

Identificazione di composti non battericidi ad azione inibitoria sulla patogenicità dell'agente del cancro batterico del kiwi, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

Annalisa Polverari, Elodie Vandelle

Dipartimento di Biotecnologie, Università degli Studi di Verona, Strada Le Grazie 15, 37134 Verona

Parole chiave: cancro batterico del kiwi, inibizione della patogenicità batterica

Numerose specie e *pathovars* batteriche del genere *Pseudomonas* sono causa di gravi malattie in diverse piante e colture agrarie. Tra questi, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, agente del cancro batterico del kiwi, è causa di gravi danni alla produzione. Le maggiori aree di coltivazione a livello globale hanno infatti già subito due gravi ondate epidemiche di questo patogeno.

Le misure di controllo disponibili si limitano ad azioni preventive, raramente efficaci, e a trattamenti con composti a base di rame, agenti di biocontrollo o sostanze naturali, che sono però raramente risolutivi. Inoltre, i composti del rame sono attualmente oggetto di potenziale revisione e già presenti nella lista delle sostanze “candidate alla sostituzione” definita dalla UE, in quanto si accumulano nei suoli e favoriscono la possibile comparsa di ceppi batterici patogeni resistenti al rame, come conseguenza della massiccia pressione selettiva operata dai numerosi trattamenti. Recentemente, l'interesse della ricerca si sta rivolgendo sempre più alla possibilità di sviluppare strategie di difesa alternative, mantenendo la massima attenzione alla tutela dell'ambiente. In particolare, strategie di interferenza con i meccanismi della patogenicità batterica che non uccidono il patogeno ma riducono solo la sua capacità di aggressione, permetterebbero di controllare le malattie, evitando nel contempo la pressione selettiva verso l'evoluzione di ceppi resistenti.

La patogenicità batterica è nella maggior parte dei casi essenzialmente dipendente dalla funzionalità del sistema secretorio di tipo III (Type III Secretion System o TTSS), codificato da geni *hrp* (*hypersensitive reaction and pathogenicity*). Il TTSS è assemblato all'interfaccia tra il batterio e la pianta, in seguito alla percezione di segnali ancora poco noti, e presiede alla traslocazione nella cellula vegetale di effettori che promuovono la virulenza batterica interferendo con il metabolismo cellulare.

Il gene *hrpA1*, in particolare, codifica una proteina secreta detta *helper*, essenziale all'assemblaggio del TTSS. Nell'approccio qui presentato, il monitoraggio dell'attivazione del promotore del gene *hrpA1* di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* è stato impiegato per selezionare all'interno di una libreria chimica di 502 molecole di origine naturale (Enzo Life Sciences, Inc. NY, USA), i composti potenzialmente in grado di inibire l'attivazione del TTSS. Lo screening è stato condotto con un metodo ad alta processività, utilizzando un ceppo di *Psa* (CRAFRU8.43) che esprime la proteina fluorescente GFP sotto il controllo del promotore del gene *hrpA1*. Il metodo, già pubblicato¹, ha portato all'identificazione e validazione di una lista

¹ Vandelle E, Puttilli MR, Chini A, Devescovi G, Venturi V, Polverari A. Application of Chemical Genomics to Plant-Bacteria Communication: A High-Throughput System to Identify Novel Molecules Modulating the Induction of Bacterial Virulence Genes by Plant Signals *Methods Mol Biol.* 2017;1610:297-314.

di molecole inibitorie del promotore di *hrpA1*, successivamente incluse in una richiesta di brevetto nazionale, accolto nel 2020². Le stesse molecole sono state anche valutate per escludere la loro eventuale attività battericida o batteriostatica.

L'effettiva capacità di inibire l'attivazione del TTSS è stata successivamente valutata in un sistema semplificato di patogenesi batterica, andando a misurare il rilascio di elettroliti da tessuti fogliari di *Arabidopsis thaliana* in corso di risposta ipersensibile, trattati o non trattati con una delle molecole selezionate, dopo infezione con un ceppo avirulento di *P. syringae* pv. *actinidiae* esprime l'effettore *AvrB*. I risultati hanno indicato, in particolare, la molecola dicumarolo come potenziale inibitore della patogenicità batterica, in grado di ridurre del 30% circa il rilascio di elettroliti rispetto al controllo.

L'invenzione apre la possibilità di impiegare questi composti in formulazioni di prodotti fitosanitari innovativi, che agiscano per inibizione della virulenza batterica, e comprende la possibilità di impiegare le sostanze attive formulate in nano-strutture, quali nano-emulsioni o nanoparticelle *biobased*.

² Brevetto N. 102017000119674 Ministero dello Sviluppo Economico – Titolari : Regione del Veneto e Università degli Studi di Verona.