

1. Record Nr.	TD16056964
Autore	Palmieri, Davide
Titolo	Ruolo del pH nell'interazione biologica e molecolare tra <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>Lycopersici</i> e rizobatteri su piante di pomodoro [Tesi di dottorato]
Editore	Università degli studi del Molise, 2016-04-06T09 : 46 : 28Z
Lingua di pubblicazione	Italiano
Formato	Tesi di dottorato
Livello bibliografico	Monografia
Note	diritti: info:eu-repo/semantics/openAccess
Sommario	<p>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 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> e <i>Solanum lycopersicum</i> è influenzata dalla reciproca modificazione del pH della rizosfera. Mentre gli essudati radicali tendono ad acidificare l'ambiente extracellulare, la proliferazione di <i>Fol</i> 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 <i>Rahnella aquatilis</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i>, condividono gli stessi meccanismi di acidificazione extracellulare, come ad esempio la produzione di acido gluconico grazie all'attività enzimatica della glucosio deidrogenasi (<i>Gcd</i>). In tale ambito, la presente tesi ha avuto lo scopo di valutare il ruolo dell'enzima batterico <i>Gcd</i>, quindi dell'acido gluconico, nel controllo biologico di <i>Fol</i>. Sulla base dei risultati ottenuti è possibile affermare che il gene batterico <i>Gcd</i> ha un ruolo chiave nel controllo biologico di <i>Fol</i>, ma con implicazioni opposte nei due batteri. In <i>P. fluorescens</i> CHA0 la mutazione knockout del gene <i>Gcd</i> aumenta l'efficacia dell'attività antagonista nei confronti di <i>Fol</i>, dovuta ad una maggiore sintesi di agenti chelanti. Inoltre, analizzando il fenotipo di mutanti knockout, singoli e doppi, per geni</p>

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 Δ gcd. 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 antagonistica 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 Δ gcd (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. 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 *Rhizobium 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*. Based 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 lost in the Δ gcd 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 Δ gcd 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 alkalinization 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. Dottorato di ricerca in Difesa e qualità delle produzioni agro-alimentari e forestali (XXVIII ciclo)