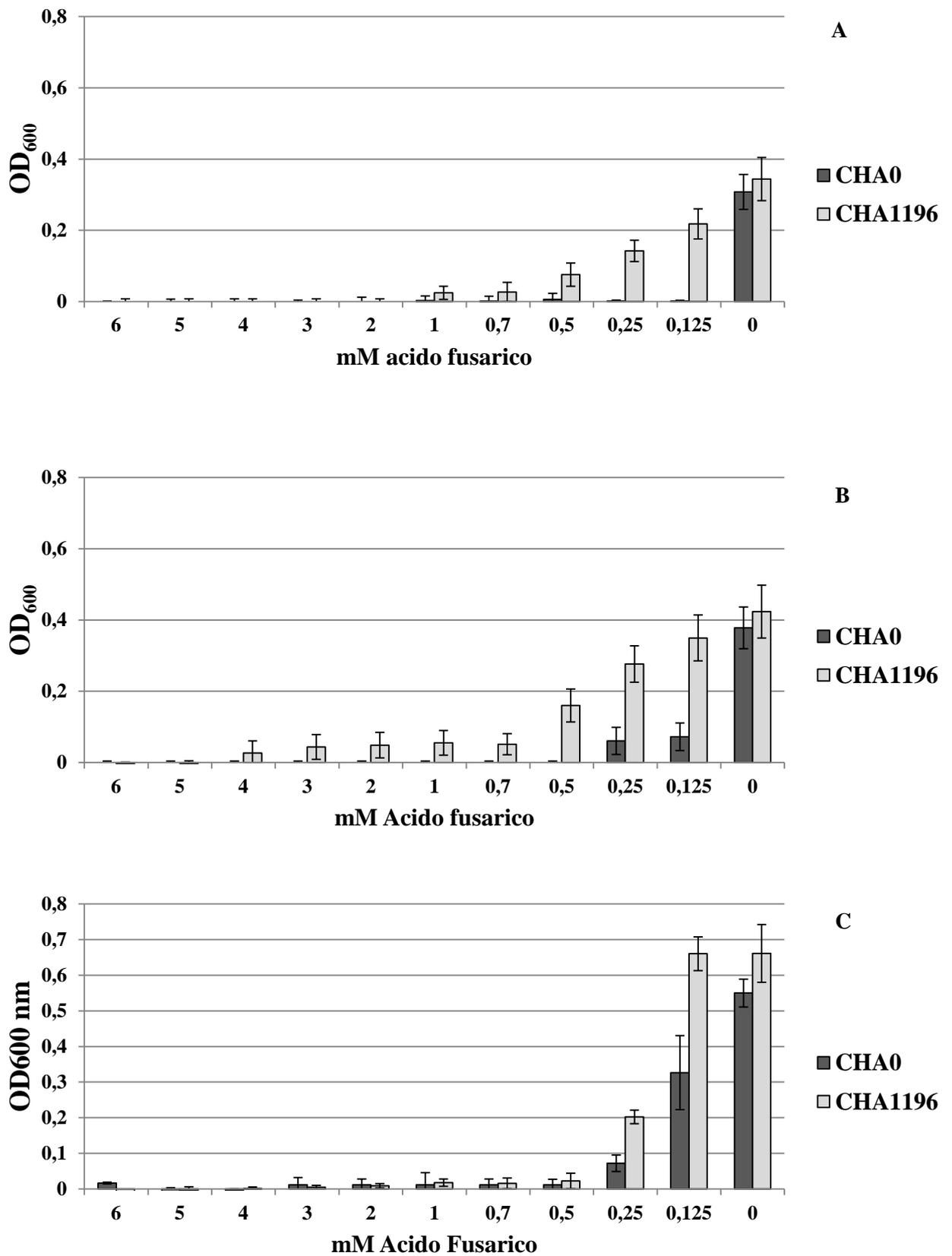


Figura 64. Crescita dei ceppi di *P. fluorescens* CHA0 e CHA1196 in presenza di concentrazioni crescenti di acido fusarico. L'accrescimento batterico è stato valutato in MMU, (B) MMU con pioverdina, (C) MMU con FeCl₃. Le barre indicano la deviazione standard dalla media utilizzando 3 repliche per trattamento.

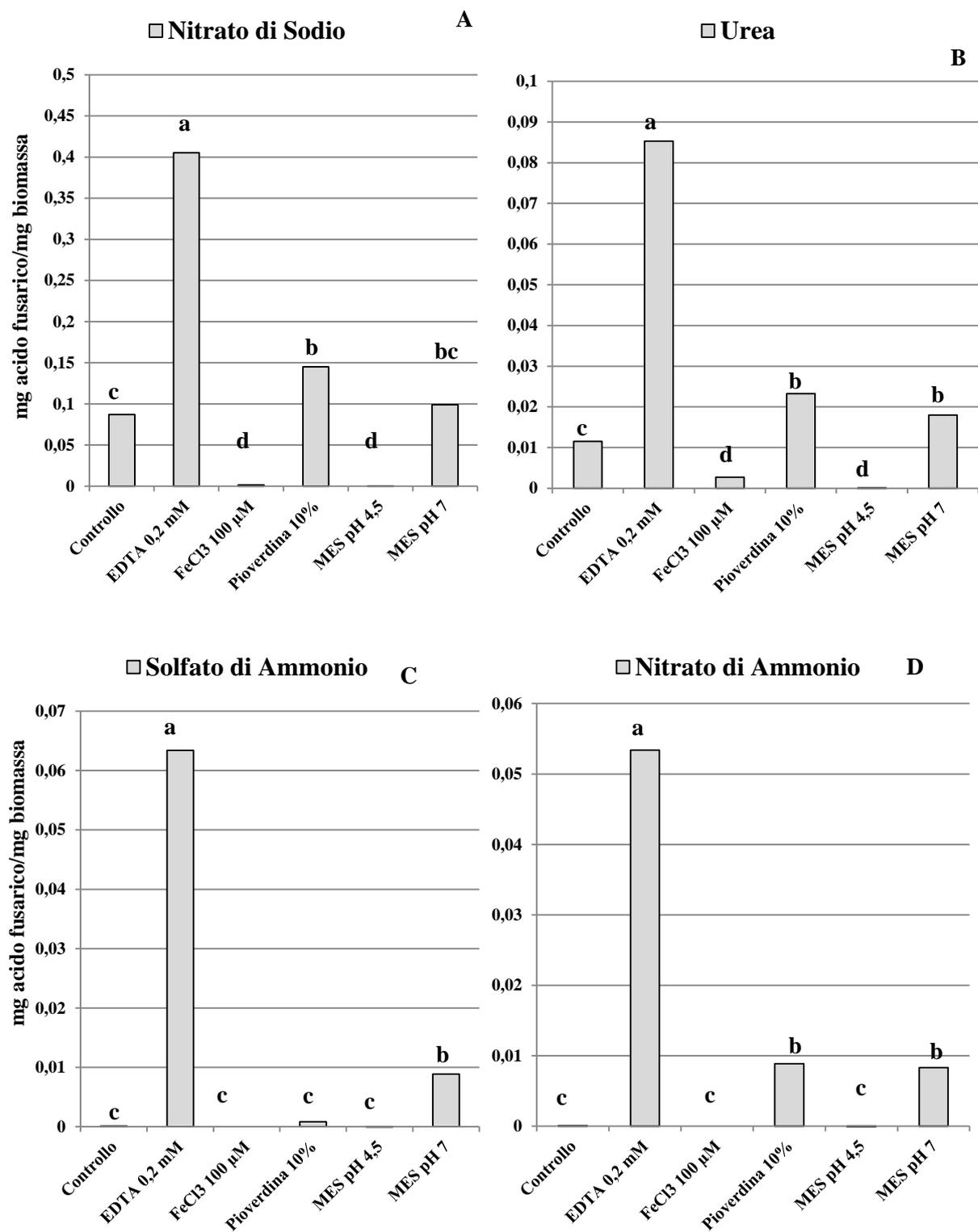


Figura 65. Acido fusarico prodotto da *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ceppo wild type in MMNS (A), MMU (B), MMSA (C) e MMNA (D) in presenza di EDTA, FeCl₃, pioverdina; MES 100mM pH 4,5 e MES 100 mM pH 7. A lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$ (Tukey's test).

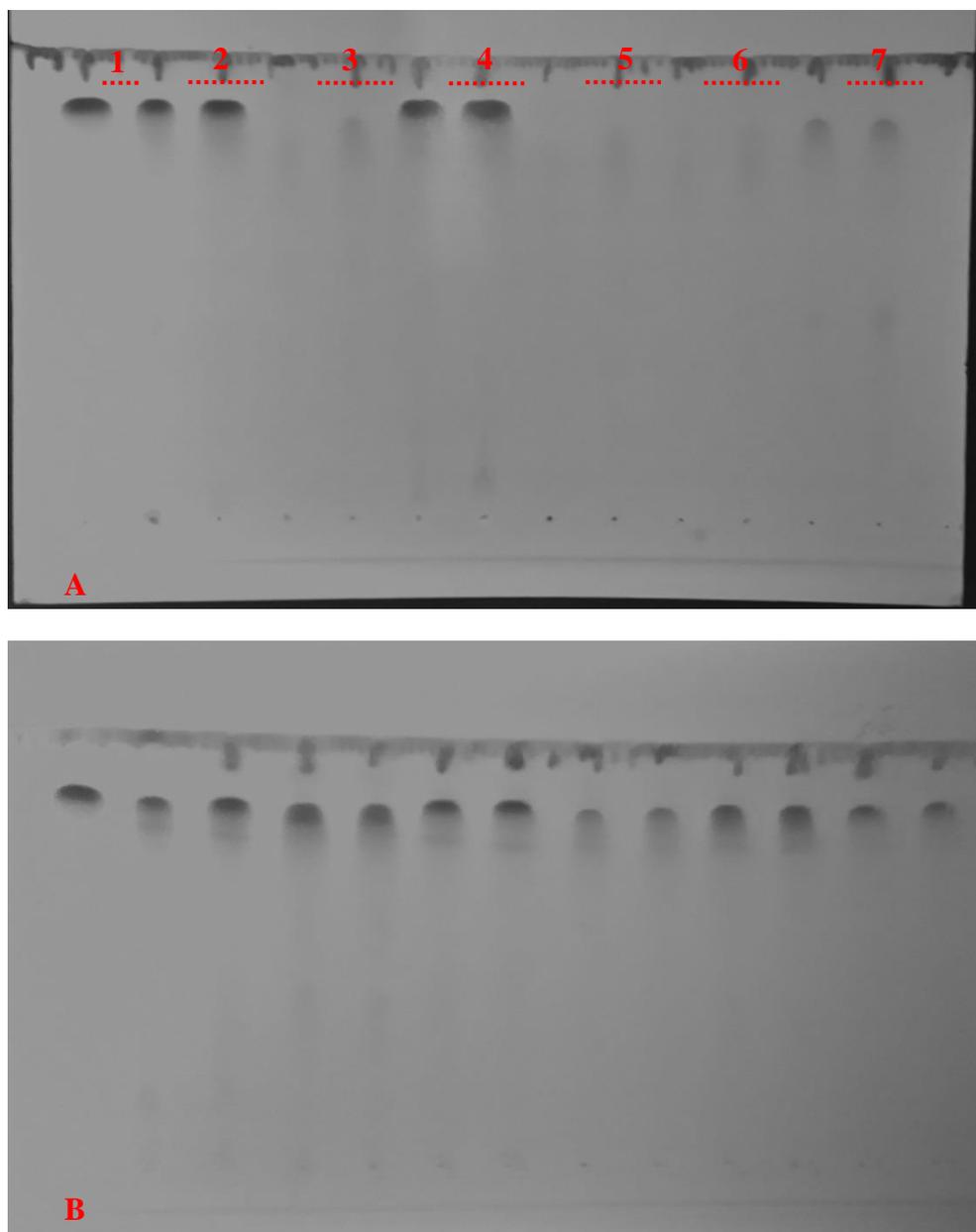


Figura 66. TLC degli estratti in etilacetato dei ceppi di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ceppo *wild type* (A) e ceppo $\Delta hapX$ (B); coltivati in: (2) MMU; (3) MMU + MES pH 4,5; (4) MMNS; (5) MMNS + MES pH 4,5; (6) MMSA; (7) MMSA + MES pH 7. In posizione 1 lo standard di acido fusarico 1 mg ml⁻¹.

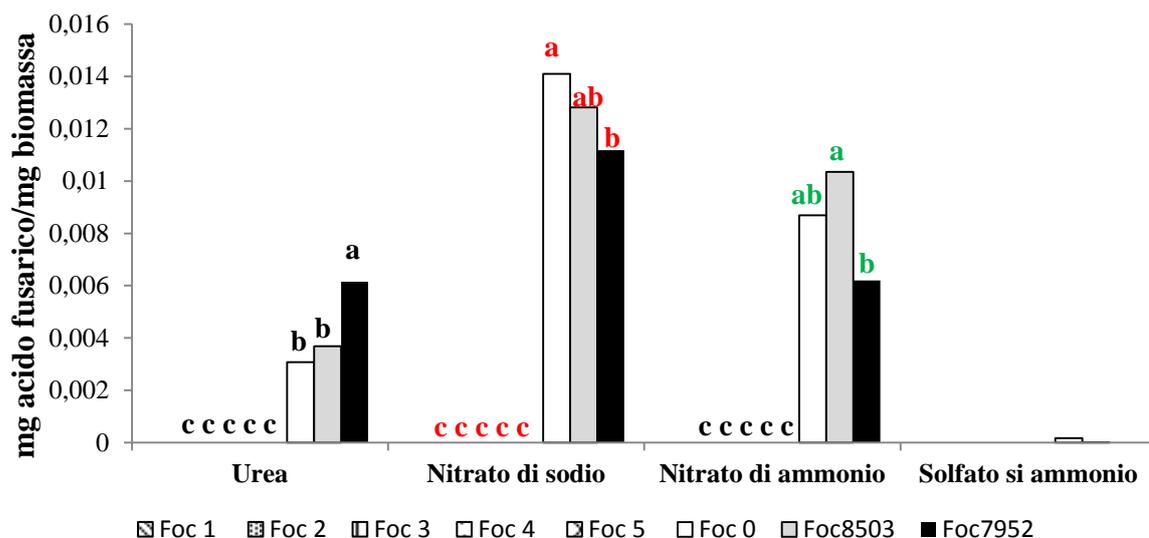


Figura 67. Produzione di acido fusarico da parte dei ceppi fungini saggiati al termine di sette giorni di incubazione nelle quattro differenti fonti azotate. La produzione di questo metabolita è espressa come mg di acido fusarico su mg di biomassa fungina. Per ciascun gruppo di istogrammi, a lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti tra loro per $p \leq 0,05$ (Tukey's test), dove non riportate non sono state osservate differenze significative.

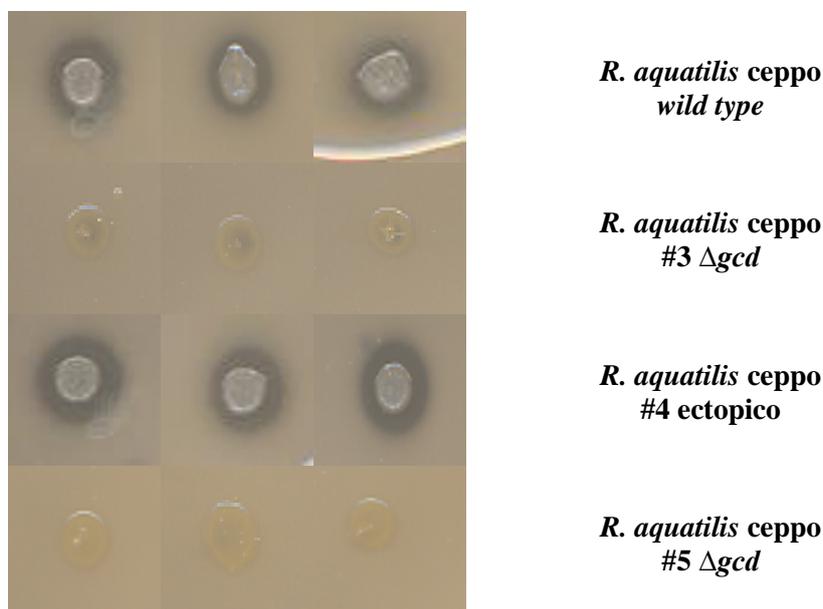


Figura 68. Saggio di solubilizzazione del fosforo su substrato agarizzato NBRIP. Fenotipi dei ceppi wild type e mutanti di *R. aquatilis* in presenza di fosforo tricalcico. La secrezione di acidi organici (prevalentemente acido gluconico) a livello extra-cellulare produce la comparsa di un alone trasparente (ceppi wild type e #4), la mutazione nel gene Gcd comporta la perdita di tale capacità (#3 e #5).

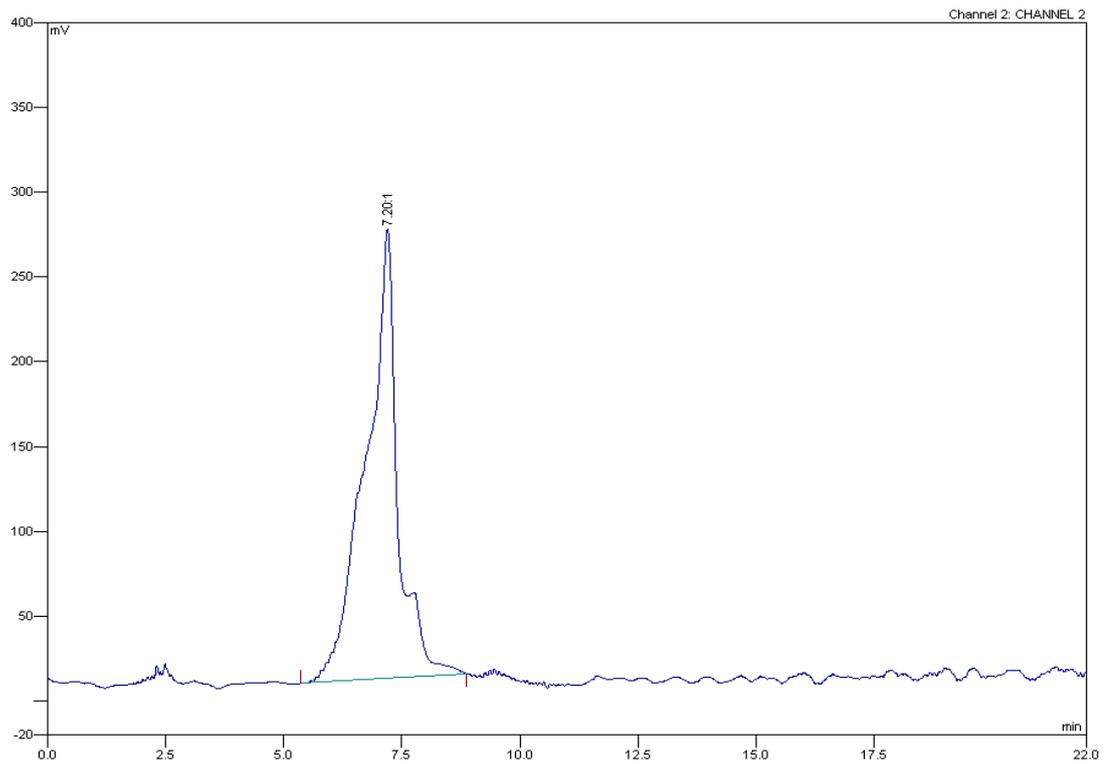


Figura 69. Cromatogramma HPLC dello standard molecolare dell'acido fusarico ($0,2 \text{ mg ml}^{-1}$) in metanolo 100%, tempo di ritenzione 7,20 minuti.

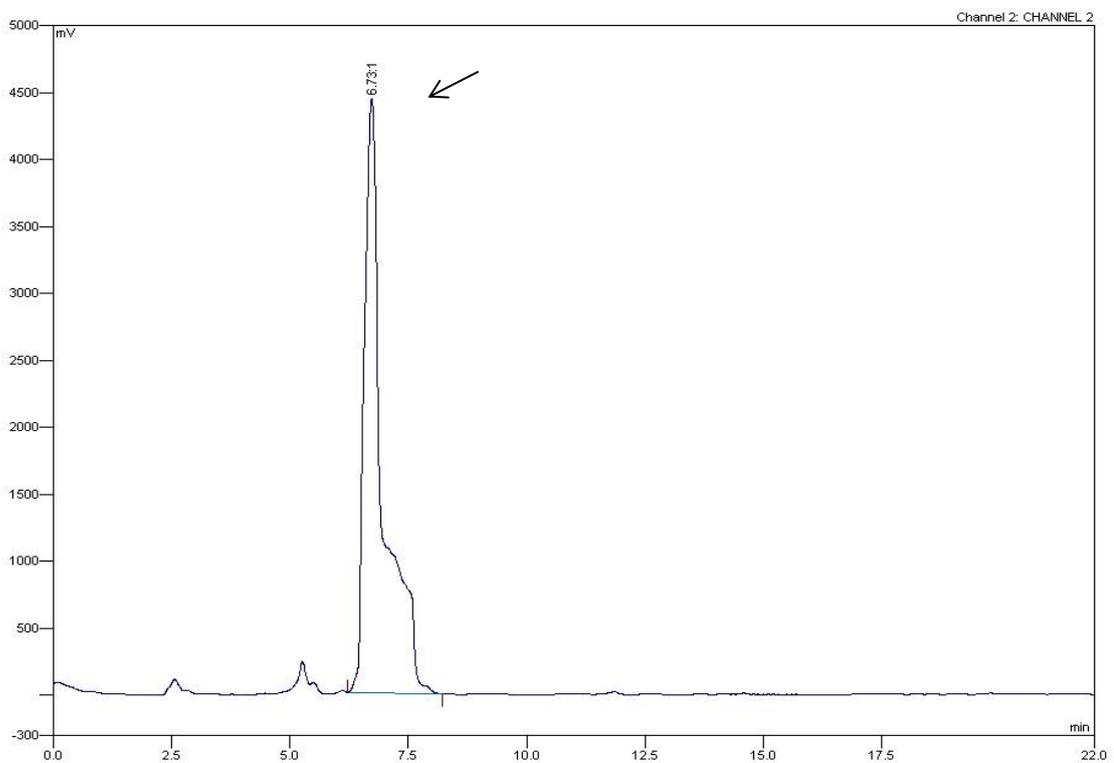


Figura 70. Cromatogramma HPLC dell'estratto organico, dal brodo di coltura in MMNS, del ceppo *wild type* di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. La freccia indica il picco corrispondente all'acido fusarico. Tempo di ritenzione 6,73 minuti

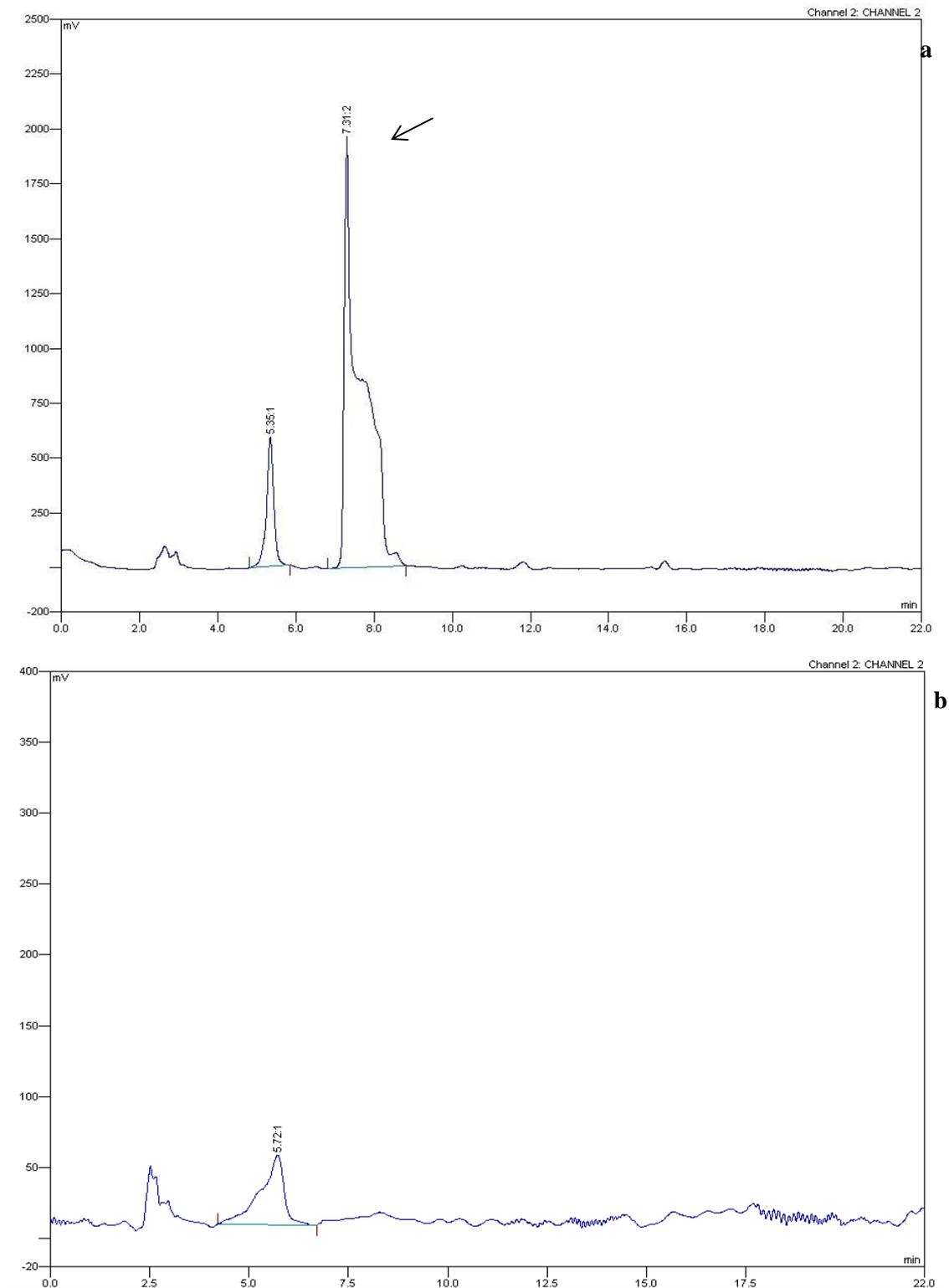


Figura 71. Cromatogrammi HPLC dell'estratto organico, dal brodo di coltura in MMU (a) e MMSA (b), del ceppo *wild type* di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. La freccia indica il picco corrispondente all'acido fusarico. Tempo di ritenzione 7,31 minuti (a); manca il picco dell'acido fusarico (b).

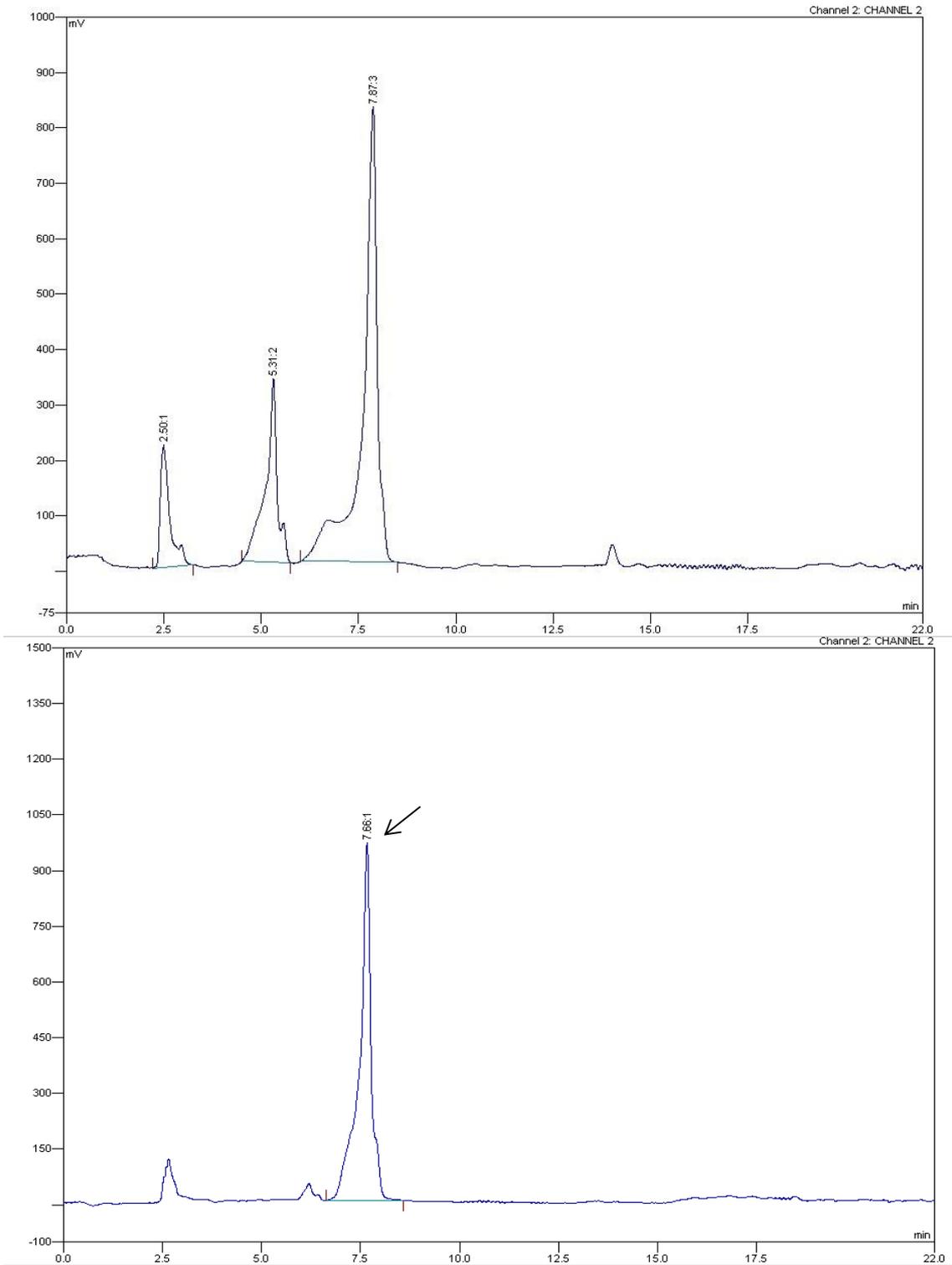


Figura 72. Cromatogrammi HPLC dell'estratto organico, dal brodo di coltura in MMU (a) e MMNS (b), del ceppo $\Delta hapX$ di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Le frecce indicano i picchi corrispondenti all'acido fusarico. Tempo di ritenzione 7,87 (a) e 7,66 (b).

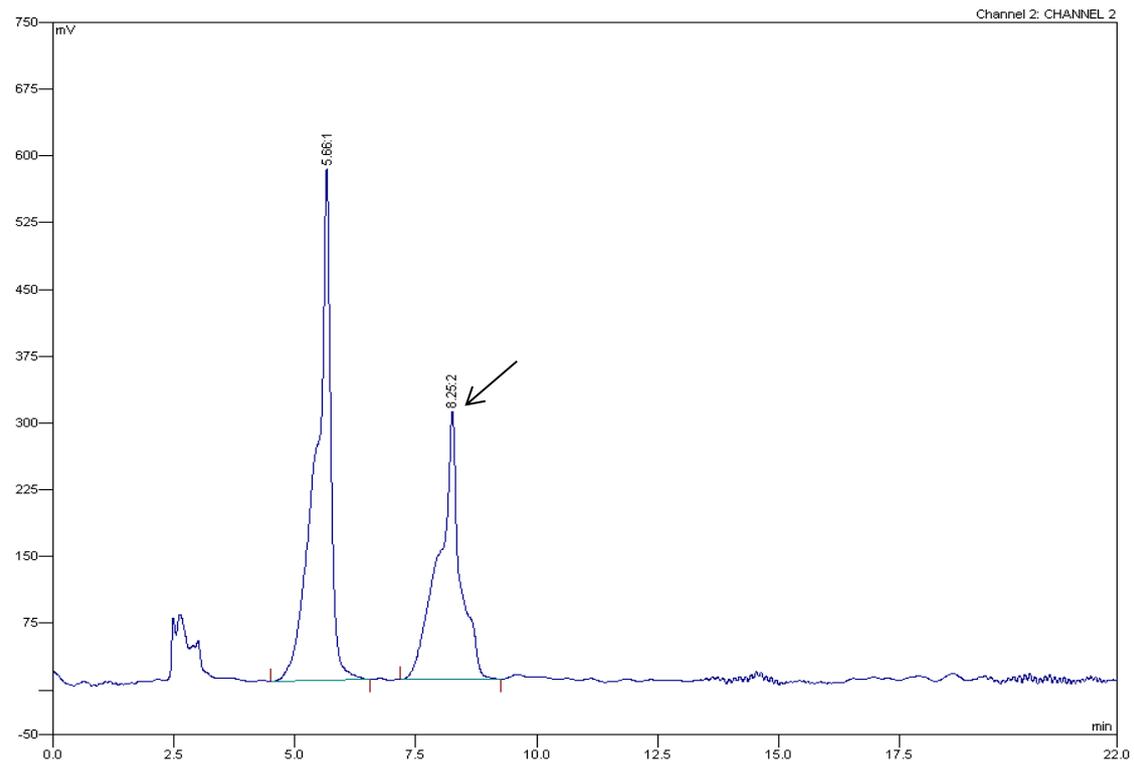


Figura 73. Cromatogramma HPLC dell'estratto organico, dal brodo di coltura in MMSA, del ceppo $\Delta hapx$ di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. La freccia indica il picco corrispondente all'acido fusarico. Tempo di ritenzione 8,25 minuti.

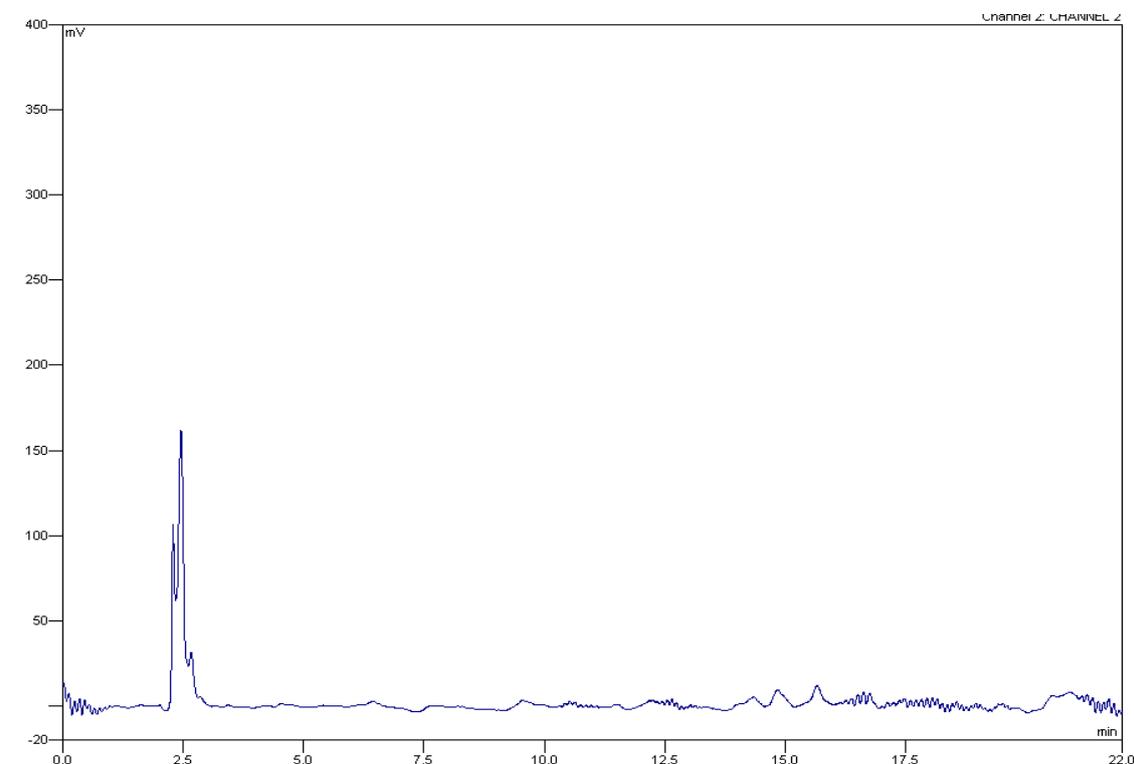


Figura 74. Cromatogramma HPLC dell'estratto organico, dal brodo di coltura in MMSA, del ceppo #8 di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Manca il picco dell'acido fusarico.

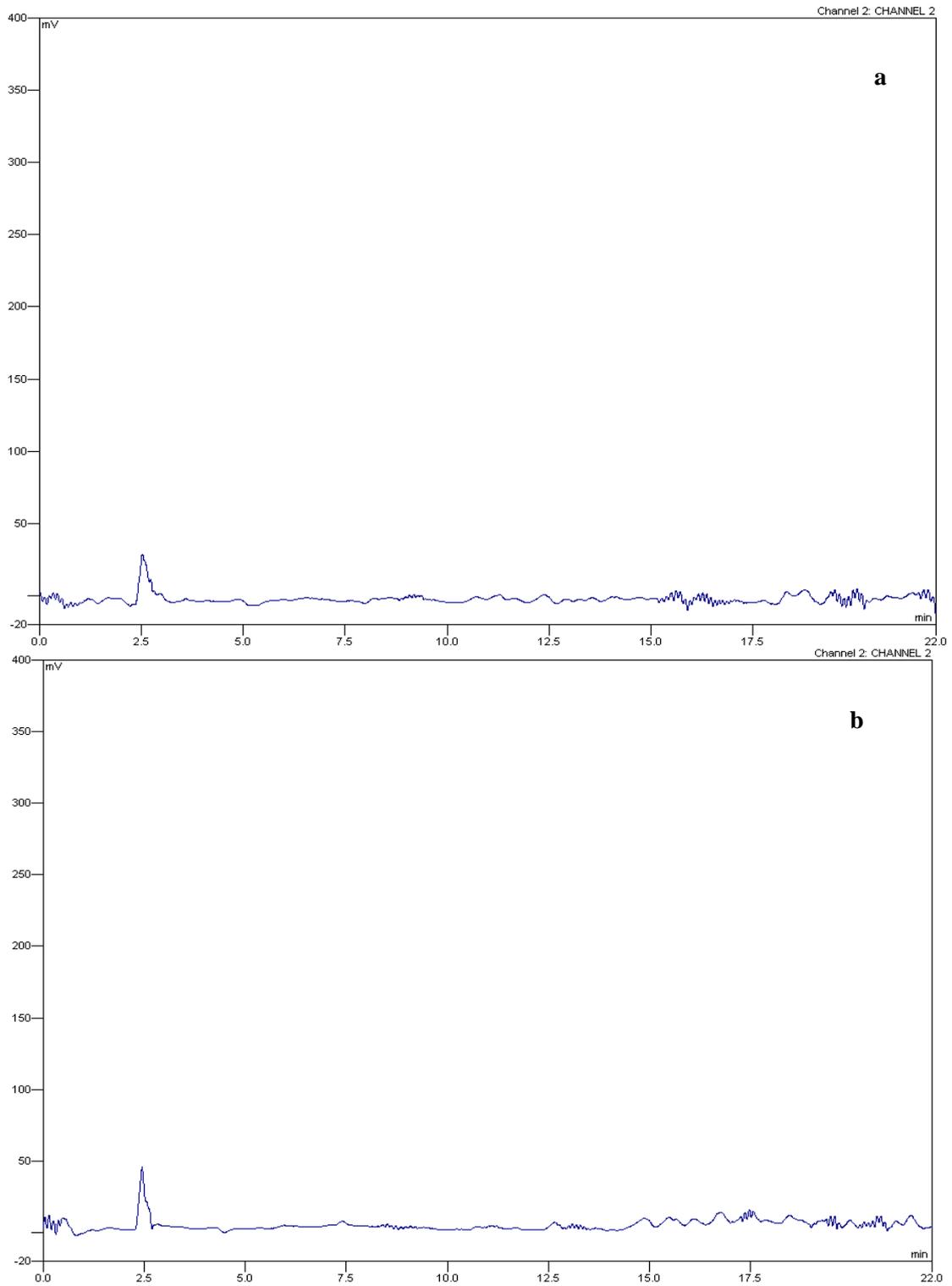


Figura 75. Cromatogrammi HPLC dell'estratto organico, dal brodo di coltura in MMU (a) e MMNS (b), del ceppo #8 di *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. In entrambe i casi manca il picco dell'acido fusarico.

Bibliografia

- Abbas H, Mirocha C, Gunther R, 1989. Mycotoxins produced by toxic *Fusarium* isolates obtained from agricultural and nonagricultural areas (Arctic) of Norway. *Mycopathologia* **105**, 143-51.
- Alkan N, Fluhr R, Sherman A, Prusky D, 2008. Role of Ammonia Secretion and pH Modulation on Pathogenicity of *Colletotrichum coccodes* on Tomato Fruit. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 1058-66.
- Amalfitano C, Pengue R, Andolfi A, Vurro M, Zonno MC, Evidente A, 2002. HPLC analysis of fusaric acid, 9,10-dehydrofusaric acid and their methyl esters, toxic metabolites from weed pathogenic *Fusarium* species. *Phytochemical Analysis* **13**, 277-82.
- Antoun H, Prévost D, 2006. Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: Siddiqui Z, ed. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer Netherlands, 1-38.
- Aranda J, Poza M, Pardo B G, Rumbo S, Rumbo C, Parreira J R, Rodríguez-Velo P, Bou G, 2010. A rapid and simple method for constructing stable mutants of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiology* **10**:279.
- Arias JA, 1985. Secretory organelle and mitochondrial alterations induced by fusaric acid in root cells of *Zea mays*. *Physiological Plant Pathology* **27**, 149-58.
- Asghar H, Zahir Z, Arshad M, Khaliq A, 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils* **35**, 231-7.
- Bacilio-Jiménez M, Aguilar-Flores S, Ventura-Zapata E, Pérez-Campos E, Bouquelet S, Zenteno E, 2003. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and Soil* **249**, 271-7.
- Bacon C, Porter J, Norred W, 1995. Toxic interaction of fumonisin B1 and fusaric acid measured by injection into fertile chicken egg. *Mycopathologia* **129**, 29-35.
- Bacon CW, Hinton DM, Hinton A, 2006. Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavensis* and other biocontrol *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology* **100**, 185-94.
- Bacon CW, Porter JK, Norred WP, Leslie JF, 1996. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 4039-43.
- Baehler E, Bottiglieri M, Péchy-Tarr M, Maurhofer M, Keel C, 2005. Use of green fluorescent protein-based reporters to monitor balanced production of antifungal compounds in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 24-38.
- Bais HP, Walker TS, Schweizer HP, Vivanco JM, 2002. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant physiology and biochemistry* **40**, 983-95.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM, 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 233-66.
- Bell AA, Wheeler MH, Liu J, Stipanovic RD, Puckhaber LS, Orta H, 2003. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service studies on polyketide toxins of *Fusarium oxysporum* f sp *vasinfectum*: potential targets for disease control. *Pest Management Science* **59**, 736-47.
- Bhattacharyya PN, Jha DK, 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**, 1327-50.
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ, 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 343-50.
- Bouarab K, Melton R, Peart J, Baulcombe D, Osbourn A, 2002. A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* **418**, 889-92.
- Bouizgarne B, El-Maarouf-Bouteau H, Frankart C, et al., 2006. Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: toxic and signalling effects. *New Phytologist* **169**, 209-18.

- Calvo J, Calvente V, De Orellano ME, Benuzzi D, Sanz De Tosetti MI, 2007. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *International Journal of Food Microbiology* **113**, 251-7.
- Caracuel Z, Roncero MIG, Espeso EA, González-Verdejo CI, García-Maceira FI, Di Pietro A, 2003. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Microbiology* **48**, 765-79.
- Cazorla FM, Duckett SB, Bergström ET, et al., 2006. Biocontrol of Avocado Dematophora Root Rot by Antagonistic *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 Correlates With the Production of 2-Hexyl 5-Propyl Resorcinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 418-28.
- Chamberlain WJ, Bacon CW, Norred WP, Voss KA, 1993. Levels of fumonisin B1 in corn naturally contaminated with aflatoxins. *Food and Chemical Toxicology* **31**, 995-8.
- Chang CL, Jeong J, Shin JH, Lee EY, Son HC, 1999. *Rahnella aquatilis* Sepsis in an Immunocompetent Adult. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 4161-2.
- Chawla HS, Wenzel G, 1987. In vitro Selection for Fusaric Acid Resistant Barley Plants. *Plant Breeding* **99**, 159-63.
- Chelkowski J, Zawadzki M, Zajkowski P, Logrieco A, Bottalico A, 1990. Moniliformin production by *Fusarium* species. *Mycotoxin Research* **6**, 41-5.
- Cheng H-R, Jiang N, 2006. Extremely Rapid Extraction of DNA from Bacteria and Yeasts. *Biotechnology Letters* **28**, 55-9.
- Chin-a-Woeng TFC, Bloemberg GV, Van Der Bij AJ, et al., 1998. Biocontrol by Phenazine-1-carboxamide-Producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of Tomato Root Rot Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 1069-77.
- Cole RJ, Kirksey JW, Cutler HG, Douppnik BL, Peckham JC, 1973. Toxin from *Fusarium moniliforme*: Effects on Plants and Animals. *Science* **179**, 1324-6.
- Colombo C, Palumbo G, He J-Z, Pinton R, Cesco S, 2014. Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal of Soils and Sediments* **14**, 538-48.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA, 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 4951-9.
- Cook RJ, 1988. Biological control and holistic plant-health care in agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture* **3**, 51-62.
- Cook RJ, Baker KF, 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. *American Phytopathological Society*.
- Cornelis P, Matthijs S, 2002. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environmental Microbiology* **4**, 787-98.
- Couillerot O, Prigent-Combaret C, Caballero-Mellado J, Moëne-Loccoz Y, 2009. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology* **48**, 505-12.
- Couteaudier Y, Alabouvette C, 1990. Survival and inoculum potential of conidia and chlamydozoospores of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* in soil. *Canadian Journal of Microbiology* **36**, 551-6.
- Criscitello MF, Dickman MB, Samuel JE, De Figueiredo P, 2013. Tripping on Acid: Trans-Kingdom Perspectives on Biological Acids in Immunity and Pathogenesis. *PLoS Pathog* **9**, e1003402.
- Crutcher F, Liu J, Puckhaber L, 2014. Conversion of Fusaric Acid to Fusarinol by *Aspergillus tubingensis*: A Detoxification Reaction. *Journal of Chemical Ecology* **40**, 84-9.
- Cullimore DR, Woodbine M, 1963. A Rhizosphere Effect of the Pea Root on Soil Algae. *Nature* **198**, 304-5.
- Currier WW, Strobel GA, 1976. Chemotaxis of *Rhizobium* spp. to Plant Root Exudates. *Plant Physiology* **57**, 820-3.

- D'Alton A, Etherton B, 1984. Effects of Fusaric Acid on Tomato Root Hair Membrane Potentials and ATP Levels. *Plant Physiology* **74**, 39-42.
- Davidzon M, Alkan N, Kobiler I, Prusky D, 2010. Acidification by gluconic acid of mango fruit tissue during colonization via stem end infection by *Phomopsis mangiferae*. *Postharvest Biology and Technology* **55**, 71-7.
- De Bruijn I, De Kock MJD, Yang M, De Waard P, Van Beek TA, Raaijmakers JM, 2007. Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Molecular Microbiology* **63**, 417-28.
- De Curtis F, Palmieri D, Vitullo D, Lima G, 2014. First Report of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* as Causal Agent of Root and Crown Rot on Chickpea (*Cicer arietinum*) in Southern Italy. *Plant Disease* **98**, 995-.
- De Vleeschauwer D, Djavaheri M, Bakker PaHM, Höfte M, 2008. *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-Induced Systemic Resistance in Rice against *Magnaporthe oryzae* Is Based on Pseudobactin-Mediated Priming for a Salicylic Acid-Repressible Multifaceted Defense Response. *Plant Physiology* **148**, 1996-2012.
- De Weert S, Kuiper I, Lagendijk EL, Lamers GEM, Lugtenberg BJJ, 2004. Role of Chemotaxis Toward Fusaric Acid in Colonization of Hyphae of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 1185-91.
- De Weert S, Vermeiren H, Mulders IHM, et al., 2002. Flagella-Driven Chemotaxis Towards Exudate Components Is an Important Trait for Tomato Root Colonization by *Pseudomonas fluorescens* . *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 1173-80.
- De Weger LA, Van Der Vlugt CI, Wijffjes AH, Bakker PA, Schippers B, Lugtenberg B, 1987. Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *Journal of Bacteriology* **169**, 2769-73.
- De Werra P, Péchy-Tarr M, Keel C, Maurhofer M, 2009. Role of Gluconic Acid Production in the Regulation of Biocontrol Traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 4162-74.
- De Wit PJGM, Mehrabi R, Van Den Burg HA, Stergiopoulos I, 2009. Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular Plant Pathology* **10**, 735-47.
- Desjardins AE, Hohn TM, McCormick SP, 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiological Reviews* **57**, 595-604.
- Di Pietro A, García-Maceira FI, Méglecz E, Roncero MIG, 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology* **39**, 1140-52.
- Di Pietro A, Roncero M, Roldán M, 2009. From Tools of Survival to Weapons of Destruction: The Role of Cell Wall-Degrading Enzymes in Plant Infection. In: Deising H, ed. *Plant Relationships*. Springer Berlin Heidelberg, 181-200. (The Mycota; vol. 5.)
- Ding Z, Li M, Sun F, et al., 2015. Mitogen-Activated Protein Kinases Are Associated with the Regulation of Physiological Traits and Virulence in *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *PLoS ONE* **10**, e0122634.
- Dixon KP, Xu J-R, Smirnov N, Talbot NJ, 1999. Independent Signaling Pathways Regulate Cellular Turgor during Hyperosmotic Stress and Appressorium-Mediated Plant Infection by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* **11**, 2045-58.
- Dong X, Ling N, Wang M, Shen Q, Guo S, 2012. Fusaric acid is a crucial factor in the disturbance of leaf water imbalance in *Fusarium*-infected banana plants. *Plant physiology and biochemistry* **60**, 171-
- Doombos R, Van Loon L, Bakker PHM, 2012. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**, 227-43.
- Dowd PF, 1988. Toxicological and biochemical interactions of the fungal metabolites fusaric acid and kojic acid with xenobiotics in *Heliothis zea* (F.) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **32**, 123-34.

- Duffy BK, Défago G, 1997. Zinc Improves Biocontrol of *Fusarium* Crown and Root Rot of Tomato by *Pseudomonas fluorescens* and Represses the Production of Pathogen Metabolites Inhibitory to Bacterial Antibiotic Biosynthesis. *Phytopathology* **87**, 1250-7.
- Emmert EaB, Klimowicz AK, Thomas MG, Handelsman J, 2004. Genetics of Zwittermicin A Production by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 104-13.
- Eshel D, Miyara I, Ailing T, Dinooor A, Prusky D, 2002. pH Regulates Endoglucanase Expression and Virulence of *Alternaria alternata* in Persimmon Fruit. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 774-9.
- Fagard M, Launay A, Clément G, et al., 2014. Nitrogen metabolism meets phytopathology. *Journal of Experimental Botany*.
- Fan B, Carvalhais L, Becker A, Fedoseyenko D, Von Wiren N, Borriss R, 2012. Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiology* **12**, 116.
- Farman ML, Eto Y, Nakao T, et al., 2002. Analysis of the Structure of the AVR1-CO39 Avirulence Locus in Virulent Rice-Infecting Isolates of *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 6-16.
- Farrar J, Hawes M, Jones D, Lindow S, 2003. How roots control the flux of carbon to the rhizosphere. *Ecology* **84**, 827-37.
- Fenton AM, Stephens PM, Crowley J, O'callaghan M, O'gara F, 1992. Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3873-8.
- Flor HH, 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 275-96.
- Gapillout I, Milat ML, Blein JP, 1996. Effects of fusaric acid on cells from tomato cultivars resistant or susceptible to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 127-32.
- Gaumann E, 1957. Fusaric acid as a wilt toxin. *Phytopathology* **47**.
- Gaumann E, Roth S, Ettliger L, Plattner PA, Nager U, 1947. Ionophore antibiotics produced by the fungus *Fusarium orthoceras* var. *enniatum* and other Fusaria. **3**, 202.
- Gaworzewska ET, Carlile MJ, 1982. Positive Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other Bacteria towards Root Exudates from Legumes and other Plants. *Microbiology* **128**, 1179-88.
- Gevers D, Knight R, Petrosino JF, et al., 2012. The Human Microbiome Project: A Community Resource for the Healthy Human Microbiome. *PLoS Biol* **10**, e1001377.
- Glick BR, 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **41**, 109-17.
- Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Cheng Z, Duan J, Mcconkey B, 2007. Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences* **26**, 227-42.
- Gonzales MF, Brooks T, Pukatzki SU, Provenzano D, 2013. Rapid Protocol for Preparation of Electrocompetent *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. e50684.
- Gray EJ, Smith DL, 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 395-412.
- Guarro J, Gené J, 1995. Opportunistic fusarial infections in humans. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **14**, 741-54.
- Guo Y, Jiao Z, Li L, et al., 2012. Draft Genome Sequence of *Rahnella aquatilis* Strain HX2, a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Isolated from Vineyard Soil in Beijing, China. *Journal of Bacteriology* **194**, 6646-7.
- Guo YB, Li J, Li L, et al., 2009. Mutations That Disrupt Either the pqq or the gdh Gene of *Rahnella aquatilis* Abolish the Production of an Antibacterial Substance and Result in Reduced Biological Control of Grapevine Crown Gall. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 6792-803.

- Haas D and Keel C, 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology* **41**, 117-53.
- Haas D, Defago G, 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Micro* **3**, 307-19.
- Hadas Y, Goldberg I, Pines O, Prusky D, 2007. Involvement of Gluconic Acid and Glucose Oxidase in the Pathogenicity of *Penicillium expansum* in Apples. *Phytopathology* **97**, 384-90.
- Handelsman J, Stabb EV, 1996. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The Plant Cell* **8**, 1855-69.
- Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao X, 2000. The role of root border cells in plant defense. *Trends in Plant Science* **5**, 128-33.
- Hidaka H, Nagatsu T, Takeya K, 1969. Fusaric acid, a hypotensive agent produced by fungi. *The Journal of Antibiotics* **22**, 228-30.
- Hoegy F, Mislin GLA, Schalk IJ, 2014. Pyoverdine and Pyochelin Measurements. In: Filloux A, Ramos J-L, eds. *Pseudomonas Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York, 293-301.
- Höfte M, Bakker PHM, 2007. Competition for Iron and Induced Systemic Resistance by Siderophores of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: Varma A, Chincholkar S, eds. *Microbial Siderophores*. Springer Berlin Heidelberg, 121-33. (Soil Biology; vol. 12.).
- Iavicoli A, Boutet E, Buchala A, Métraux J-P, 2003. Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* in Response to Root Inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 851-8.
- Igbaria A, Lev S, Rose MS, et al., 2008. Distinct and Combined Roles of the MAP Kinases of *Cochliobolus heterostrophus* in Virulence and Stress Responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 769-80.
- Jones JDG, Dangl JL, 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323-9.
- Jousset A, Schuldes J, Keel C, et al., 2014. Full-Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Pseudomonas protegens* CHA0. *Genome Announcements* **2**.
- Jullien M, 1988. Effects of the *Fusarium* spp toxins and selection of crude toxin resistant strains in mesophyll cell cultures of asparagus officinalis. *Plant Physiology & Biochemistr* **26**, 713-22.
- Kamilova F, Kravchenko LV, Shaposhnikov AI, Azarova T, Makarova N, Lugtenberg B, 2006. Organic Acids, Sugars, and l-Tryptophane in Exudates of Vegetables Growing on Stonewool and Their Effects on Activities of Rhizosphere Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 250-6.
- Kang S, Demers J, Del Mar Jimenez-Gasco M, Rep M, 2014. *Fusarium oxysporum*. *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens*. Springer Berlin Heidelberg, 99-119.
- Karaffa L, Kubicek C, 2003. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**, 189-96.
- Kaur R, Macleod J, Foley W, Nayudu M, 2006. Gluconic acid: An antifungal agent produced by *Pseudomonas* species in biological control of take-all. *Phytochemistry* **67**, 595-604.
- Keel C, Schnider U., Maurhofer M., et al., 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucino. *Mol. Plant-Microbe Interact* **5**, 4-13.
- Kelly A, Alcalá-Jiménez A R, Bainbridge B W, Heale J B, Pérez-Artes E, 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology* **84**: 1293-1298.
- Jimenez-Diaz, R.M.** Khaimar NP, Misra HS, Apte SK, 2003. Pyrroloquinoline–quinone synthesized in *Escherichia coli* by pyrroloquinoline–quinone synthase of *Deinococcus radiodurans* plays a role beyond mineral phosphate solubilization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **312**, 303-8.
- Kim KY, Jordan D, Krishnan HB, 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiology Letters* **153**, 273-7.

- Kim KY, Jordan D, Krishnan HB, 1998. Expression of genes from *Rahnella aquatilis* that are necessary for mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **159**, 121-7.
- Kim YT, Prusky DOV, Rollins JA, 2007. An activating mutation of the *Sclerotinia sclerotiorum* *pac1* gene increases oxalic acid production at low pH but decreases virulence. *Molecular Plant Pathology* **8**, 611-22.
- Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN, 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* **286**, 885-6.
- Knogge W, 1996. Fungal Infection of Plants. *The Plant Cell* **8**, 1711-22.
- Kono Y, Yamamoto H, Takeuchi M, Komada H, 1995. Alterations in superoxide dismutase and catalase in *Fusarium oxysporum* during starvation-induced differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1268**, 35-40.
- Kosawang C, Karlsson M, Véléz H, et al., 2014. Zearalenone detoxification by zearalenone hydrolase is important for the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* against mycotoxigenic *Fusarium graminearum*. *Fungal Biology* **118**, 364-73.
- Kuźniak E, Patykowski J, Urbanek H, 1999. Involvement of the Antioxidative System in Tomato Response to Fusaric Acid Treatment. *Journal of Phytopathology* **147**, 385-90.
- Lacava PT, Silva-Stenico ME, Araújo WL, et al., 2008. Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **43**, 521-8.
- Landa BB, Cachinero-Díaz JM, Lemanceau P, Jiménez-Díaz RM, Alabouvette C, 2002. Effect of fusaric acid and phytoanticipins on growth of rhizobacteria and *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Microbiology* **48**, 971-85.
- Leeman M., Van Pelt J. A., Ouden F. M. D., Heinsbroek M., Bakker P. A. H. M., Schippers B., 1995. Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *American Phytopathological Society* **85**, 1021-7.
- Leslie JF, Summerell BA, 2006. *Fusarium* laboratory workshops—A recent history. *Mycotoxin Research* **22**, 73-4.
- Li L, Jiao Z, Hale L, Wu W, Guo Y, 2014. Disruption of Gene *pqqA* or *pqqB* Reduces Plant Growth Promotion Activity and Biocontrol of Crown Gall Disease by *Rahnella aquatilis* HX2. *PLoS ONE* **9**, e115010.
- Li YC, Ledoux DR, Bermudez AJ, Fritsche KL, Rottinghaust GE, 2000. Effects of moniliformin on performance and immune function of broiler chicks. *Poultry Science* **79**, 26-32.
- Liu D, Lian B, Dong H, 2012. Isolation of *Paenibacillus* sp. and Assessment of its Potential for Enhancing Mineral Weathering. *Geomicrobiology Journal* **29**, 413-21.
- Logrieco A, Moretti A, Castella G, et al., 1998. Beauvericin Production by *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3084-8.
- Loper JE, Henkels MD, 1999. Utilization of Heterologous Siderophores Enhances Levels of Iron Available to *Pseudomonas putida* in the Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 5357-63.
- López-Berges MS, Capilla J, Turrà D, et al., 2012. HapX-Mediated Iron Homeostasis Is Essential for Rhizosphere Competence and Virulence of the Soilborne Pathogen *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell* **24**, 3805-22.
- López-Berges MS, Rispail N, Prados-Rosales RC, Di Pietro A, 2010. A Nitrogen Response Pathway Regulates Virulence Functions in *Fusarium oxysporum* via the Protein Kinase TOR and the bZIP Protein MeaB. *The Plant Cell* **22**, 2459-75.
- Lugtenberg B, Kamilova F, 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* **63**, 541-56.
- Lugtenberg BJ, Chin-a-Woeng TC, Bloemberg G, 2002. Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**, 373-83.

- M'sehli W, Youssefi S, Donnini S, et al., 2008. Root exudation and rhizosphere acidification by two lines of *Medicago ciliaris* in response to lime-induced iron deficiency. *Plant and Soil* **312**, 151-62.
- Malini S, 1966. Heavy Metal Chelates of Fusaric Acid: In vitro Spectrophotometry. *Journal of Phytopathology* **57**, 221-31.
- Manteau S, Abouna S, Lambert B, Legendre L, 2003. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Ecology* **43**, 359-66.
- Maraki S, Samonis G, Marnelakis E, Tselentis Y, 1994. Surgical wound infection caused by *Rahnella aquatilis*. *Journal of Clinical Microbiology* **32**, 2706-8.
- Marasas WFO, Leistner L, Hofmann G, Eckardt C, 1979. Occurrence of toxigenic strains of *Fusarium* in maize and barley in Germany. *European journal of applied microbiology and biotechnology* **7**, 289-305.
- Marrè MT, Vergani P, Albergoni FG, 1993. Relationship between fusaric acid uptake and its binding to cell structures by leaves of *Egeria densa* and its toxic effects on membrane permeability and respiration. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **42**, 141-57.
- Martínez-Viveros O, Jorquera MA, Crowley DE, Gajardo G, Mora ML, 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition* **10**, 293-319.
- Marzano M, Gallo A, Altomare C, 2013. Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* through UV-induced tolerance to fusaric acid. *Biological Control* **67**, 397-408.
- Masachis S, Turrà D, El Ghalid M, Felix G, Richards T A, Di Pietro A, 2015. *Fusarium* Rapid Alkalinization Factor (f-ralf) encodes a secreted virulence effector acquired by horizontal gene transfer from plants. Conference: 28 th Fungal Genetics Conference, At Pacific Grove, CA.
- Matsushita K, Toyama H, Yamada M, Adachi O, 2002. Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 13-22.
- Maurhofer M, Keel C, Haas D, Défago G, 1994. Pyoluteorin production by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 is involved in the suppression of *Pythium* damping-off of cress but not of cucumber. *European Journal of Plant Pathology* **100**, 221-32.
- Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS, 2006. Phenazine Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Biosynthesis and Regulation. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 417-45.
- Meena VS, Maurya BR, Verma JP, et al., 2015. Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): Isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecological Engineering* **81**, 340-7.
- Megnegneau B, Branchard M, 1988. Toxicity of fusaric acid observed on callus cultures of various *Cucumis melo* genotypes. *Plant physiology and biochemistry* **26**, 585-8.
- Mendgen K., Hahn M.A, Deising H, 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 367-86.
- Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM, 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* **37**, 634-63.
- Meulenbergh JJM, Sellink E, Riegman NH, Postma PW, 1992. Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* pqq operon. *Molecular and General Genetics MGG* **232**, 284-94.
- Michielse CB, Rep M, 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* **10**, 311-24.
- Milner JL, Silo-Suh L, Lee JC, He H, Clardy J, Handelsman J, 1996. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 3061-5.
- Miransari M, Smith DL, 2014. Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany* **99**, 110-21.

- Moretti A, Belisario A, Tafuri A, Ritieni A, Corazza L, Logrieco A, 2002. Production of Beauvericin by Different Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, The *Fusarium* Wilt Agent of Muskmelon. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 661-6.
- Navarro-Velasco GY, Prados-Rosales RC, Ortíz-Urquiza A, Quesada-Moraga E, Di Pietro A, 2011. *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* **48**, 1124-9.
- Nelson EB, 2004. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 271-309.
- Nguyen C, 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* **23**, 375-96.
- Nogales Moncada AM, Jiménez Díaz RM, Pérez Artés E, 2009. Vegetative Compatibility Groups in *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* and *F. oxysporum* Non-pathogenic to Chickpea. *Journal of Phytopathology* **157**, 729-35.
- Notz R, Maurhofer M, Dubach H, Haas D, Défago G, 2002. Fusaric Acid-Producing Strains of *Fusarium oxysporum* Alter 2,4-Diacetylphloroglucinol Biosynthetic Gene Expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 In Vitro and in the Rhizosphere of Wheat. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2229-35.
- Nucci M, Anaissie E, 2007. *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients. *Clinical Microbiology Reviews* **20**, 695-704.
- Oldroyd GED, Downie JA, 2008. Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 519-46.
- Ongena M, Jourdan E, Adam A, et al., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology* **9**, 1084-90.
- Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, et al., 2004. *Fusarium oxysporum* as a Multihost Model for the Genetic Dissection of Fungal Virulence in Plants and Mammals. *Infection and Immunity* **72**, 1760-6.
- Palleroni NJ, 2003. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology* **149**, 1-7.
- Pareja-Jaime Y, Roncero MIG, Ruiz-Roldán MC, 2008. Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* Is Required for Full Virulence on Tomato Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 728-36.
- Peñalva MA, Arst HN, 2002. Regulation of Gene Expression by Ambient pH in Filamentous Fungi and Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**, 426-46.
- Peng R-H, Tian Y-S, Xiong A-S, 2012. A Novel 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase from *Rahnella aquatilis* with Significantly Reduced Glyphosate Sensitivity. *PLoS ONE* **7**, e39579.
- Pérez-Miranda S, Cabirol n, George-Téllez R, Zamudio-Rivera L S, and Fernández F J, 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Methods* **70**:127–131
- Pérez-Nadales E, Di Pietro A, 2011. The Membrane Mucin Msb2 Regulates Invasive Growth and Plant Infection in *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell* **23**, 1171-85.
- Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Van Pelt JA, et al., 1998. A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**, 1571-80.
- Porter JK, Bacon CW, Wray EM, Hagler WM, Jr., 1995. Fusaric acid in *Fusarium moniliforme* cultures, corn, and feeds toxic to livestock and the neurochemical effects in the brain and pineal gland of rats. *Nat Toxins* **3**, 91-100.
- Porter JK, Voss KA, Bacon CW, Norred WP, 1990. Effects of *Fusarium moniliforme* and Corn Associated with Equine Leukoencephalomalacia on Rat Neurotransmitters and Metabolites. *Experimental Biology and Medicine* **194**, 265-9.
- Prados Rosales RC, Di Pietro A, 2008. Vegetative Hyphal Fusion Is Not Essential for Plant Infection by *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* **7**, 162-71.
- Prashar P, Kapoor N, Sachdeva S, 2014. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **13**, 63-77.

- Proctor RH, Plattner RD, Brown DW, Seo J-A, Lee Y-W, 2004. Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycological Research* **108**, 815-22.
- Prusky D, Mcevoy JL, Saftner R, Conway WS, Jones R, 2004. Relationship Between Host Acidification and Virulence of *Penicillium* spp. on Apple and Citrus Fruit. *Phytopathology* **94**, 44-51.
- Qi M, Elion EA, 2005. MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science* **118**, 3569-72.
- Qin J, Li R, Raes J, et al., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65.
- Ravikumar RL, Ratna Babu D, 2007. In vitro screening of chickpea genotypes for *Fusarium* wilt resistance through root feeding of pathotoxin. *CURRENT SCIENCE* **93**, 1.
- Rep M, Meijer M, Houterman PM, Van Der Does HC, Cornelissen BJC, 2005. *Fusarium oxysporum* Evades I-3-Mediated Resistance Without Altering the Matching Avirulence Gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 15-23.
- Rep M, Van Der Does HC, Meijer M, et al., 2004. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology* **53**, 1373-83.
- Rodríguez H, Fraga R, 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* **17**, 319-39.
- Roldán-Arjona T, Pérez-Espinosa A, Ruiz-Rubio M, 1999. Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* Defines a New Class of Saponinases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 852-61.
- Rollins JA, Dickman MB, 2001. pH Signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of a pacC/RIM1 Homolog. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 75-81.
- Romano A, Vitullo D, Senatore M, Lima G, Lanzotti V, 2013. Antifungal Cyclic Lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Strain BO5A. *Journal of Natural Products* **76**, 2019-25.
- Römheld V, Müller C, Marschner H, 1984. Localization and Capacity of Proton Pumps in Roots of Intact Sunflower Plants. *Plant Physiology* **76**, 603-6.
- Ruiz JA, Bernar EM, Jung K, 2015. Production of Siderophores Increases Resistance to Fusaric Acid in *Pseudomonas protegens* PF-5. *PLoS ONE* **10**, e0117040.
- Saikia R, Singh T, Kumar R, et al., 2003. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* in chickpea. *Microbiological Research* **158**, 203-13.
- Sapko OA, Utarbaeva AS, Makulbek S, 2011. Effect of fusaric acid on prooxidant and antioxidant properties of the potato cell suspension culture. *Russian Journal of Plant Physiology* **58**, 828-35.
- Scheffknecht S, Mammerler R, Steinkellner S, Vierheilig H, 2006. Root exudates of mycorrhizal tomato plants exhibit a different effect on microconidia germination of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* than root exudates from non-mycorrhizal tomato plants. *Mycorrhiza* **16**, 365-70.
- Schnider-Keel U, Seematter A, Maurhofer M, et al., 2000. Autoinduction of 2,4-Diacetylphloroglucinol Biosynthesis in the Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and Repression by the Bacterial Metabolites Salicylate and Pyoluteorin. *Journal of Bacteriology* **182**, 1215-25.
- Segmüller N, Ellendorf U, Tudzynski B, Tudzynski P, 2007. BcSAK1, a Stress-Activated Mitogen-Activated Protein Kinase, Is Involved in Vegetative Differentiation and Pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryotic Cell* **6**, 211-21.
- Segorbe Luque D, 2015. Mecanismos de señalización por nitrógeno en el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
- Seo J-A, Kim J-C, Lee Y-W, 1996. Isolation and Characterization of Two New Type C Fumonisins Produced by *Fusarium oxysporum*. *Journal of Natural Products* **59**, 1003-5.
- Seo J-A, Kim J-C, Lee Y-W, 1999. N-Acetyl Derivatives of Type C Fumonisins Produced by *Fusarium oxysporum*. *Journal of Natural Products* **62**, 355-7.

- Shilev S, 2013. Soil Rhizobacteria Regulating the Uptake of Nutrients and Undesirable Elements by Plants. In: Arora NK, ed. Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances. Springer India, 147-67.
- Simeoni L A, W. L. Lindsay, Baker R, 1987. Critical Iron Level Associated with Biological Control of Fusarium Wilt. *Phytopathology* **77**, 1057-61.
- Singh BK, Millard P, Whiteley AS, Murrell JC, 2004. Unravelling rhizosphere–microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends in Microbiology* **12**, 386-93.
- Singh V, Upadhyay R, 2014. Fusaric acid induced cell death and changes in oxidative metabolism of *Solanum lycopersicum* L. *Botanical Studies* **55**, 66.
- Smalla K, Wieland G, Buchner A, et al., 2001. Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-Dependent Enrichment and Seasonal Shifts Revealed. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4742-51.
- Smith TK, Macdonald EJ, 1991. Effect of fusaric acid on brain regional neurochemistry and vomiting behavior in swine. *Journal of animal science* **69**, 2044-9.
- Smith TK, Sousadias MG, 1993. Fusaric acid content of swine feedstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 2296-8.
- Snoeijers S, Pérez-García A, Joosten MaJ, De Wit PGM, 2000. The Effect of Nitrogen on Disease Development and Gene Expression in Bacterial and Fungal Plant Pathogens. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 493-506.
- Snyder WC, Hansen HN, 1940. The Species Concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany* **27**, 64-7.
- Spaink HP, 2000. Root Nodulation and Infection Factors Produced by Rhizobial Bacteria. *Annual Review of Microbiology* **54**, 257-88.
- Srobarova A, Eged S, Teixeira DSJ, Ritieni A, Santini A, 2009. The use of *Bacillus subtilis* for screening fusaric acid production by *Fusarium* spp. *Czech journal of food sciences* **27**, 203:9.
- Stevenson IL, Becker SaWE, 1972. The fine structure and development of chlamydospores of *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Microbiology* **18**, 997-1002.
- Stipanovic RD, Puckhaber LS, Liu J, Bell AA, 2011. Phytotoxicity of fusaric acid and analogs to cotton. *Toxicon* **57**, 176-8.
- Ten Have A, Breuil WO, Wubben JP, Visser J, Van Kan JaL, 2001. *Botrytis cinerea* Endopolygalacturonase Genes Are Differentially Expressed in Various Plant Tissues. *Fungal Genetics and Biology* **33**, 97-105.
- Ter Schure EG, Van Riel NaW, Verrips CT, 2000. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 67-83.
- Thangavelu R, Palaniswami A, Doraiswamy S, Velazhahan R, 2003. The Effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* on Induction of Defense Enzymes and Phenolics in Banana. *Biologia Plantarum* **46**, 107-12.
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, et al., 1995. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *The EMBO Journal* **14**, 779-90.
- Toyama H, Chistoserdova L, Lidstrom ME, 1997. Sequence analysis of pqq genes required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1 and the purification of a biosynthetic intermediate. *Microbiology* **143**, 595-602.
- Toyoda H, Hashimoto H, Utsumi R, Kobayashi H, Ouchi S, 1988. Detoxification of Fusaric acid by a Fusaric Acid-Resistant Mutant of *Pseudomonas solanacearum* and its Application to Biocontrol of *Fusarium* Wilt of Tomato. *Phytopathology* **78**, 1307-11.
- Tran H, Ficke A, Asimwe T, Höfte M, Raaijmakers JM, 2007. Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytologist* **175**, 731-42.

- Turnbull GA, Morgan JaW, Whipps JM, Saunders JR, 2001. The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil and in the attachment and colonisation of wheat roots. *FEMS Microbiology Ecology* **36**, 21-31.
- Turrà D, El Ghalid M, Rossi F, Di Pietro A, 2015. Fungal pathogen uses sex pheromone receptor for chemotropic sensing of host plant signals. *Nature advance online publication*.
- Van Loon LC, 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology* **119**, 243-54.
- Van Loon LC, Bakker PaHM, 2006. Induced Systemic Resistance as a Mechanism of Disease Suppression by Rhizobacteria. In: Siddiqui Z, ed. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer Netherlands, 39-66.
- Van Loon LC, Bakker PaHM, Pieterse CMJ, 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **36**, 453-83.
- Vartivarian SE, Anaissie EJ, Bodey GP, 1993. Emerging Fungal Pathogens in Immunocompromised Patients: Classification, Diagnosis, and Management. *Clinical Infectious Diseases* **17**, S487-S91.
- Vessey JK, 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* **255**, 571-86.
- Vicré M, Santaella C, Blanchet S, Gateau A, Driouch A, 2005. Root Border-Like Cells of *Arabidopsis*. Microscopical Characterization and Role in the Interaction with Rhizobacteria. *Plant Physiology* **138**, 998-1008.
- Vitullo D, De Curtis F, Palmieri D, Lima G, 2014. Milkwort (*Polygala myrtifolia* L.) decline is caused by *Fusarium oxysporum* and *F. solani* in Southern Italy. *European Journal of Plant Pathology* **140**, 883-6.
- Vitullo D, Di Pietro A, Romano A, Lanzotti V, Lima G, 2012. Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology* **61**, 689-99.
- Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM, 2003. Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiology* **132**, 44-51.
- Wang Y, Ohara Y, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S, 2005. Microarray Analysis of the Gene Expression Profile Induced by the Endophytic Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 385-96.
- Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BBM, Thomashow LS, 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 309-48.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL, 1999. Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. *Physiological Reviews* **79**, 143-80.
- Wiebe M, 2002. Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**, 421-7.
- Wu H-S, Bao W, Liu D-Y, 2008. Effect of fusaric acid on biomass and photosynthesis of watermelon seedlings leaves. *Caryologia* **61**, 258-68.
- Yabuta T, Kambe K, Hayashi T, 1937. Biochemistry of the bakanaefungus. Fusarinic acid, a new product of the bakanae fungus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **10**, 1059-68.
- Zhang H, Sun Y, Xie X, Kim M-S, Dowd SE, Paré PW, 2009. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *The Plant Journal* **58**, 568-77.
- Zhao L, 2010. Genomics: The tale of our other genome. *Nature* **465**, 879-80.