

GENNARO CRISTINZIO - RENATO CAPASSO - ANTONIO EVIDENTE

Istituto di Patologia vegetale - Università di Napoli Federico II

Dipartimento di Scienze chimico-agrarie - Università di Napoli Federico II

ISOLAMENTO DI UNA FITOTOSSINA
DA UNA *Phytophthora nicotianae* PATOGENA DEL POMODORO

ISOLAMENTO DI UNA FITOTOSSINA DA UNA *Phytophthora nicotianae* PATOGENA DEL POMODORO (*)

GENNARO CRISTINZIO⁽¹⁾ - RENATO CAPASSO⁽²⁾ - ANTONIO EVIDENTE⁽²⁾

(1) Istituto di Patologia vegetale - Università di Napoli Federico II

(2) Dipartimento di Scienze chimico-agrarie - Università di Napoli Federico II

RIASSUNTO

Dal filtrato colturale (CF) di una *Phytophthora nicotianae* da pomodoro è stata isolata allo stato parzialmente puro una fitotossina polimerica ed idrosolubile (FPI), stabile fino a 70°C e nell'intervallo di pH compreso fra 2 e 12. Concentrazioni variabili del suddetto composto sono state aggiunte ad un substrato di crescita per tessuti vegetali "in vitro", per prove preliminari in induzione di resistenza in calli di una linea selezionata di pomodoro S. Marzano. I risultati ottenuti hanno evidenziato una significativa riduzione nella formazione delle gemme con concentrazioni di 2,5% di CF e di 0,02 mg/ml di FPI.

Sono in corso esperimenti per la purificazione completa e per la caratterizzazione chimica e biologica della tossina.

SUMMARY

Studies on a phytotoxin by Phytophthora nicotianae Breda de Haan pathogenic to tomato plants.

A polymeric and hydrosoluble phytotoxic metabolite (PHPM) has been identified in a cultural filtrate (CF) of an isolate of *Phytophthora nicotianae* obtained from tomato plants. It is stable up to 70°C and in a range of pH from 2 to 12. Different concentrations of CF and PHPM have been added to the Murashige and Skoog medium for inducing resistance in tomato plants. A significant reduction of shoots regeneration was obtained at 2.5% of CF and 0.02 mg/ml of PHPM concentration.

Work is in progress to purify completely the toxin and to characterize its chemical nature and biological properties.

Parole chiave: *Phytophthora nicotianae*, *Lycopersicon esculentum*, fitotossina.

Key words: *Phytophthora nicotianae*, *Lycopersicon esculentum*, phytotoxin.

Introduzione

Il marciume basale da *Phytophthora* del pomodoro è causato principalmente da due specie: la *P. capsici* Leonian e la *P. nicotianae* Breda de Haan; in quest'ultima si intendono comprendere, in accordo con Ho e Jong (1989) le due varietà di *P. nicotianae* var. *nicotianae* e *P. nicotianae* var. *parasitica*,

(*) Lavoro effettuato con finanziamento del M.U.R.S.T. progetto 40%: "Nuove strategie di difesa delle piante a basso rischio ambientale".

indicate da Waterhouse (1963). La *P. capsici* si rinviene soprattutto quando il pomodoro è coltivato in vicinanza di campi di peperoni o in terreni precedentemente occupati da questa coltura; mentre la *P. nicotianae* è sicuramente più comune e ubiquitaria, tanto che all'estero, in alcune aree, è considerata come la principale avversità per questa coltura (Bolkan, 1985). L'attacco principale di tale patogeno si ha sull'apparato radicale e al colletto, e spesso viene confuso con altri agenti di marciumi terricoli sia biotici che abiotici.

Per spiegare le modalità di attacco sugli agrumi della *Phytophthora nicotianae* B. de Haan var. *parasitica* (Dast) Waterh., Ballio *et al.* (1972) isolarono metaboliti fitotossici parzialmente puri di natura polisaccarida e glicopeptidica dal filtrato colturale di questo fungo.

Allo scopo di studiare l'interazione *Phytophthora nicotianae* pomodoro è stato condotto un lavoro di purificazione e caratterizzazione chimica della tossina presente nei suoi filtrati colturali. Sono state effettuate anche prove preliminari di utilizzazione della suddetta tossina, parzialmente pura, nel miglioramento genetico per resistenza.

Materiali e metodi

Un isolato molto virulento del fungo, siglato pH 172 e conservato nella micoteca dell'Istituto di Patologia vegetale di Portici è stato allevato su agar V-8, trasferito per la produzione di tossine su un substrato sintetico, ASYT (L.-asparagina 1 g, estratto di lievito, 5 g; tiamina, 0.001 g; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g, acqua distillata, 1.000 ml) e mantenuto in coltura agitata per 12 giorni a 26°C.

Il filtrato colturale, ottenuto dopo passaggi su garza, carta da filtro e membrana Nalgene con pori da 0,2 μm , risultava molto tossico su giovani piantine, con apparato radicale reciso, di pomodoro (*Lycopersicon esculentum*), peperone (*Capsicum annum*), cocomero (*Citrullus lanatus*).

Allo scopo di indagare sulla eventuale presenza di fitotossine liposolubili, il filtrato colturale è stato sottoposto ad estrazione con solventi organici a polarità crescente (n-esano, etere etilico, cloroformio, cloruro di metilene, acetato di etile, n-butanolo) in esperimenti separati. Per la ricerca di fitotossine idrosolubili, invece, il filtrato è stato sottoposto a precipitazione acetonica a freddo. Il sovrinatante, risultato fitotossico, è stato poi dializzato in tubi da 3.500 e 9.000 dalton. Il non permeato dai tubi da 3.500 è stato sottoposto a purificazione cromatografica su una colonna Sephadex G-50: le frazioni attive sono state ricromatografate sulla stessa colonna.

Le frazioni attive e non attive così ottenute sono state analizzate per elettroforesi alcalina e su SDS nonché per focalizzazione isoelettrica (IEF). Circa 1 mg di sostanza secca biologicamente attiva è stata posta in bagno riscaldato a 70°C per la durata di 30 minuti; una parte è stata sottoposta ad

acidificazione con HCl 1N fino a pH 2 e un'altra alcalinizzata con NaOH fino a pH 12. Per il saggio delle proteine si è usato il metodo di Lowry et al. (1957) e per quello degli zuccheri il metodo dell'antrone (Shields and Burnett, 1962).

I saggi per verificare l'attività fitotossica delle frazioni in via di purificazione sono stati effettuati, oltre che su piantine allo stadio di 2 foglie vere, anche su foglie cotiledonari recise di pomodoro.

Alcune frazioni con un buon grado di purificazione e dotate di forte attività tossica sono state incluse a diverse concentrazioni in un substrato di crescita per tessuti vegetali *in vitro* (Murashige e Skoog, 1962), su cui sono stati trapiantati pezzi di ipocotili e foglie cotiledonari di una linea "L-5" di pomodoro San Marzano.

Risultati e discussione

I risultati ottenuti dall'estrazione con i solventi organici hanno consentito di escludere la presenza di metaboliti lipofili tossici; infatti l'attività è stata riscontrata solo negli esausti (Tab. 1). Il filtrato colturale, sottoposto al tratta-

Tabella 1 — Attività fitotossica degli estratti organici e dei rispettivi esausti del filtrato colturale di *P. nicotianae* su piantine di pomodoro, dopo 3 giorni a 25°C.

Table 1 — Phytotoxic activity of organic extracts and relative exhausted solution of CF of *P. nicotianae* on tomato seedlings after 3 days at 25°C.

Solvente	Estratto	Esauisto
N-esano	0	4
etere etilico	0	4
cloroformio	0	4
cloruro di metilene	0	4
acetato di etile	0	4
N-butanolo	0	4

(0 = non tossico, 4 = altamente tossico).

(0 = no toxic, 4 = highly toxic).

mento con acetone, ha dato un precipitato inattivo ed un supernatante contenente il metabolita fitotossico. Quest'ultimo, dializzato contro acqua mediante l'uso di tubi con limite di esclusione di 3.500 dalton, ha dato origine a due frazioni: il non permeato, fortemente fitotossico, ed il permeato, inattivo; l'inverso è accaduto quando la dialisi è stata effettuata mediante l'uso di tubi con limite di esclusione di 9.000 dalton. Il non permeato fitotossico è stato ulteriormente purificato su colonna di Sephadex G-50 fine, da cui sono stati eluiti, tra le altre (Tab. 2), due gruppi di frazioni 31-40 e 41-57 (Fig. 1) che sono risultati fortemente tossici su pomodoro, peperone e cocomero (Tab. 3).

L'indagine elettroforetica su gel di poliacrilammide in SDS (Fig. 2), in condizioni native alcaline (Fig. 3) e la focalizzazione isoelettrica (Fig. 4) hanno

Tabella 2 — Attività fitotossica su piantine di pomodoro dopo 3 giorni a 25°C, delle frazioni ottenute dal frazionamento su Sephadex G-50 fine del non permeato dai tubi di 3.500 dalton.

Table 2 — Phytotoxic activity of the fractions, obtained on Sephadex G-50 fine of dialysis not permeate (cut off 3,500 D), on tomato seedlings after 3 days at 25°C.

Frazioni	Attività fitotossica
1-4	0
5-10	2
11-30	2
31-40	4
41-57	4
58-64	1
65-78	1
79-110	0
111-fine	0

(0 = non tossico, 4 = altamente tossico).

(0 = no toxic, 4 = highly toxic).

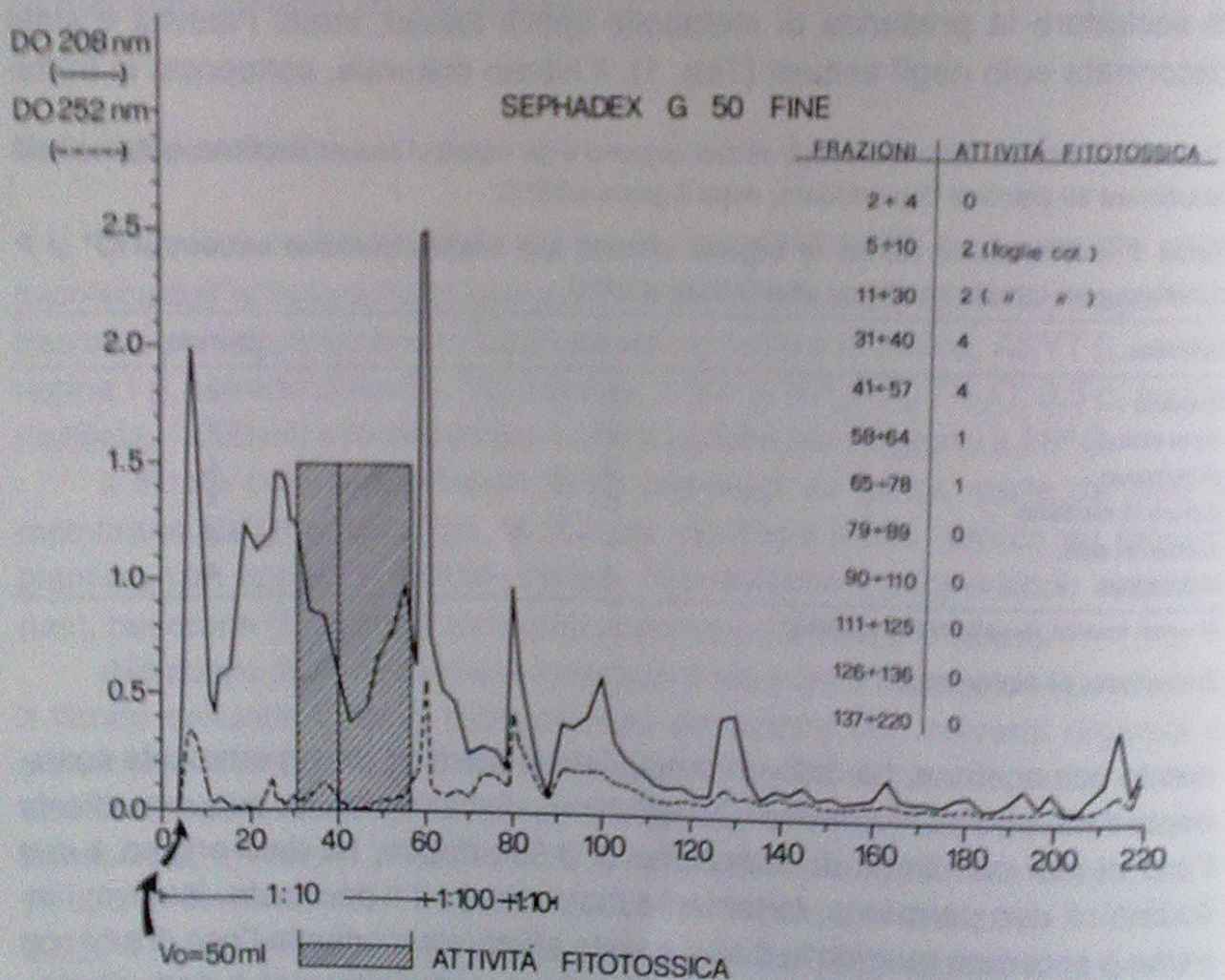


Figura 1 — Purificazione su Sephadex G-50 fine del non permeato da tubi di dialisi di 3.500 dalton del filtrato culturale di *P. nicotianae*. Eluizione in H₂O; flusso 1 ml/24 min., frazione da 1 ml.

Figure 1 — Purification on Sephadex G-50 fine of the dialysis not permeate (3,500 D) *P. nicotianae* CF. Eluent: H₂O, flow rate 1 ml/24 min., fraction volume 1 ml.

Tabella 3 — Attività fitotossica dopo 3 giorni a 25°C su pomodoro, peperone e cocomero dei due gruppi di frazioni più attivi riportati in tabella 2.

Table 3 — Phytotoxic activity of the most active fraction groups, reported in table 2, on tomato, capsicum and watermelon seedlings.

Frazioni	Pomodoro	Peperone	Cocomero
31-40	4	3	4
41-57	4	3	4

(0 = non tossico, 4 = altamente tossico).

(0 = no toxic, 4 = highly toxic).

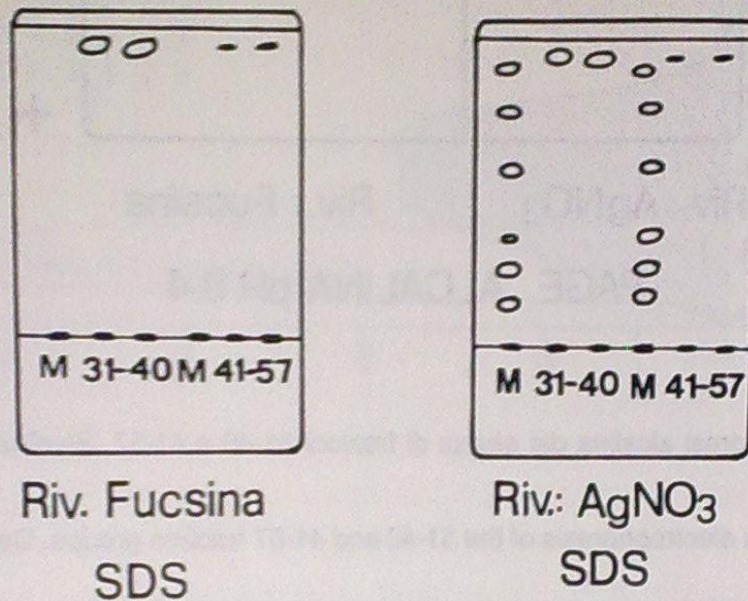


Figura 2 — Elettroforesi su SDS dei gruppi di frazioni 31-40 e 41-57. Phast gel. Rivelazione con AgNO_3 e fucsina.

Figure 2 — SDS electrophoresis of the 31-40 and 41-57 fraction groups. Phast gel. Detector: AgNO_3 and fucsin.

evidenziato nelle frazioni 31-40 una glicoproteina e nelle frazioni 41-57 soltanto tracce di quest'ultima. Inoltre l'analisi chimica del primo gruppo di frazioni ha mostrato l'equivalenza tra il contenuto di proteine e di polisaccaridi, mentre nell'altro gruppo è stato riscontrato un incremento nel contenuto di carboidrati (Tab. 4).

Tali dati non consentono di definire attualmente la natura chimica del principio fitotossico.

Tabella 4 — Percentuali di proteine e carboidrati presenti nei gruppi di frazioni 31-40 e 41-57.

Table 4 — Percent of proteins and carbohydrates in the 31-40 and 41-57 fraction groups.

Frazioni	Proteine	Carboidrati
31-40	50	50
41-57	30	70

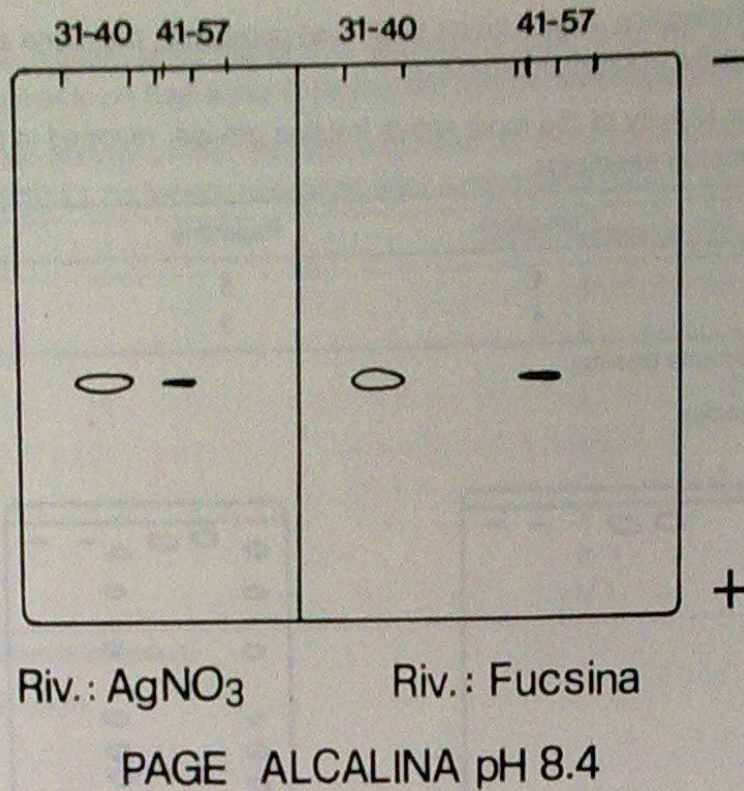


Figura 3 — Elettroforesi alcalina dei gruppi di frazioni 31-40 e 41-57. Rivelazione con AgNO_3 e fucsina.

Figure 3 — Alkaline electrophoresis of the 31-40 and 41-57 fraction groups. Detector: AgNO_3 and fucsin.

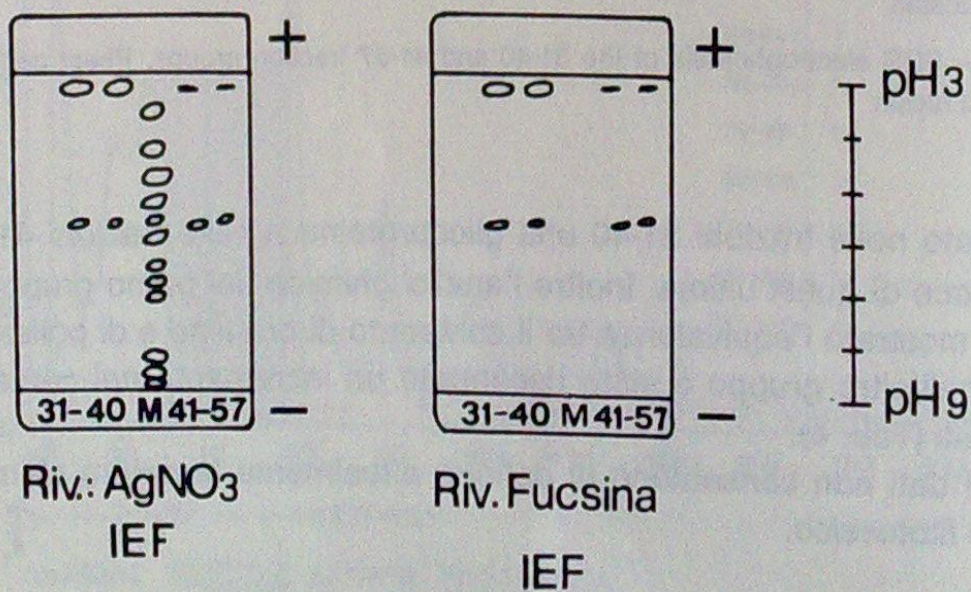


Figura 4 — Focalizzazione Isoelettrica dei gruppi di frazioni 31-40 e 41-57. Phast gel. Rivelazione con AgNO_3 e fucsina.

Figure 4 — Isoelectric focusing of the 31-40 and 41-57 fraction groups. Phast gel. Detector: AgNO_3 and fucsin.

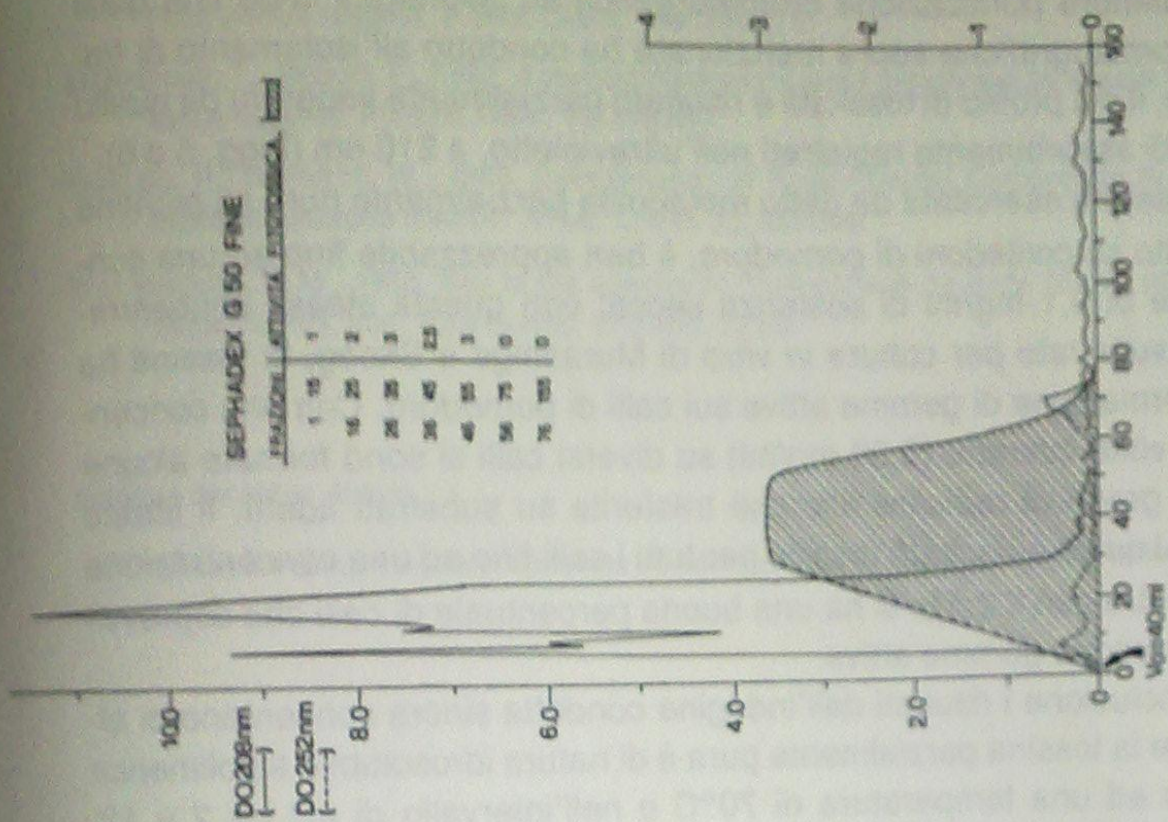


Figura 6 — Cromatogramma ottenuto dalla purificazione su Sephadex G-50 fine del gruppo di frazioni 31-40. Eluizione in H₂O, flusso 1.5 ml/3 min., frazioni da 1.5 ml.

Figure 6 — Purification on Sephadex G-50 fine of the 31-40 fraction group. Eluent H₂O, flow rate 1.5 ml/3 min., fraction volume 1.5 ml.

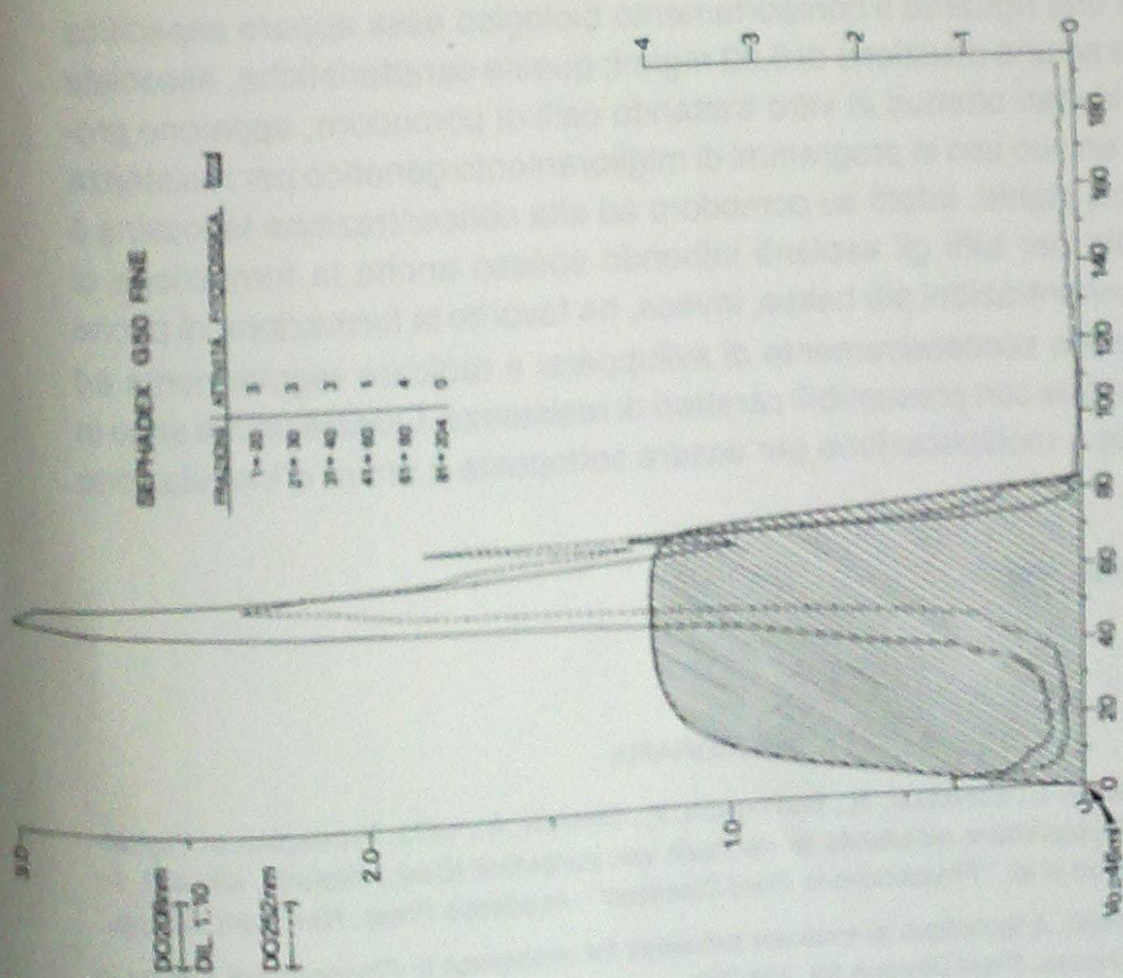


Figura 5 — Cromatogramma ottenuto dalla purificazione su Sephadex G-50 fine del gruppo di frazioni 41-57. Eluizione in H₂O, flusso 1.5 ml/3 min., frazioni da 1.5 ml.

Figure 5 — Purification on Sephadex G-50 fine of the 41-57 fraction group. Eluent H₂O, flow rate 1.5 ml/3 min., fraction volume 1.5 ml.

La sua attività biologica è risultata stabile fino ad una temperatura di 70°C e in un intervallo di pH compreso tra 2 e 12.

Un'ulteriore purificazione cromatografica su Sephadex G-50 fine delle frazioni cromatografiche sopra menzionate ha condotto all'isolamento di frazioni attive, il cui profilo di tossicità è risultato parzialmente separato da quello dei picchi di assorbimento registrati nell'ultravioletto, a 210 nm (Figg. 5 e 6).

La tossicità esercitata da detto metabolita parzialmente puro su piantine e soprattutto su cotiledoni di pomodoro, è ben apprezzabile fino ad una concentrazione di 0,1 mg/ml di sostanza secca; con questa stessa concentrazione, nel substrato per colture *in vitro* di Murashige e Skoog, la tossina ha inibito la formazione di gemme attive sui calli di pomodoro. Con una concentrazione 5 volte inferiore (0,02 mg/ml) su diversi calli si sono formate alcune gemme in grado di radicare allorché trasferite su substrati adatti. Il filtrato colturale tal quale è risultato tossico per tutti i calli fino ad una concentrazione del 5% mentre con il 2,5% si ha una buona percentuale di calli che sopravvivono e producono gemme attive.

In conclusione i risultati dell'indagine condotta sinora consentono di affermare che la tossina parzialmente pura è di natura idrosolubile e polimerica stabile fino ad una temperatura di 70°C e nell'intervallo di pH tra 2 e 12, suggerendo per tale metabolita un peso molecolare compreso tra 3.500 e 9.000 dalton.

Per ciò che riguarda il comportamento biologico essa appare aspecifica ed attiva fino ad una diluizione di 0,02 mg/ml; queste caratteristiche, associate con i primi risultati ottenuti *in vitro* trattando calli di pomodoro, appaiono promettenti per un suo uso in programmi di miglioramento genetico per resistenza anche su altre piante. Infatti su pomodoro ad alta concentrazione la tossina è risultata letale per tutti gli espianti inibendo spesso anche la formazione di callo; con concentrazioni più basse, invece, ha favorito la formazione di poche gemme in grado successivamente di svilupparsi e radicare regolarmente ed originare piantine con presumibili caratteri di resistenza. Queste ultime sono in via di crescita e moltiplicazione per essere sottoposte a prova d'inoculazione con il fungo.

Ricevuto il 10 febbraio 1992

BIBLIOGRAFIA

- BALLIO, A., GIANANI, L., BORRELLI, R., BOTTALICO, A., GRANITI, A., 1972. Production of Phytotoxins by *Phytophthora nicotianae* B. de Haan var. *parasitica* (Dast.) Waterh., 431-432. In: R.K.S. Wood *et al.* "Phytotoxins in Plant Diseases". Academic Press, New York, 530 pp.
- BOLKAN, H.A., 1985. A technique to evaluate tomatoes for resistance to *Phytophthora* root rot in the greenhouse. *Plant Disease* 69, 708-709.

- HO, H.H., JONG, S.C., 1989. *Phytophthora nicotianae* (*P. parasitica*). Mycotaxon, 35, 243-276.
- LOWRY, P., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.
- SHIELDS, R., BURNETT, W., 1960. Determination of Protein-Bound Carbohydrate in Serum by a modified anthrone method. Annal. Chem. 32, 885-886.
- WATERHOUSE, G.M., 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. pap. 92. Commonwealth Mycol. Inst., Kew Surrey, England, 22 pp.

Indirizzo del primo Autore

Istituto di Patologia vegetale - Università di Napoli Federico II - Via Università 100 - 80055 Portici (NA).