

GIAN PAOLO ACCOTTO*, CARLA CARUSO**, MARCO CATONI*,
FABRIZIO CILLO***, GIANDOMENICO CORRADO****, LUIGI DE MASI*****,
MONICA DE PALMA*****, MARIA RAFFAELLA ERCOLANO*****,
FRANCESCA FERRIELLO*****, LUIGI FRUSCIANTE*****, MATTEO LORITO*****,
CONCETTA LOTTI*****, TIZIANA MASCIA***, STEFANO PAVAN*****,
FRANCESCO PENNACCHIO*****, SILVIA PROIETTI**,
GERARDO PUOPOLO*****, ROSA RAO****, LUIGI RICCIARDI*****,
MICHELINA RUOCCO*****, MARINA TUCCI*****, ASTOLFO ZOINA*****

Geni e network genici coinvolti nell'interazione pomodoro/ambiente biotico¹

PREMESSA

Nel loro ambiente naturale, le piante interagiscono in maniera complessa con altri organismi, tra cui parassiti, predatori, patogeni, antagonisti e simbiotici. Nel corso della co-evoluzione, i diversi partner di tali interazioni hanno sviluppato sistemi complessi di comunicazione, dai quali dipende l'esito dell'interazione stessa. Data la loro importanza fondamentale, anche ai fini pratici, negli ultimi anni intensi studi si sono concentrati sui meccanismi molecolari che sono alla base delle diverse interazioni, con lo scopo di isolare e comprendere il ruolo dei geni espressi dalla pianta e dai suoi partner, che siano parassiti, patogeni o simbiotici, durante la colonizzazione, di identificare le

- * CNR – Istituto di Virologia Vegetale, Torino
- ** Dip. ABAC, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo
- *** CNR – Istituto di Virologia Vegetale, Bari
- **** Dip. Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni animali, Università degli Studi di Napoli Federico II
- ***** CNR – Istituto di Genetica Vegetale, Portici (NA)
- ***** Dip. Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale, Università degli Studi di Napoli Federico II
- ***** Dip. Scienze Agro-Ambientali, Chimica e Difesa Vegetale, Università di Foggia
- ***** Dip. Biologia e Chimica Agro-Forestale ed Ambientale, Sezione di Genetica e Miglioramento Genetico, Università degli Studi di Bari
- ***** Dip. di Entomologia e Zoologia agraria, Università degli Studi di Napoli Federico II
- ***** CNR – Istituto di Protezione delle Piante, Portici (NA)

¹ Curatore Tucci M.. Contributi di: De Palma M., De Masi L., Caruso C., Proietti S., Ruocco M., Lorito M., Tucci M. per il par. 1; Ferriello F., Puopolo G., Zoina A., Ercolano M.R., Frusciante L. per il par. 2; Ricciardi L., Lotti C., Pavan S. per il par. 3; Accotto G.P., Cillo F., Mascia T., Catoni M. per il par. 4; Corrado G., Pennacchio F., Rao R. per il par. 5.

molecole segnale che appaiono nell'interazione, di analizzare la trasduzione del segnale in pianta e di studiare le molecole che appaiono nella risposta della pianta all'interazione. Da tali ricerche è emerso, tra l'altro, che esistono molte analogie tra i diversi sistemi di risposta attivati nel corso delle diverse interazioni, il cui studio potrà senz'altro contribuire a comprendere quali sono i meccanismi cruciali dell'interazione.

I recenti avanzamenti delle tecnologie a disposizione della ricerca scientifica, che hanno reso possibile lo sviluppo della genomica e degli approcci a essa associati (metabolomici, proteomici, trascrittomici ecc.) stanno avendo e avranno un impatto fondamentale anche nello studio delle interazioni tra la pianta e l'ambiente biotico. Oltre all'avanzamento delle conoscenze, i nuovi approcci genomici contribuiranno anche allo sviluppo di prodotti ad alto contenuto tecnologico, quali nuove varietà vegetali più resistenti ai patogeni e ai parassiti e in grado di avvantaggiarsi al massimo delle interazioni benefiche, o nuove strategie di lotta ai fitopatogeni più rispettose dell'ambiente e in grado di assicurare una maggiore qualità e la riduzione dei residui di fitofarmaci nei prodotti agroalimentari.

La costituzione del Laboratorio Pubblico-Privato di Genomica per l'innovazione e la valorizzazione della filiera del pomodoro (GenoPOM) ha permesso di polarizzare alte competenze scientifiche e tecnologiche insieme ad avanzate risorse logistico-strumentali di genomica esclusivamente sullo studio e all'analisi del genoma di una sola specie, il pomodoro, di grande rilevanza economica per l'Italia, e per la quale sono inoltre già disponibili grandi risorse e piattaforme genetiche e genomiche, quali mappe genetiche e fisiche ad alta densità; ampie collezioni di marcatori molecolari, di EST (Expressed Sequence Tag) (Barone et al., 2008), di mutanti naturali e indotti (cfr. <http://tgrc.ucdavis.edu>; <http://www.agrobios.it/tilling/>); piattaforme microarray (TOM1 e TOM2, <http://bti.cornell.edu/CGEP/CGEP.html>, chip Affymetrix, <http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/tomato.affxspefic/tomato.affx>); nonché piattaforme bioinformatiche per la consultazione e l'elaborazione dei dati (<http://biosrv.cab.unina.it/isola/isola.html> e Barone et al., 2008).

La disponibilità di risorse genetiche e genomiche e la concentrazione di risorse umane e strumentali realizzata attraverso il Laboratorio GenoPOM sta apportando un contributo rilevante anche allo studio delle interazioni tra il pomodoro e l'ambiente biotico, e in particolare delle interazioni con microrganismi benefici, con funghi fitopatogeni, con virus e con insetti. L'integrazione delle conoscenze che si stanno sviluppando potrà risultare particolarmente proficua per l'identificazione delle analogie tra i diversi sistemi

di risposta attivati nel pomodoro dall'interazione con questi diversi partner e quindi per la comprensione dei meccanismi fondamentali dell'interazione.

I. IDENTIFICAZIONE DI GENI E FUNZIONI GENICHE COINVOLTE NELLA RISPOSTA DELLA PIANTA AL FUNGO BENEFICO *TRICHODERMA HARZIANUM*

Tra le interazioni della pianta con l'ambiente biotico, notevole interesse rivestono quelle che essa intrattiene con microrganismi benefici della rizosfera, quali i funghi del genere *Trichoderma*. Tali microrganismi svolgono un'attività diretta di antibiosi e micoparassitismo nei confronti dei funghi patogeni, competendo con questi ultimi per spazio e nutrienti e producendo una grande varietà di sostanze antimicrobiche (es. peptaiboli) e enzimi degradativi (chitinasi, glucanasi ecc.). Inoltre, tali funghi antagonisti instaurano un'interazione di tipo simbiotico con numerose specie vegetali, colonizzando la superficie e gli strati epidermici delle radici e creando una zona d'interazione (Harman et al., 2004 a). In conseguenza di ciò, *Trichoderma* induce risposte simili alla resistenza sistemica indotta (ISR) attivata da rizobatteri non patogeni (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR). L'ISR è una risposta di resistenza sistemica ai patogeni ed è quindi fenotipicamente simile ai sistemi indotti da molecole segnale quali acido salicilico (SA) e jasmonati (JA). Ne differisce però funzionalmente perché, in assenza di un patogeno, non vengono prodotte proteine "pathogenesis-related" (PR) né fitoalessine e in genere non c'è accumulo di SA. Tuttavia, in presenza di ISR, la risposta della pianta all'attacco di un patogeno è amplificata e l'entità della malattia diminuisce. Perciò, ISR potenzia le risposte di difesa della pianta in assenza della cascata di proteine tipiche della risposta mediata da JA e SA.

Analogamente ai PGPR, *Trichoderma* è anche in grado di esercitare un'attività biofertilizzante, stimolando lo sviluppo radicale, favorendo l'assorbimento di acqua e nutrienti e la crescita della parte aerea e, in definitiva, assicurando una maggiore produttività.

La capacità di *Trichoderma* sia di operare il biocontrollo di funghi fitopatogeni sia di promuovere la crescita delle piante e l'assorbimento radicale può apportare un notevole contributo al miglioramento di quegli aspetti dell'agricoltura (difesa contro patogeni e nutrizione delle piante) che attualmente sono affrontati con strategie a elevato impatto sull'ambiente e sulla salute umana (uso massiccio di pesticidi e fertilizzanti) e che hanno un effetto negativo, anche in termini economici, sulla produzione agricola. Entrambe le succitate attività di *Trichoderma* sono fortemente dipendenti dalle rispo-

ste indotte nella pianta dall'interazione col fungo benefico, tanto che è stata dimostrata una forte componente genetica della risposta della pianta a *T. harzianum* T22, almeno in mais (Harman et al., 2004 b; Harman, 2006). Tuttavia, le informazioni disponibili sui determinanti molecolari della risposta della pianta a *Trichoderma*, che viene inizialmente percepito come un patogeno (Harman et al., 2004 a), sono ancora scarse, né sono stati conclusivamente determinati quali, tra i complessi meccanismi di segnalazione operanti in pianta in risposta ai patogeni (tab. 1), vengano attivati dall'interazione con *Trichoderma* spp., benché, in analogia con l'ISR, sia stato ipotizzato un coinvolgimento del jasmonato (Shoresh et al., 2005).

Allo scopo di contribuire all'identificazione di geni e funzioni geniche del pomodoro rilevanti per l'interazione con *Trichoderma*, è stato innanzitutto condotto, presso il CNR-IGV di Portici in collaborazione con il CNR-IPP di Portici e con il Dip. ARBOPAVE dell'Università di Napoli e il Dip. ABAC dell'Università della Tuscia, uno studio per identificare l'eventuale presenza di variabilità genetica in pomodoro per la capacità di interagire con *Trichoderma*. Gli effetti dell'interazione tra diverse varietà e specie selvatiche di pomodoro e due specie di *Trichoderma*, *T. harzianum* T22 e *T. atroviride* P1, sono stati analizzati in condizioni controllate sia su piante allevate in suolo in serra climatizzata sia in piante allevate in coltura idroponica in cella climatica.

Tali studi hanno permesso di evidenziare, anche in pomodoro, una variabilità dei genotipi analizzati nella risposta a ciascuna delle due specie di microrganismi benefici, sia in termini di accrescimento e sviluppo (fig. 1) sia in termini di tolleranza al patogeno *Botrytis cinerea* (Ruocco et al., 2007).

Tra i diversi genotipi saggiati, è stato selezionato un genotipo che risponde positivamente a *T. harzianum* T22 sia in termini di sviluppo radicale sia di tolleranza al patogeno *B. cinerea*. I cDNA estratti da piante trattate e non con *T. harzianum* T22, a 48 h dall'instaurarsi dell'interazione, sono stati utilizzati per l'allestimento di una libreria sottrattiva mediante la tecnica della "Suppressive Subtraction Hybridisation (SSH) PCR", al fine di identificare geni di pomodoro differenzialmente espressi e quindi potenzialmente coinvolti nell'interazione stessa.

Lo screening della libreria sottrattiva ottenuta ha consentito di identificare numerose sequenze non ridondanti differenzialmente espresse. L'analisi bioinformatica di tali sequenze ha permesso di classificarle in diverse categorie funzionali, evidenziando che la maggior parte delle sequenze sono riconducibili a geni coinvolti nel metabolismo primario e secondario (24 e 22%, rispettivamente), essendo molto rappresentata anche la categoria dei geni attivati nella risposta a stress e/o a patogeni (20%) (fig. 2). Questo ultimo

GENE	INDUZIONE			PRODOTTO GENICO	ACCESSIONE	BIBLIOGRAFIA
	FERITA	JA	PATOGENO			
	PROTEINE DELLA PATOGENESI					
PR-P4	nd	0	up	up	nd	Fidantsef et al. (1999), «Physiol. Mol. Plant Pathology», 54, pp. 97-114; van Kan et al. (1992), «Plant Mol. Biol.», 20, pp. 513-527
PR1a2	nd	nd	0	0	0	Tomero et al. (1997), «Mol. Plant Microbe Interact.», 10, pp. 624-635
PR1b1	0	0	up	up	up	Tomero et al. (1997), «Mol. Plant Microbe Interact.», 10, pp. 624-634
PR-P6	nd	nd	up	up	0	van Kan et al. (1995), «Plant Mol. Biol.», 27, pp. 1205-1213
PR2	nd	nd	up	up	up	van Kan et al. (1995), «Plant Mol. Biol.», 27, pp. 1205-1213
type I						
PR2	nd	nd	up	up	0	van Kan et al. (1995), «Plant Mol. Biol.», 27, pp. 1205-1213
type II						
PR3	nd	nd	up	0	up	van Kan et al. (1995), «Plant Mol. Biol.», 27, pp. 1205-1213; Danhash et al. (1993), «Plant Mol. Biol.», 22, pp. 1017-1029
type I						
PR3	nd	nd	up	up	no	van Kan et al. (1995), «Plant Mol. Biol.», 27, pp. 1205-1213; Danhash et al. (1993), «Plant Mol. Biol.», 22, pp. 1017-1029
type II						
PR-P2	nd	nd	up	up	up	Linthorst et al. (1991), «Mol. Plant Microbe Interact.», 4, pp. 586-592
PR5	nd	nd	up	up	up	King et al. (1988), «Plant Mol. Biol.», 10, pp. 401-412
PIN-II	up	up	0/up	down	up	Graham et al. (1985), «J. Biol. Chem.», 260, pp. 6561-64; Zhang et al. (2004), «Plant Physiol. Biochem.», 42, pp. 437-44; Doares et al. (1995), «Plant Physiol.», 108, pp. 1741-1746
P1-pl4					up	Tomero et al. (1993), «Plant Physiol.», 102, p. 325
STRESS OSSIDATIVO						
GST				glutazione S- trasferasi	EF409975	Unpublished, Gafni and Levy (2007)
METABOLISMO AROMATICO						
pal				fenilalanina-ammonio liasi	M83314, M90692	Bloksberg, Tesi (1991); Lee et al. (1992), «J. Biol. Chem.», 267, pp. 11824-11830.
METABOLISMO ACIDI GRASSI						
AOS	up	up	nd	down	up	Howe et al. (2000), «Plant Physiol.», 123, pp. 711-24
loxA	nd	up	up	nd	nd	Ferrie et al. (1994), «Plant Physiol.», 106, pp. 109-118
loxB	nd	up	up	nd	nd	Ferrie et al. (1994), «Plant Physiol.», 106, pp. 109-118
loxC	0	0	nd	nd	nd	Heitz et al. (1997), «Plant Physiol.», 114, pp. 1085-93
loxD	up	up	nd	nd	nd	Heitz et al. (1997), «Plant Physiol.», 114, pp. 1085-93
JA , acido jasmonico; SA , acido salicilico; nd , non determinato; up , induzione; 0 , nessun effetto; down , inibizione.						

Tab. 1 Geni inducibili correlati alla difesa in pomodoro (*S. lycopersicum*) e loro attivazione da parte di diverse vie di traduzione del segnale.



Fig. 1 Sviluppo di piante di pomodoro della linea 137 e della cv. Principe Borghese in risposta alla colonizzazione radicale da parte di *T. atroviride* P1 o *T. harzianum* T22

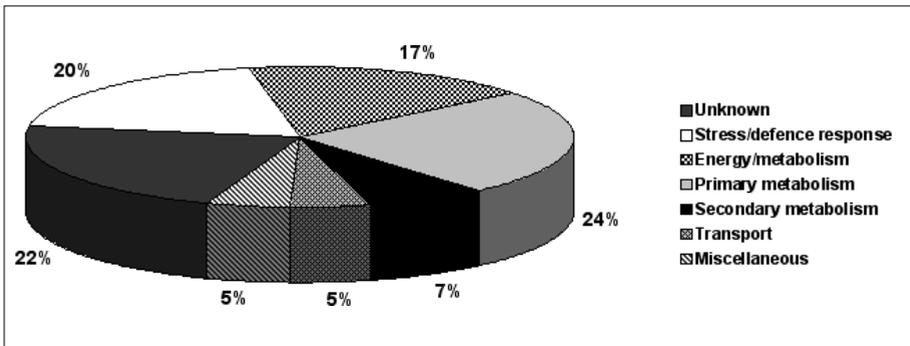


Fig. 2 Annotazione funzionale di cloni cDNA espressi differenzialmente in pomodoro durante l'instaurarsi dell'interazione con *T. harzianum* T22, basata sull'allineamento delle sequenze tramite BlastN

dato conferma che inizialmente, durante la fase della colonizzazione radicale, *Trichoderma* viene percepito dalla pianta come un patogeno, attivando una serie di risposte di difesa che portano al confinamento del fungo nei primi strati corticali della radice (Harman et al., 2004 a).

L'ulteriore caratterizzazione delle sequenze differenzialmente espresse potrà senza dubbio contribuire alla comprensione della risposta del pomodoro a questi microrganismi benefici.

2. STUDIO DEL PROCESSO DI RESISTENZA A *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *RADICIS-LYCOPERSICI* IN POMODORO

La coltivazione di pomodoro in Italia ha una lunga tradizione e il nostro paese figura al terzo posto nella graduatoria mondiale per la produzione e l'esportazione. La coltura del pomodoro è diffusa in quasi tutte le regioni e la sua coltivazione per consumo fresco in serra è in aumento in quanto garantisce redditi maggiori. Da circa un decennio uno dei principali fattori limitanti per la produzione di pomodoro, specialmente in coltura protetta, è rappresentato dagli attacchi parassitari da parte del *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL), responsabile del marciume al colletto e alle radici di piante del pomodoro, malattia tra i cui sintomi si annoverano ritardo della crescita, prematura caduta dei cotiledoni, lesioni scure sull'ipocotile, marcescenza delle radici, fino alla morte della pianta. Gli interventi di difesa con mezzi chimici non consentono un efficace controllo della malattia (De Weert et al., 2003), mentre è possibile limitare i danni dal patogeno con opportune pratiche colturali e impiegando varietà resistenti. Una fonte di resistenza a FORL è stata già identificata in *S. peruvianum* e trasferita nel pomodoro coltivato (Wakalounakis et al., 1997). Per pianificare efficaci strategie per la costituzione di nuove varietà resistenti, risulta quindi particolarmente interessante studiare i geni responsabili di tale resistenza attraverso analisi molecolari e genetiche per pianificare efficaci strategie per la costituzione di nuove varietà resistenti. L'impiego di linee isogeniche può essere particolarmente utile a questo scopo. In particolare, è disponibile la linea Momor, che contiene il gene Frl, responsabile della resistenza a FORL, e la varietà isogenica Monalbo, in cui esso è assente. Da vari studi risulta che il gene Frl è localizzato sul cromosoma 9 del pomodoro (Wakalounakis et al., 1997). Sarebbe, quindi, auspicabile individuare la posizione del gene sul cromosoma in modo più preciso per favorire il suo clonaggio, nonché verificare quali geni sono espressi durante il processo di resistenza.

Sulla base di saggi di patogenicità di diversi ceppi di *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (tab. 2), inoculati sulla cv suscettibile di pomodoro Marmande, è stato identificato il ceppo più virulento, Forl Na.

Il ceppo selezionato è stato quindi utilizzato per l'inoculazione di 60 linee di Momor (resistenti) e 60 linee Monalbo (suscettibili), e il processo d'infezione è stato osservato a 0, 15 e 21 gg, effettuando un'analisi visiva del grado di infezione (fig. 3).

Ai tre stadi di infezione sono stati raccolti campioni di piantine inoculate e non, dai quali sono stati estratti i cDNA utilizzati per l'analisi di espressione

Genere	specie	forma specialis	ceppo	Provenienza
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>radicis-lycopersici</i>	Forl Na	Portici-Micoteca
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>radicis-lycopersici</i>	Forl Lt	Latina
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>radicis-lycopersici</i>	Forl To	Torino
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>radicis-lycopersici</i>	Forl To 1	Torino
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>radicis-lycopersici</i>	ZUM2407	Leiden (Dr. Bloemberg)

Tab. 2. Elenco dei ceppi fungini di *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* saggiati

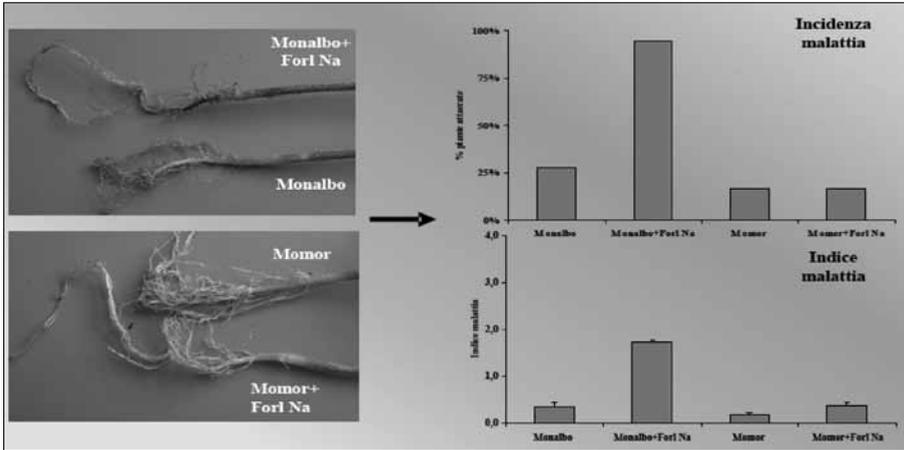


Fig. 3. Diverso grado di infezione di FORL Na tra le linee Momor e Monalbo

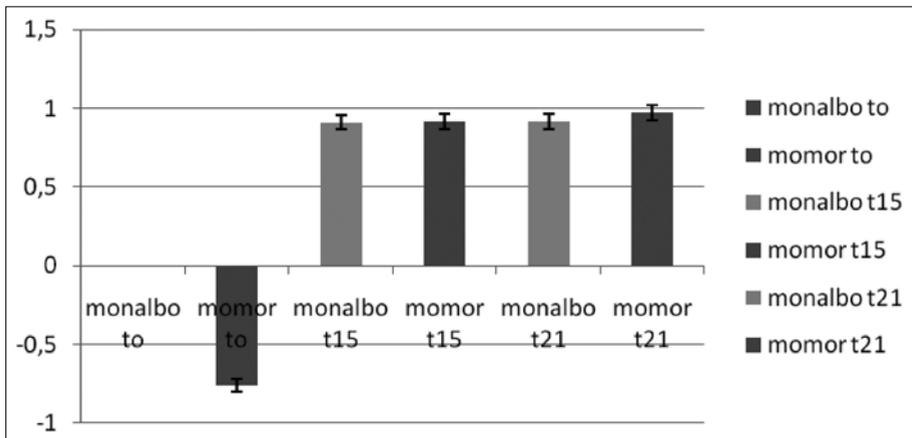


Fig. 4. Profilo d'espressione del gene per la β -Glucosidasi a diversi tempi dall'inoculazione con *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* nelle linee di pomodoro Momor (resistente) e Monalbo (suscettibile)

genetica dei geni per Catalasi, PAL e β -Glucosidasi, considerati marcatori del processo di resistenza, attraverso PCR Real-Time. I risultati ottenuti dimostrano che, nella cultivar resistente, l'espressione dei geni per PAL e Catalasi diminuisce in seguito a inoculazione, mentre il gene per la β -Glucosidasi viene attivato (fig. 4).

3. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEL *locus ol-2* DI RESISTENZA AD *OIDIUM NEOLYCOPERSICI*

L'Oidio o mal bianco è una malattia trofica delle piante causata da funghi *Ascomycota* appartenenti alla famiglia delle Erysiphaceae. La malattia si sviluppa soprattutto in ambienti umidi e temperati causando severe riduzioni nella produzione delle colture.

Oltre a *Leveillula taurica*, in pomodoro sono stati identificati come agenti eziologici della malattia due specie fungine appartenenti al genere *Oidium*: *O. lycopersici*, diffuso esclusivamente in Australia, e *O. neolyopersici*, una specie emergente che trova ampia diffusione nel resto del mondo.

Numerosi studi volti a identificare fonti genetiche di resistenza verso il patogeno, hanno permesso di mappare 5 geni di resistenza, che conferiscono eredità di tipo dominante specifica per alcuni isolati fungini identificati (Bai et al., 2005), e un solo gene di resistenza recessivo (Ciccarese et al., 1998; 2000). Quest'ultimo, denominato *ol-2*, è stato identificato nell'accessione selvatica di *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* LC-95, che è stata incrociata con la varietà suscettibile SuperMarmande allo scopo di ottenere una popolazione segregante utile per la mappatura del locus genico.

Utilizzando la metodologia della Bulk Segregant Analysis (BSA, Michelmore et al., 1991) è stato possibile identificare un marcatore RAPD, trasformato successivamente in marcatore CAPS, strettamente associato al *locus* di resistenza sul braccio corto del cromosoma 4 del genoma del pomodoro (De Giovanni et al., 2004). La conferma del dato di localizzazione è stata ottenuta effettuando la mappatura con linee di introgressione (IL) disponibili in pomodoro (Eshed e Zamir, 1994). In figura 5 è riportata la mappa relativa al cromosoma 4 di pomodoro e la localizzazione del gene *ol-2* effettuata mediante le citate IL.

Proseguendo nelle ricerche sono stati identificati altri 7 marcatori di tipo AFLP risultati polimorfici tra i parentali e tra due bulk costituiti con un definito numero di individui F_2 resistenti e suscettibili all'attacco del patogeno e associati al locus *ol-2*. Inoltre, adottando una tecnica

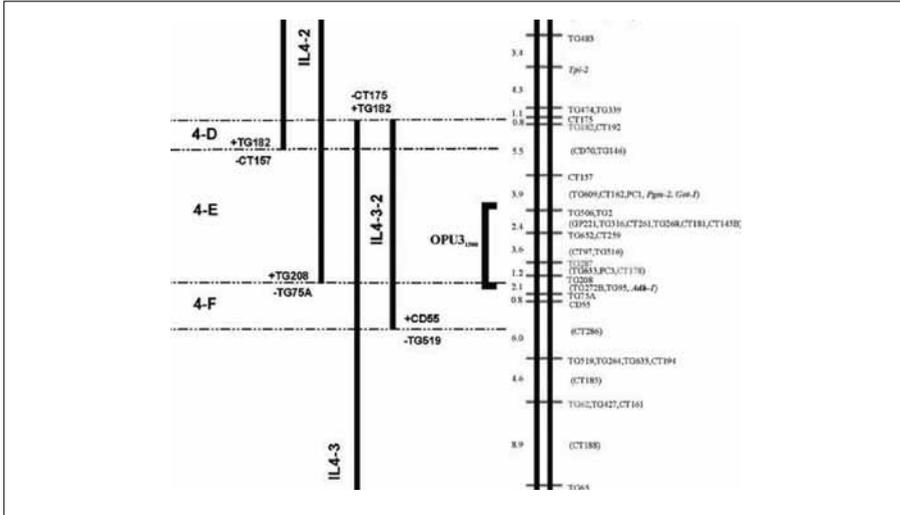


Fig. 5 Mappa genetica del cromosoma 4 di pomodoro e mappatura del gene *ol-2* mediante le IL. Il dato di mappatura indica che il gene si trova sul braccio corto del cromosoma, nella regione di sovrapposizione di 3 sub-linee d'introgressione (IL4-2, IL4-3 e IL4-3-2)

mai utilizzata per l'analisi del genoma delle piante (LMS-PCR, Schupp et al., 1999), è stato identificato un marcatore di tipo LMS anch'esso associato al *locus* in studio (Ricciardi et al., 2007). Come è possibile osservare in figura 6, i marcatori ottenuti coprono una distanza di mappa di 4.4 cM nelle vicinanze di *ol-2*. La tipologia e il numero di marcatori disponibili non erano tuttavia sufficienti per realizzare l'isolamento del gene.

Pertanto, la ricerca di ulteriori marcatori molecolari è stata condotta utilizzando una popolazione segregante più ampia rispetto alla precedente (316 individui), ottenuta incrociando LC-95 con la varietà Money Maker. Su tale popolazione sono state testate differenti classi di marcatori molecolari, identificando due nuovi marcatori SSR e un marcatore CAPS co-segreganti con *ol-2* ed evidenziando come la regione in studio sia caratterizzata da una scarsa ricombinazione genica (Pavan et al., 2008). Infatti, come si può osservare in figura 7, i nuovi marcatori identificati (U3-2HhaI, Tom332 e Tom 316) formano un cluster intorno a *ol-2*.

Tali risultati sono stati il punto di partenza per condurre ulteriori e più approfondite indagini che hanno permesso l'isolamento del gene di resistenza (Panstruga et al., 2008).

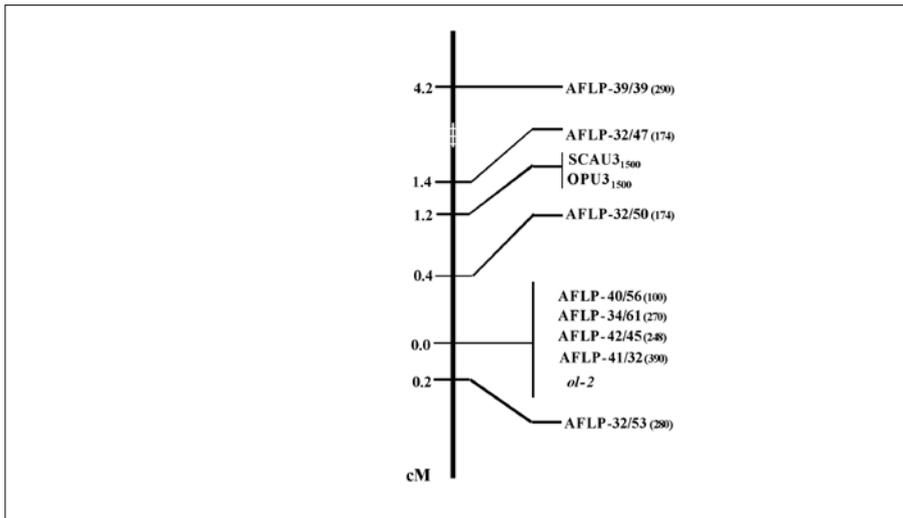


Fig. 6 *Mapa di associazione del locus ol-2 del pomodoro ottenuta con marcatori AFLP*

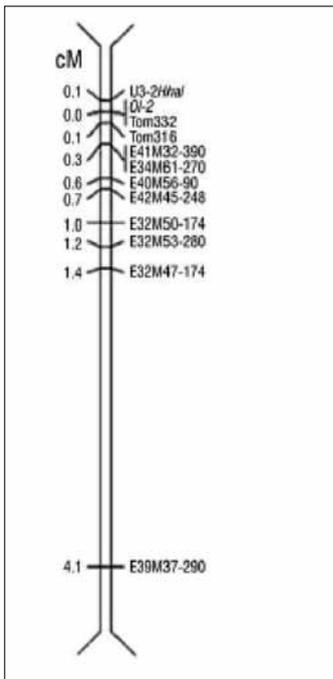


Fig. 7 *Mapa integrata del cromosoma 4 di pomodoro ottenuta con marcatori di tipo SSR utilizzando una popolazione di 316 individui derivante dall'incrocio tra LC-95 e la cultivar Money Maker*

4. GENOMICA DELLE INTERAZIONI POMODORO-VIRUS

Lo studio a livello molecolare delle interazioni pianta-virus, negli stadi più precoci del processo infettivo, costituisce attualmente una delle aree di ricerca più interessanti della fitovirologia e rappresenta un importante supporto alla costituzione di varietà resistenti o tolleranti alle virosi. Nuovi strumenti molecolari, quali le tecnologie del DNA ricombinante e l'isolamento di geni di resistenza nella pianta ottenuti negli ultimi 10 anni, hanno fornito basilari conoscenze in merito al ruolo di specifiche sequenze virali nel processo infettivo e in merito alle risposte della pianta. Strumenti avanzati di analisi dell'espressione genica sono attualmente disponibili e vengono applicati all'identificazione di geni coinvolti nei più diversi processi biologici, incluse le interazioni pianta-patogeno.

A partire dalla loro comparsa come strumenti di analisi differenziale dell'espressione genica, i microarrays (Schena et al., 1995) hanno permesso l'individuazione anche in pianta, di centinaia di geni potenzialmente implicati nel controllo di differenti fenomeni biologici, in particolare in *Arabidopsis*.

L'analisi dei profili trascrizionali nelle interazioni pianta-patogeno ha contribuito in modo significativo alla ricerca inerente la resistenza della piante nei confronti di patogeni diversi. Alcuni importanti meccanismi molecolari sono stati chiariti, la cui conoscenza potrà fornire un supporto fondamentale allo sviluppo di strumenti di difesa sostenibile nei confronti delle malattie delle piante. Le alterazioni trascrizionali associate alla difesa sono state studiate, in *Arabidopsis*, prevalentemente mediante DNA microarrays (Maleck et al., 2000; Schenk et al., 2000; van Wees et al., 2003; Whitham et al., 2003; Marathe et al., 2004; Eulgem, 2005). Questi studi hanno già permesso l'identificazione di un numero impressionante di geni potenzialmente implicati nelle risposte di difesa e di resistenza. Alcuni di questi geni possono essere ricondotti a una azione antimicrobica o a trasduzioni di segnali che notoriamente operano nelle resistenze, ma in molti altri casi il coinvolgimento nella resistenza dei geni individuati è meno ovvio e rimane tutto da indagare. Lo studio su larga scala dei profili trascrizionali nelle interazioni incompatibili, ha anche rivelato interessanti similitudini nelle risposte a patogeni diversi, come pure l'esistenza di connessioni nei pathways di risposta alla patogenesi e allo stress abiotico (Reymond, 2001; Wan et al., 2002; Wise et al., 2007). Molto rimane invece da capire per quanto riguarda le basi molecolari della compatibilità e la determinazione dei sintomi, molto meno note, anche dal punto di vista dell'espressione genica. Alcuni studi hanno riguardato l'analisi su larga scala delle alterazioni trascrizionali associate alle infezioni di virus o

di viroidi (rivisti in Wise et al., 2007). Tali studi evidenziano l'esistenza di gruppi di trascritti modulati in modo specifico come pure di funzioni comunemente alterate a livello trascrizionale dall'infezione con virus diversi o con altri patogeni delle piante.

Il lavoro svolto ha mirato all'esame dettagliato, mediante la tecnologia del microarray, delle alterazioni del profilo trascrizionale di pomodoro (*Solanum lycopersicum*) in seguito a infezione con *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e ceppi diversi di *Cucumber mosaic virus* (CMV).

TSWV, specie tipo del genere *Tospovirus*, famiglia *Bunyaviridae*, è un virus estremamente diffuso, in grado di infettare centinaia di specie vegetali, tra cui numerose specie coltivate, di cui costituisce uno dei principali patogeni su scala mondiale. Su pomodoro, TSWV causa la malattia dell'avvizzimento maculato, anche nota come bronzatura, che può portare in caso di infezioni precoci alla morte prematura della pianta infetta.

CMV, specie tipo del genere *Cucumovirus*, famiglia *Bromoviridae*, è costituito da particelle poliedriche che incapsidano separatamente tre RNA genomici monocatenari di senso positivo. Oltre che gli RNA genomici e subgenomici, alcuni ceppi di CMV incapsidano un RNA satellite (satRNA), una piccola molecola lineare di RNA che dipende totalmente dal genoma virale per la sua replicazione, incapsidazione e diffusione. I satRNA di CMV non hanno capacità codificante e sono presenti in natura in numerose varianti in grado di alleviare o di aggravare i sintomi indotti dal virus di supporto. Questo effetto è particolarmente evidente in pomodoro, dove la presenza di satRNA è a volte associata a gravi malattie di campo (Garcia-Arenal and Palukaitis, 1999).

I quattro principali quadri sintomatologici indotti su pomodoro da varie combinazioni di CMV e satRNA possono essere così riassunti: a) riduzione della crescita, mosaico e laciniatura fogliare (filimorfismo, sintomo della "foglia di felce"), indotto dalla maggior parte dei ceppi di CMV naturalmente privi di satRNA (es. CMV-Fny); b) assenza di sintomi, co-determinata da ceppi di CMV supportanti varianti "benigne" di satRNA (CMV-Fny/Tfn-satRNA, o FB); c) nanismo apicale (CMV-Fny/TTS-satRNA, o FS); d) necrosi letale, co-determinata da ceppi di CMV supportanti varianti necrogeniche di satRNA (CMV-Fny/77-satRNA, o FN) (Cillo et al., 2007).

Obiettivo della ricerca è stato una migliore comprensione delle interazioni tra pomodoro e i suoi principali virus patogeni, ricercando con approcci di trascrittomica geni e vie metaboliche alterati che possano indicare le basi molecolari della malattia.

Nel caso di TSWV in pomodoro, è stata analizzata la risposta trascrizionale, a seguito di infezione, sia su foglie che su radici (Catoni et al., 2009).

L'infezione è stata valutata a 14 giorni dall'inoculazione, momento nel quale sono visibili i sintomi della virosi (riduzione di crescita e prime bronzature sulle foglie). A questo stadio, la quantità di RNA virale rilevata in foglie e radici non ha mostrato differenze significative (fig. 8), dimostrando come l'infezione sia sistemizzata.

Numerosi geni regolati diversamente nei due organi sono stati identificati e un campione di essi è stato validato mediante qRT-PCR. L'infezione virale ha indotto espressione differenziale di 2385 geni nelle foglie e 1166 nelle radici (fig. 9).

Nonostante la concentrazione del virus fosse equivalente nei due organi, i confronti hanno rilevato numerose differenze. Nelle foglie geni correlati a difesa e trasduzione del segnale erano indotti, mentre vi era una generale repressione di geni correlati al metabolismo primario e secondario, e al metabolismo degli amminoacidi. Nelle radici l'espressione di geni coinvolti in metabolismo primario e trasduzione del segnale non era alterata dall'infezione di TSWV, mentre appariva indotta la risposta a stimoli biotici e il metabolismo degli amminoacidi implicati nella sintesi di composti secondari, mentre risultava repressa (o inalterata) la risposta a stimoli abiotici. Un'analisi dettagliata ha evidenziato inoltre differenze nei geni del metabolismo dell'ABA, della risposta a ormoni e ROS, del metabolismo di carotenoidi e poliammine (fig. 10).

Per indagare sulle alterazioni dei profili trascrizionali associate a infezioni di CMV/satRNA, piante di pomodoro sono state inoculate allo stadio cotiledonare con le quattro combinazioni indicate, e l'RNA totale è stato estratto a due tempi diversi dopo l'infezione, a 2 e 9 giorni (gg), per esaminare l'espressione differenziale a livello locale e a livello sistemico, rispettivamente.

I geni modulati sono stati raggruppati in categorie funzionali, allo scopo ottenere un quadro complessivo delle vie metaboliche interessate dalle infezioni dei diversi ceppi. 1179 geni sono risultati modulati (cioè sovraespressi almeno del doppio o sottoespressi almeno della metà rispetto al controllo sano) in almeno una condizione sperimentale; le modulazioni più ampie sono determinate da CMV-Fny e le più modeste da CMV-FB, sia a 2 che a 9 gg (fig. 11).

L'infezione di CMV-Fny privo di satRNA, sia a 2 che a 9 gg determina una rimodulazione trascrizionale di gran lunga superiore a quella che si osserva in co-inoculazione con i diversi satelliti, che indipendentemente dagli effetti sulla sintomatologia sembrano contrastare gli effetti dell'infezione virale sull'espressione genica. L'effetto dell'infezione di CMV-Fny sulla trascrizione è più marcato a 2 gg rispetto a 9gg, mentre in caso di coinfezione con i diversi

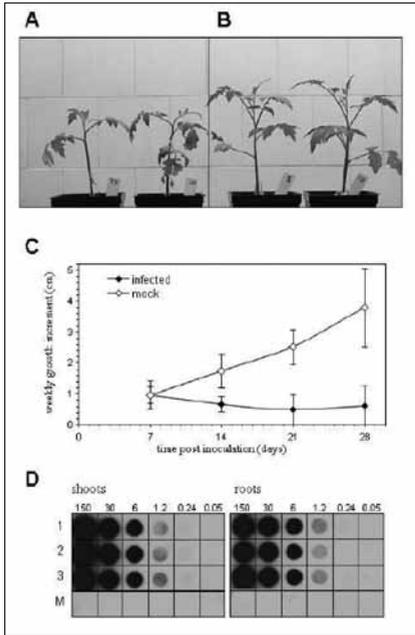


Fig. 8 Crescita di piante di pomodoro a seguito di infezione da TSWV. A: piante infette; B: non infette, a 14 giorni dall'inoculazione. C: incrementi settimanali di crescita. Le barre di errore rappresentano intervalli di confidenza del 95%. D: rilevamento di TSWV in parti aeree (shoots) e radicali (roots) di piante di pomodoro (1,2,3) a 14 giorni dall'inoculazione (i numeri in alto indicano le quantità (ng) di RNA totale in ogni spot)

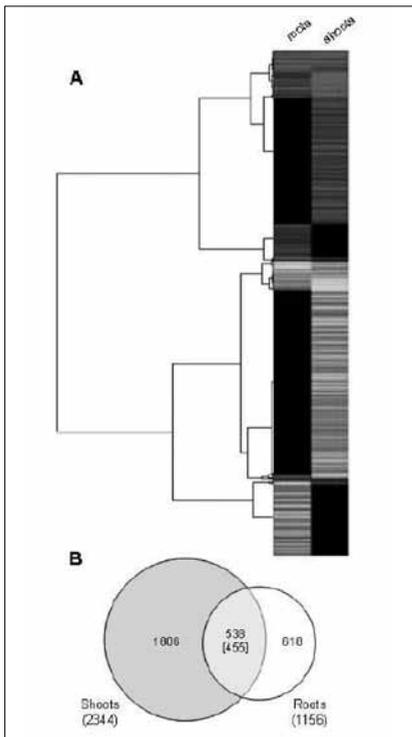


Fig. 9 Profili di espressione genica ottenuti da piante di pomodoro infette da TSWV. A: Clustering gerarchico dei profili di espressione differenziale di 2.962 geni. In rosso i geni con espressione aumentata nelle piante infette, in verde quelli sotto-espressi. B: Diagramma di Venn. Il numero di geni espressi in entrambi gli organi della pianta sono nelle parti sovrapposte dei cerchi; il valore in parentesi quadra indica il numero di geni regolati nella stessa direzione

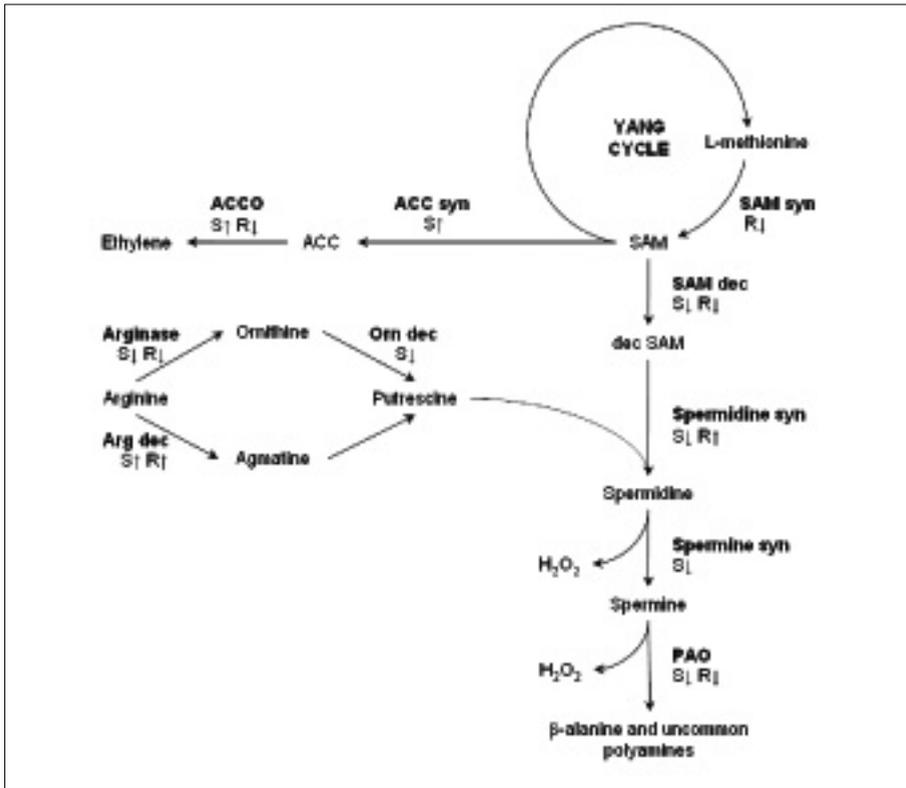


Fig. 10 *Espressione differenziale di geni coinvolti nella biosintesi di etilene e poliammine. La regolazione prevalente è indicata dalla direzione delle frecce a destra di S (shoots) e R (roots). Abbreviazioni: SAM syn, S-adenosyl-methionine synthase; SAM dec, S-adenosyl-methionine decarboxylase; Spermidine syn, spermidine synthase; Spermine syn, spermine synthase; PAO, polyamine oxidase; Orn dec, ornithine decarboxylase; Arg dec, arginine decarboxylase; ACC syn, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase; ACCO, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase; SAM, S-adenosyl-methionine; dec SAM, decarboxylated S-adenosyl-methionine; ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate*

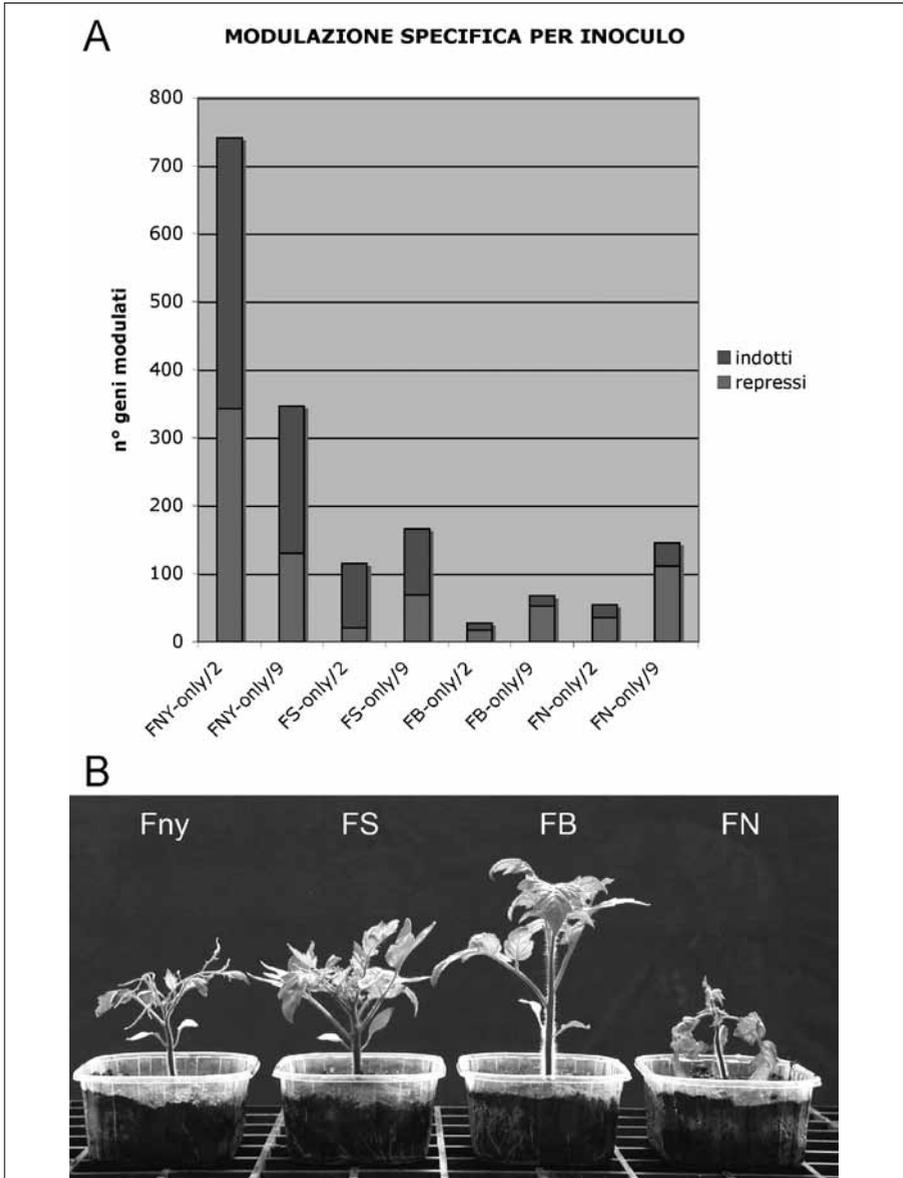


Fig. 11 Modulazione dell'espressione genica specifica per inoculo indotta su pomodoro da quattro combinazioni di CMV/satRNA. A, numero di geni modulati (indotti almeno del doppio e repressi almeno della metà) da singole combinazioni di inoculo nei due intervalli di tempo dopo l'inoculazione (2 e 9 giorni); B, Sintomi su giovani piantine di pomodoro a 21 giorni dall'inoculazione, associati alle infezioni della quattro combinazioni di inoculo considerate: Fny, ceppo CMV-Fny privo di satRNA; FS, ceppo CMV-Fny/TTS-satRNA; FB, ceppo CMV/Tfn-satRNA; FN, ceppo CMV-Fny/77-satRNA

satelliti il numero di geni interessati alle alterazioni trascrizionali è maggiore a 9gg rispetto a 2gg.

È possibile individuare un gruppo di geni che sono modulati in tutti i tipi di infezione (13 geni a 2gg e 31 geni a 9gg), e che presentano sempre una modulazione concordante, ovvero positiva o negativa in tutti i casi. Questi geni vanno a definire un “core” di modulazioni trascrizionali caratteristiche dell’infezione di CMV in pomodoro, indipendenti dal satellite associato. Per contro, appare anche interessante considerare gli effetti trascrizionali specifici di ciascun tipo di infezione. Prendendo in esame le categorie funzionali specificamente modulate nelle diverse interazioni si nota in tutte le interazioni una modulazione ampia di geni associati al metabolismo primario, osservazione già riportata per molte interazioni pianta-patogeno sia compatibili che incompatibili. Colpisce invece particolarmente l’elevato numero di geni che ricadono nella categoria della trasduzione del segnale, la quale rappresenta tra il 10 e il 20% dei geni modulati specificamente in ciascuna interazione. Appare inoltre interessante notare che la categoria “resistenza” è assente nelle modulazioni di CMV-FB, sia a 2 sia a 9gg, mentre è presente in tutti gli altri casi (fig. 12).

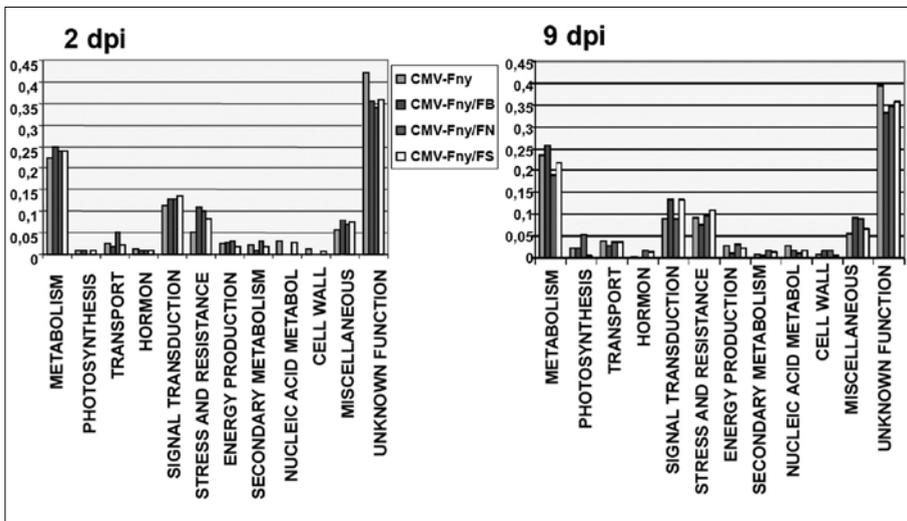


Fig. 12 Percentuali di geni assegnati alle differenti categorie funzionali a 2 e 9 giorni dall'innoculazione, in relazione al numero totale di geni modulati in ognuna delle quattro combinazioni CMV/satRNA considerate (1=100%)

5. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLA RESISTENZA DIRETTA E INDIRECTA AD AFIDI IN ACCESSIONI DI POMODORO

Il pomodoro viene attaccato da numerosi parassiti, principalmente insetti. Nonostante l'uso di strategie di lotta chimica, questi ultimi riducono notevolmente la resa e la qualità della produzione. Per questo motivo, notevoli sforzi sono stati indirizzati verso la caratterizzazione dei tratti e dei geni all'interno del genere *Solanum* che conferiscono resistenza agli insetti. Tutti questi studi hanno anche permesso di rivelare un livello di dettaglio e complessità nelle interazioni pomodoro - insetto dannoso - nemico naturale che è probabilmente unica tra le piante coltivate (Kennedy, 2003).

Gli afidi, come *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera, Aphididae), sono tra gli insetti più dannosi del pomodoro, causando gravi perdite per la loro attività di sottrazione di alimenti e per la trasmissione di virus fitopatogeni (Lange e Bronson, 1981). Il controllo degli afidi è principalmente ottenuto con insetticidi, e l'eventuale uso di misure di controllo più sostenibili è quanto mai necessaria. Tra queste, strategie che si basano sul germoplasma resistente e l'impiego di agenti di controllo biologico appaiono particolarmente promettenti.

È stato recentemente proposto che due processi sono coinvolti nella risposta delle piante ad afidi (Smith e Boyko, 2007). Il primo si basa sul riconoscimento del tipo gene-per-gene di elicitori di difesa degli afidi, e coinvolge i cosiddetti geni di resistenza (R) delle piante. Il secondo processo si basa sul riconoscimento da parte delle piante dei danni causati dalla continua alimentazione degli afidi. Tale individuazione è seguita da reazioni molecolari che coinvolgono diverse vie metaboliche, principalmente quelle che riguardano la produzione di jasmonati, salicilati, etilene, acido abscissico e acido giberellico (Thompson e Goggin, 2006). Per questo motivo, è stato discusso che la resistenza delle piante agli afidi possa anche essere basata su pattern di espressione di specifici geni che sono coinvolti nella reazione generale di difesa contro lo stress (Smith e Boyko, 2007).

Gli ecotipi e le accessioni locali hanno spesso delle caratteristiche agronomiche di notevole interesse e per questo motivo essi potrebbero svolgere un ruolo importante in sistemi agricoli "sostenibili". Anche se alcuni tratti (ad es: gusto, forma e colore della bacca) sono attualmente sfruttati per mercati di nicchia, l'importanza delle accessioni locali per sistemi agricoli caratterizzati da un ridotto uso di pesticidi oppure per il "management" della resistenza ai parassiti è in gran parte inesplorato.

Utilizzando un sistema tritrofico costituito da *Solanum lycopersicum* - *M. euphorbiae* - *A. ervi* abbiamo identificato genotipi di pomodoro con livelli più elevati di resistenza diretta e indiretta agli afidi. Il DNA *fingerprinting* ha indicato che questi genotipi, chiamati AN5 e AN7, sono geneticamente diversi tra loro (e distinti da altre varietà commerciali) e di conseguenza, anche le loro prestazioni contro gli afidi sono state diverse. Sul genotipo AN5, studi di laboratorio hanno indicato che pochi afidi hanno raggiunto lo stadio adulto e nessuno si è riprodotto, implicando che una popolazione di afidi tende a ridursi e a scomparire su questo genotipo. Su AN7, i saggi biologici hanno indicato la mancata colonizzazione diffusa di afidi. La resistenza diretta in questi due genotipi è associata a una maggiore attrattività verso l'imenottero parassitoide *A. ervi*. Il livello di attrattività costitutivo della AN5 è risultato simile a quello registrato quando lo stesso parassitoide è stato testato con piante di fava infestate da *Acyrtosiphon sativum* (Du et al., 1996). La capacità di reclutare i nemici naturali dei parassiti ha trovato fondamento nel profilo dei composti organici volatili (VOC) emessi dai genotipi allo studio. Tali composti, specificatamente rilasciati a seguito di ferita o lacerazione dei tessuti vegetali, sono importanti per attrarre i predatori e i parassitoidi degli insetti fitofagi. L'analisi dei VOC ha indicato che AN5 ha un'emissione più elevata di tre importanti composti che regolano il comportamento di volo di *A. ervi*. Concordemente ai dati dei saggi comportamentali, sono state osservate delle differenze minori nella composizione dei volatili tra AN7 e M82, la varietà di pomodoro suscettibile agli afidi usata come controllo.

È probabile che l'elevato livello di resistenza agli afidi osservata nei genotipi AN5 e AN7 sia dovuta alla presenza di composti attivi sia nella difesa diretta che in quella indiretta (Bruce et al., 2008).

Successivamente, poiché la reazione della pianta a stress biotici prevede l'attivazione di diversi geni di difesa, abbiamo voluto verificare se geni di risposta agli afidi sono sovraespressi nei genotipi resistenti. In primo luogo, abbiamo identificato alcuni geni che vengono attivati da un attacco prolungato di afidi. I geni sono stati selezionati considerando il loro ruolo nella principali vie di difesa nel pomodoro (salicilato, etilene, jasmonato). I dati hanno indicato che, come previsto, la risposta di pomodoro all'attacco afidico è complessa, visto che coinvolge diverse vie di trasduzione del segnale difesa. Successivamente abbiamo analizzato il livello di espressione costitutivo di questi geni nei genotipi resistenti e suscettibili (fig. 13). I risultati suggeriscono fortemente che la resistenza osservata negli ecotipi AN5 e AN7, anche se molto probabilmente multifattoriale, è legata a un più alto livello di espres-

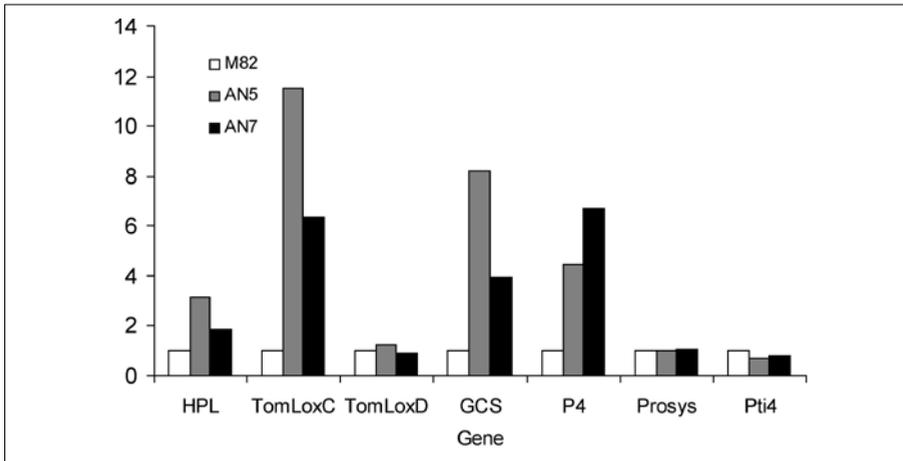


Fig. 13 *Analisi di espressione genica nei genotipi suscettibili (M82) e resistenti (AN5 e AN7). Il grafico mostra la quantità relativa per ogni gene bersaglio, indicata su una scala lineare rispetto al calibratore, la varietà M82 (colonne bianche)*

sione costitutiva dei geni di risposta ad afidi. Geni di difesa con elevati livelli di espressione costitutiva in genotipi resistenti a stress biotici sono stati trovati anche in altre specie vegetali. Diversamente da quanto riportato fino a ora in letteratura, è interessante che le differenze tra i nostri genotipi resistenti e il pomodoro suscettibile riguardano geni la cui attività è chiaramente legata alla resistenza diretta e indiretta contro gli insetti. In futuro sarà stimolante andare a effettuare un'analisi trascrittomico più completa per identificare ulteriori geni differenzialmente espressi.

In conclusione, questo studio ha identificato genotipi coltivati di pomodoro che sono resistenti agli afidi e geni che sono fortemente implicati nella resistenza contro afidi. Anche se ulteriori studi sono necessari per dipanare la complessità della base genetica dei tratti osservati, i nostri risultati dimostrano che il germoplasma tradizionale rappresenta un'importante fonte di materiale che può essere di interesse per l'agricoltura a basso input o per l'agricoltura biologici.

RIASSUNTO

Nell'ambito del progetto Laboratorio Pubblico-Privato di Genomica per l'innovazione e la valorizzazione della filiera del pomodoro (GenoPOM, MIUR art. 12 DM 593/00), e anche grazie alle piattaforme tecnologiche messe in essere, sono stati condotti appro-

fonditi studi sulle complesse interazioni che le piante intrattengono con l'ambiente biotico, che hanno permesso di confermare l'esistenza di molte analogie tra i meccanismi attivati nel corso delle diverse interazioni. Studi di trascrittomica hanno consentito sia di allestire una collezione di sequenze differenzialmente espresse in risposta al fungo benefico *Trichoderma harzianum*, la cui caratterizzazione contribuirà a comprendere i meccanismi che sono alla base del miglioramento della crescita e della resistenza a patogeni indotti dall'interazione, sia di evidenziare geni e vie metaboliche alterate nel corso dell'infezione di *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV). L'infezione di TSWV modula l'espressione genica in modo differenziale in diversi tessuti, in particolare a carico di geni del metabolismo di ABA, ormoni e poliammine e della risposta a ormoni e ROS. Molti dei geni modulati dall'infezione con CMV sono associati al metabolismo primario, mentre un'altra consistente frazione riguarda la trasduzione del segnale. Inoltre, diversi ceppi di CMV modulano l'espressione genica in modo differente, anche se è stato identificato un gruppo di geni "core", caratteristico della risposta di pomodoro a CMV. Sono stati condotti studi per l'identificazione di marcatori molecolari associati alla resistenza a funghi patogeni (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, FORL, e *Oidium neolycopersici*), da impiegare in programmi di miglioramento genetico assistito, che hanno permesso l'isolamento del gene *ol-2* di resistenza a *O. neolycopersici*. Infine, sono state identificate accessioni locali di pomodoro con un'elevata resistenza ad afidi, la cui caratterizzazione ha dimostrato che la resistenza è dovuta in parte a meccanismi di resistenza diretta e in parte ad una maggiore capacità di reclutare nemici naturali di tali parassiti attraverso un diverso profilo dei composti organici volatili (VOC) emessi dalla pianta.

ABSTRACT

In the frame of the project "Laboratorio Pubblico-Privato di Genomica per l'innovazione e la valorizzazione della filiera del pomodoro" (GenoPOM, MIUR art. 12 DM 593/00) and due also to the technological platforms implemented, the responses of tomato to other organisms have been characterised in depth, confirming that many analogies exist between mechanisms activated in response to different interactions. Transcriptomic approaches were used to study the interactions between tomato and either the beneficial fungus *Trichoderma harzianum* or *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) or *Cucumber mosaic virus* (CMV). A collection of tomato sequences differentially expressed in response to *T. harzianum* was obtained, whose characterisation will contribute to the understanding of the mechanisms underlying the stimulation of plant growth and resistance to pathogens induced by this interaction. TSWV infection modulates gene expression differentially in different tissues, especially of genes involved in ABA, hormones and poliammine metabolisms and in the response to hormones and ROS. Most genes modulated by CMV infection are associated with primary metabolism or involved in signal transduction. Besides, different strains of CMV modulate gene expression in peculiar ways, although a core of genes was identified as characteristic of the response of tomato to CMV. With the aim of breeding tomato varieties improved for their resistance to fungal pathogens (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, FORL, e *Oidium neolycopersici*) through assisted selection, molecular markers strictly associated to resistance loci have been identified. This led also to the isolation of *ol-2*, a gene for resistance to

O. neolycopersici. Finally, local accessions of tomato have been identified with strong resistance to aphids. Their characterisation demonstrated that this resistance is partly due to direct defence mechanisms but also to an increased ability of these accessions to attract natural enemies of aphids through a different composition of volatile organic compounds (VOC) produced by the plant.

BIBLIOGRAFIA

- BAI Y., VAN DER HULST G., BONNEMA C.M., THIERRY F., MEIJER-DEKENS F., NIKS R.E., LINDHOUT P. (2005): *Tomato defence to Oidium lycopersici: dominant Ol genes confer isolate-dependent resistance via a different mechanism than recessive ol-2*, «Mol. Plant-Microbe Interact.», 18 (4), pp. 354-362.
- BAI, Y., PAVAN, S., ZHENG, Z., ZAPPEL, N., LOTTI, C., DE GIOVANNI, C., RICCIARDI, L., LINDHOUT, P., VISSER, R., THERES, K., R. PANSTRUGA, (2008): *Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of LeMLO1 function*, «Molec. Plant-Microbe Interact.», 21, pp. 30-9.
- BARONE A., CHIUSANO M.L., ERCOLANO M.R., GIULIANO G., GRANDILLO S., FRUSCIANTE L. (2008): *Structural and functional genomics of tomato*, «Int. J. Plant Genomics», doi: 10.1155/2008/820274.
- BRUCE T.J., MATTHES M.C., CHAMBERLAIN K., WOODCOCK C.M., MOHIB A., WEBSTER B., SMART L.E., BIRKETT M.A., PICKETT J.A., NAPIER J.A. (2008): *cis-Jasmone induces Arabidopsis genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 105, pp. 4553-4558.
- CATONI M., MIOZZI L., FIORILLI V., LANFRANCO L., ACCOTTO G.P. (2009): *Comparative analysis of expression profiles in shoots and roots of tomato systemically infected by Tomato spotted wilt virus reveals organ-specific transcriptional responses*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», in stampa.
- CICCARESE F, RICCIARDI L., AMBRICO A., DE GIOVANNI C., SINISCALCO A. (2000): *Biological and molecular characterization of the ol-2 resistance gene in tomato*, Proc. of the "Fifth Congress of the European Foundation for Plant Pathology on Biodiversity in Plant Pathology", Taormina, Giardini Naxos, Italy, September 18-22, p. 425-428.
- CICCARESE F, AMENDUNI M., SCHIAVONE D., CIRULLI M. (1998): *Occurrence and inheritance of resistance to powdery mildew (Oidium lycopersici) in Lycopersicon species*, «Plant Pathol.», 47, pp. 303-311.
- CILLO, F., PASCIUTO, M. M., DE GIOVANNI, C., FINETTI-SIALER, M. M., RICCIARDI, L., GALLITELLI, D. (2007): *Response of tomato and its wild relatives in the genus Solanum to Cucumber mosaic virus and satellite RNA combinations*, «J. Gen. Virol.», 88, pp. 3166-3176.
- DE GIOVANNI C., DELL'ORCO P., BRUNO A., CICCARESE F., LOTTI C., RICCIARDI L. (2004): *Identification of PCR-based markers (RAPD, AFLP) linked to a novel powdery mildew resistance gene (ol-2)*, «Plant Sci.», 166, pp. 41-48.
- DE WEEERT S., KUIPER I., LAGENDIJK E.L., GERDA E.M., LAMERS G.E., LUGTENBERG B.J. (2003): *Role of chemotaxis toward Fusaric acid in colonization of hyphae of Fusarium oxysporum f. sp. radicles-lycopersici by Pseudomonas fluorescens, WCS365* «Molecular Plant-Microbe Interactions», 16, 11, pp. 1185-1191.

- DU YJ, POPPY GM, POWELL W. (1996): *Relative importance of semiochemicals from first and second trophic level in host foraging behaviour of Aphidius ervi*, «J. Chem. Ecol.», 22, pp. 1591-1606.
- ESHED Y., ZAMIR D. (1994): *A genomic library of Lycopersicon pennellii in L. esculentum: a tool for fine mapping of gene*, «Euphytica», 79, pp. 175-179.
- EULGEM T. (2005): Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome, «Trends Plant Sci.», 10, pp. 71-78.
- GALLITELLI D. (2000): *The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture*, «Virus Res.», 71, pp. 9-21.
- GARCIA-ARENAL, F., PALUKAITIS, P. (1999): *Structure and functional relationships of satellite RNAs of cucumber mosaic virus*, in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 239, Satellites and defective viral RNAs, pp. 37-63.
- HARMAN G.E. (2006): *Overview of mechanisms and uses of Trichoderma spp.*, «Phytopathology», 96, pp. 190-194.
- HARMAN G.E., HOWELL C.R., VITERBO A., CHET I., LORITO M. (2004 a): *Trichoderma species - Opportunistic, avirulent plant symbionts*, «Nat. Rev. Microbiol.», 2, pp. 43-56.
- HARMAN G.E., PETZOLDT R., COMIS A., CHEN J. (2004 b): *Interactions between Trichoderma harzianum strain T22 and maize inbred Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by Pythium ultimum and Colletotrichum graminicola*, «Phytopathology», 94, pp. 147-153.
- KENNEDY G.G. (2003): *Tomato, Pests, parasitoids, and predators: Tritrophic interactions involving the genus Lycopersicon*, «Annu. Rev. Entomology», 48, pp. 51-72.
- LANGE W.H., BRONSON L. (1981): *Insect pests of tomato*. Ann. Rev. Entomology 26, pp. 345-371.
- MALECK K, LEVINE A, EULGEM T, MORGAN A, SCHMID J, LAWTON KA, DANGL JL, DIETRICH RA. (2000): *The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance*, «Nat. Genet.», 26, pp. 403-10.
- MARATHE R., GUAN Z., ANANDALAKSHMI R., ZHAO H., DINESH-KUMAR S.P. (2004): *Study of Arabidopsis thaliana resistome in response to cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray*, «Plant Mol Biol.», 55, pp. 501-520.
- MICHELMORE R. W., PARAN I., KESSELI R.V. (1991): *Identification of markers linked to disease-resistance gene by Bulked Segregant Analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregatings*, «Genetics», 88, pp. 9828-9832.
- PAVAN S., ZHENG Z., VAN DEN BERG P., LOTTI C., DE GIOVANNI C., BORISOVA M., LINDHOUT P., DE JONG H., RICCIARDI L., VISSER R., BAI Y. (2008): *Map vs. homology-based cloning for the recessive gene ol-2 conferring resistance to tomato powdery mildew*. Euphytica 162, pp. 91-98.
- REYMOND P. (2001): *DNA microarrays and plant defence*, «Plant Physiol. Biochem.», 39, pp. 313-321.
- RICCIARDI L., LOTTI C., PAVAN S., BAI Y., LINDHOUT P., DE GIOVANNI C. (2007): *Further isolation of AFLP and LMS markers for the mapping of the Ol-2 locus related to powdery mildew (Oidium neolyopersici) resistance in tomato (Solanum lycopersicum L.)*, «Plant Sci.» 172, pp. 746-755.
- RUOCO M., DE MASI L., SORIENTE I., DE PALMA M., D'AMORE R., LORITO M., TUCCI M. (2007): *Trichoderma-plant interactions are modulated by the plant genotype*, XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Sorrento (Italia) 21-27 Luglio 2007, abs. PS 16-910.

- SCHEHA M., SHALON D., DAVIS R.W., BROWN P.O. (1995): *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*, «Science» 70, pp. 467-470.
- SCHENK P.M., KAZAN K., WILSON I., ANDERSON J.P., RICHMOND T., SOMERVILLE S.C., MANNERS J.M. (2000). *Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 97, pp. 11655-11660.
- SCHUPP J.M., PRINCE A., KLEVYTSKA, KEIM P. (1999): *Internal and flanking sequence from AFLP fragments using ligation-mediated suppression*, «PCR Biotechn.», 26, pp. 905-912
- SHORESH M., YEDIDIA I., CHET I. (2005): *Involvement of jasmonic acid/ethylene signalling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by Trichoderma asperellum (T-203)*, «Phytopathology», 95, pp. 76-84.
- SIMON A.E., ROOSSINCK M.J., HAVELDA Z. (2004): *Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new Century*, «Annu. Rev. Phytopathol.», 42, pp. 415-437.
- SLEAT D.E., ZHANG L., PALUKAITIS P. (1994): *Mapping determinants within cucumber mosaic virus and its satellite RNA for the induction of necrosis in tomato plants*, «Mol. Plant-Microbe Interact.», 7, pp. 189-95.
- SMITH C.M., BOYKO E.V. (2007): *The molecular bases of plant resistance and defence responses to aphid feeding: current status*, «Entomol. Exp. Appl.», 122, pp. 1-16.
- THOMPSON, G.A., GOGGIN F.L. (2006): *Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects*, «J. Exp. Bot.», 57, pp. 755-766.
- VAKALOUNAKIS D.J., LATERROT H., MORETTI A., LIGOXIGAKIS E.K., SMARDAS K. (1997): *Linkage between Frl (Fusarium f. sp. radicles lycopersici resistance) and tm-2 (tobacco mosaic virus resistance-2) loci in tomato (Lycopersicon esculentum)*, «Leading Edge Review Cell», 124, pp. 803-814.
- VAN WEES S.C., CHANG H.S., ZHU T., GLAZEBROOK J. (2003): *Characterization of the early response of Arabidopsis to Alternaria brassicicola infection using expression profiling*, «Plant Physiol.», 132, pp. 606-17.
- WAN J., DUNNING F.M., BENT A.F. (2002): *Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays*, «Funct. Integr. Genomics», 2, pp. 259-273.
- WHITHAM S.A., QUAN S., CHANG H.S., COOPER B., ESTES B., ZHU T., WANG X., HOU Y.M. (2003): *Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible Arabidopsis thaliana plants*, «Plant J.», 33, pp. 271-83.
- WHITHAM S.A., WANG Y. (2004): *Roles for host factors in plant viral pathogenicity*, «Curr. Opin. Plant Biol.», 7, pp. 365-71.
- WISE R.P., MOSCOU M.J., BOGDANOVA A.J., WHITHAM S.A. (2007): *Transcript profiling in host-pathogen interactions*, «Annu. Rev. Phytopathol.», 45, pp. 329-369.

