

SENSIBILITA' DI MUTANTI PER IL COLORE DI *Cryphonectria parasitica* A SOSTANZE CHIMICHE DIVERSE (*)

PECCHIA S., FANTI S. E VANNACCI G.

Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose
Sez. Patologia Vegetale - Università degli Studi di Pisa

RIASSUNTO

Sono riportati i risultati relativi a prove di inoculazione artificiale e di sensibilità a sostanze chimiche diverse di un ceppo selvaggio virulento di *Cryphonectria (Endothia) parasitica* e di due suoi mutanti per il colore (*brw* e *whi*). Sono state saggiate le seguenti sostanze: CoCl_2 , CuCl_2 , HgCl_2 , ZnCl_2 , oligomicina, cloramfenicolo, saccarosio, PCNB e KClO_3 . Il mutante *whi* (ottenuto mediante mutagenesi con UV) si differenzia notevolmente dagli altri due ceppi pigmentati poichè non riproduce i sintomi della malattia, non colonizza i tessuti dell'ospite ed è generalmente più sensibile alle sostanze chimiche saggiate. Il mutante *brw* (mutante spontaneo), pur presentando una diversa pigmentazione rispetto al ceppo selvaggio, ha un comportamento molto simile a questo sia nella patogenicità che nella sensibilità alle diverse sostanze chimiche saggiate.

SUMMARY

SENSITIVITY OF *Cryphonectria parasitica* COLOUR MUTANTS TO DIFFERENT CHEMICALS

Two colour mutants (*brw* and *whi*) derived from the same virulent isolate of *Cryphonectria (Endothia) parasitica* were tested. *Brown* is a spontaneous mutation, whereas *white* mutant was selected by UV. Wild-type and mutants were evaluated for pathogenicity by artificial inoculations on young chestnut trees (*Castanea sativa*). The growth responses of wild-type and mutants on solid media containing heavy metals (Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+}), antibiotics (oligomycin, chloramphenicol), PCNB, sucrose and potassium chlorate were studied. Wild-type and *brw* mutant caused cankers in all inoculum sites and were re-isolated from lesions. *Whi* mutant did not cause any symptom and did not colonize host tissues.

When wild-type and mutants were grown on media amended with increasing concentrations of Hg^{2+} , sucrose and potassium chlorate no differences on growth response between isolates were found.

Whi mutant resulted more sensitive than pigmented strains to Co^{2+} , Zn^{2+} , oligomycin and chloramphenicol while it was found more resistant to PCNB. In the presence of some concentrations of Cu^{2+} and Zn^{2+} , the growth rate of the *brw* mutant was higher or lower, respectively, if compared with the other two strains.

(*) Lavoro eseguito con un finanziamento M.U.R.S.T. (60%) nell'ambito del progetto "Fusione di protoplasti in *Cryphonectria parasitica* e induzione di ipovirulenza"

INTRODUZIONE

Cryphonectria parasitica (Murrill) Barr [= *Endothia parasitica* (Murrill) H.W. & P.J. And.], agente del cancro della corteccia del castagno, produce pigmenti alcuni dei quali hanno attività tossica (Wood, 1967; Rudolph, 1976) sebbene il loro ruolo nel processo patogenetico sia ancora in discussione (McCarroll e Thor, 1985). La disponibilità di mutanti per il colore, e la loro caratterizzazione, potrebbe rappresentare uno strumento utile per l'approfondimento della tematica.

Un parametro di facile determinazione che riflette differenze nel metabolismo è la sensibilità a sostanze chimiche. Tale tratto fenotipico, in alcuni casi, arriva ad avere valore tassonomico (chemiotassonomia) la cui rilevanza è maggiore in assenza di caratteristiche morfologiche che permettano di identificare gli isolati: ad esempio *Endothia* e *Cryphonectria*, che difficilmente producono in coltura il teleomorfo, differiscono per la sensibilità all'actidione (Micales e Stipes, 1986).

D'altra parte, la resistenza a sostanze chimiche viene comunemente utilizzata quale marker per studi di genetica di molti patogeni fungini. Nel caso specifico di *C. parasitica* tali markers sono stati utilmente impiegati come "traccianti" per seguire la diffusione di forme virulente ed ipovirulente in natura (Garrod *et al.*, 1985).

Questo lavoro è stato intrapreso per verificare la patogenicità di due mutanti per il colore di *C. parasitica* originati da uno stesso ceppo selvaggio e per caratterizzare gli stessi sulla base della sensibilità a sostanze chimiche diverse.

MATERIALI E METODI

Microrganismi impiegati

Sono stati impiegati due mutanti per il colore di *C. parasitica*, uno marrone e l'altro bianco, originati da uno stesso ceppo selvaggio virulento (2) (Pecchia *et al.*, 1991).

Il mutante bianco (*whi*) è stato ottenuto mediante mutagenesi con UV di una sospensione di conidi del ceppo selvaggio; il micelio è di colore bianco, il ceppo non sporula su mezzo agarizzato e sporula scarsamente dopo lunga incubazione quando nel substrato agarizzato viene immersa una porzione di rametto di castagno. Il mutante marrone (*brw*) è un mutante spontaneo proveniente da un isolamento monoonidiale su agar acqua, ha micelio e picnidi marroni e sporula abbondantemente su substrato agarizzato.

Inoculazioni artificiali

Le inoculazioni artificiali dei due mutanti e del ceppo selvaggio sono state eseguite sulla corteccia di giovani piante di castagno (ϕ 2-3 cm) con le modalità indicate da Jaynes e Elliston (1980). Su ogni pianta le inoculazioni sono state ripetute tre volte: una verso la base, una nella porzione mediana ed una verso l'estremità distale. Lo sviluppo dei cancri è stato rilevato dopo circa 6-7 settimane dall'inoculazione. Da ogni centro di infezione sono stati effettuati sei reisolamenti seguendo la metodologia descritta da Anagnostakis (1988).

Sensibilità a sostanze chimiche diverse

I due mutanti ed il ceppo selvaggio sono stati mantenuti su CM (Pecchia *et al.*, l.c.) per tutta la durata delle prove. I substrati contenenti le varie sostanze saggiate sono stati preparati come di seguito specificato: oligomicina e cloramfenicolo sono stati aggiunti al CM, precedentemente autoclavato, ad una temperatura di circa 50°C, i sali dei metalli pesanti ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , ZnCl_2), il potassio clorato (KClO_3), il PCNB (Marisan forte, SIAPÁ, 50% p.a.) e il saccarosio sono stati aggiunti al CM

immediatamente prima di autoclavare il substrato. Tutti i terreni di coltura sono stati aggiustati a pH=6 con NaOH 1N prima della sterilizzazione.

Dischetti di micelio (ϕ 6 mm), prelevati dal bordo di colonie in attivo accrescimento dei tre microrganismi allevati su CM a 25°C, sono stati seminati (tre repliche per ciascuna concentrazione) su CM addizionato delle sostanze sopracitate alle seguenti concentrazioni: oligomicina (0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,6 - 3,125 - 6,25 - 12,5 - 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$), cloramfenicolo (1 - 2 - 4 - 6 - 8 mg ml^{-1}), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , (0,5 - 1 - 2 - 4 - 6 mM), ZnCl_2 (1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 mM), KClO_3 (15 - 30 - 45 g l^{-1}), PCNB (10 - 100 - 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$), saccarosio (0,5 - 1 - 1,5 - 2 M).

Le piastre sono state incubate al buio a 25°C ed il diametro delle colonie è stato misurato dopo 6 gg utilizzando come controllo colonie sviluppate su CM. L'influenza sull'accrescimento delle varie sostanze saggate è stata espressa in percentuale rispetto al controllo.

RISULTATI

Inoculazioni artificiali

I risultati delle inoculazioni artificiali del ceppo selvaggio e dei due mutanti su giovani piante di castagno sono riassunti in Tab.1. Il ceppo selvaggio ed il mutante *brw* hanno prodotto i sintomi della malattia in tutti i punti di inoculo, mentre il mutante *whi* non ha prodotto alcun sintomo.

Circa i 2/3 dei reisolamenti effettuati da ogni centro di infezione hanno fornito esito positivo sia per il ceppo selvaggio che per il mutante *brw*, mentre il mutante *whi* non è mai stato reisolato.

Tab.1 - Patogenicità del ceppo selvaggio (2) di *Cryphonectria parasitica* e di due suoi mutanti (*brw* e *whi*) a seguito di inoculazioni artificiali a tre diverse altezze del fusto: una verso l'estremità distale (A), una nella porzione mediana (B) ed una verso la base (C).

Ceppo	Cancri ^(a)	N° reisolamenti ^(b)		
		A	B	C
2	3/3	3/6	4/6	4/6
<i>brw</i>	3/3	5/6	4/6	4/6
<i>whi</i>	0/3	0/6	0/6	0/6

(a) n° di cancri/n° di inoculazioni

(b) reisolamenti positivi/ reisolamenti tentati.

Sensibilità a sostanze chimiche diverse

La risposta, in termini di accrescimento, a dosi crescenti dei metalli pesanti è riassunta in Tav.I (a, b, c, d) da cui risulta come la tossicità dei quattro metalli possa essere così riassunta: $Hg^{2+} > Co^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+}$. Infatti tutti e tre i ceppi cessano l'accrescimento a concentrazioni (mM) comprese tra 1 e 2 per l' Hg^{2+} , tra 2 e 4 per il Co^{2+} , tra 4 e 6 per il Cu^{2+} e > 16 per Zn^{2+} . La risposta a concentrazioni crescenti di $HgCl_2$ è molto simile per tutti e tre i ceppi mentre su substrato addizionato di $CoCl_2$ il mutante *whi* si differenzia notevolmente dal ceppo selvaggio e dal mutante *brw* poiché il suo accrescimento alla concentrazione di 1 mM è inferiore alla metà di quello degli altri due ceppi. Diversa è la situazione, quando il substrato viene addizionato di $CuCl_2$: tutti e tre i ceppi vengono lievemente stimolati nel loro accrescimento da basse dosi di Cu^{2+} , mentre a dosi più elevate il ceppo selvaggio ed il mutante *whi* si mostrano più sensibili al metallo del mutante *brw*. In presenza di dosi crescenti di $ZnCl_2$ il ceppo selvaggio ed il mutante *brw*, seppure con andamento diverso a dosi intermedie, non arrestano il loro accrescimento neppure alla dose più elevata; il mutante *whi*, invece, si arresta a dosi comprese tra 16 e 32 mM.

La sensibilità del ceppo selvaggio e dei mutanti agli antibiotici saggiati (oligomicina e cloramfenicolo) è riassunta in Tav.II (a, b). In entrambi i casi è stata evidenziata una maggiore sensibilità del mutante *whi*, rispetto al ceppo selvaggio ed al mutante *brw*, cessando il suo accrescimento ad una concentrazione di antibiotico inferiore rispetto agli altri due. Nel caso del cloramfenicolo sono state saggiate anche concentrazioni superiori a 8 mg ml^{-1} , ma oltre tale concentrazione il prodotto cristallizza nel substrato agarizzato, come rilevato anche da Brasier e Kirk (1986), con un conseguente lieve incremento della crescita.

La Tav.IIc mostra la crescita dei tre ceppi, quando al substrato sono state aggiunte molarità crescenti di saccarosio. Piccole dosi stimolano la crescita dei tre funghi, mentre a dosi più elevate si ha una netta riduzione dell'accrescimento; alla concentrazione 2 M la crescita dei mutanti si arresta mentre quella del ceppo selvaggio, seppure drasticamente ridotta, prosegue.

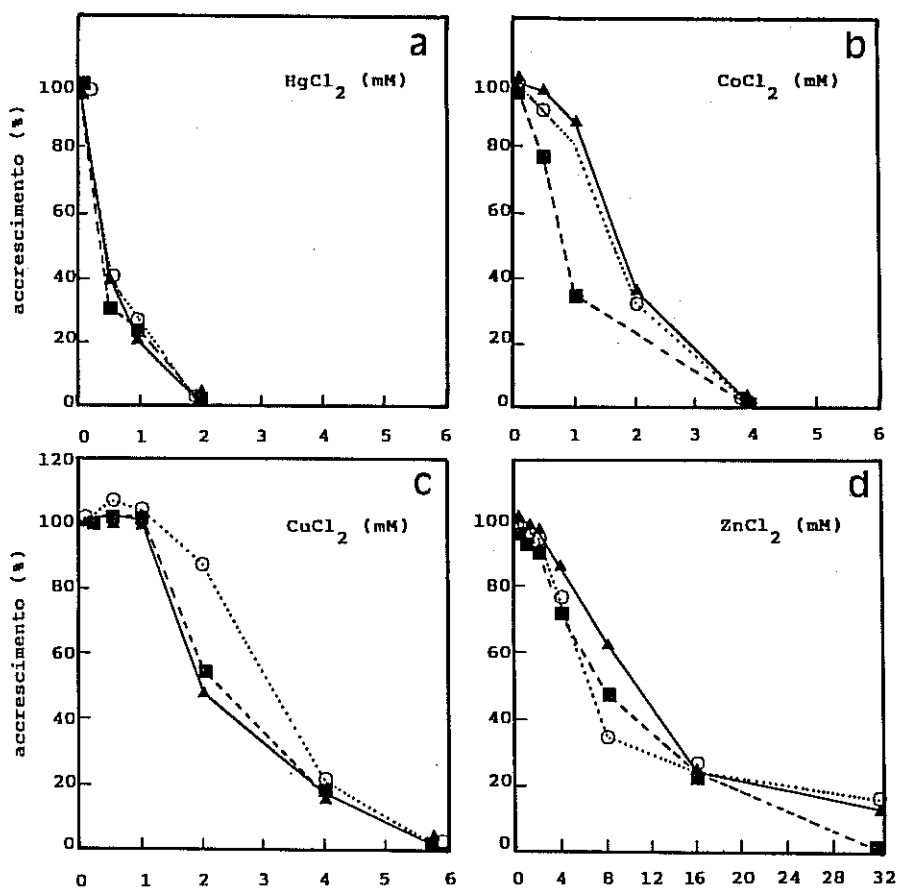
In presenza di PCNB (Tav.IId), seppure ad alte concentrazioni, i tre ceppi non arrestano il loro accrescimento; resta tuttavia da notare come, in questo caso, il mutante *whi* mostri una sensibilità minore al fungicida, rispetto al ceppo selvaggio ed al mutante *brw*, anche alla dose più elevata.

La sensibilità del ceppo selvaggio e dei suoi mutanti a dosi crescenti di potassio clorato, è riportata in Tav.IIe. I tre ceppi hanno un comportamento molto simile tra loro e non mostrano sensibili riduzioni di crescita neppure alla dose più elevata.

DISCUSSIONE

I risultati delle inoculazioni artificiali hanno evidenziato come il mutante *whi*, a differenza del ceppo selvaggio virulento e del mutante *brw*, non riproduce alcun sintomo della malattia e non è in grado di colonizzare i tessuti dell'ospite. È necessario, tuttavia, tenere presente che il mutante *whi* deriva da un trattamento di mutagenesi e quindi potrebbe essere portatore di più mutazioni o aberrazioni cromosomiche mentre ciò appare improbabile in mutanti spontanei (Teow e Upshall, 1983) quale è il mutante *brw*. La patogenicità di questo ceppo, la sua differente pigmentazione dal ceppo selvaggio e la sua origine spontanea lo rendono particolarmente attraente per ulteriori studi di genetica e di fisiologia. Le informazioni raccolte a seguito delle inoculazioni artificiali condotte con i tre ceppi confermano quanto già riscontrato "in vitro" da Pecchia *et al.* (1991) riguardo alla produzione di fenolossidasi, saggiata con il Bavendamm test. Il mutante *whi*, infatti, mostra una debole reazione su substrato di Bavendamm mentre i ceppi pigmentati producono una netta colorazione del mezzo imputabile alla produzione di fenolossidasi del tipo laccasi. Queste ultime sembrano essere coinvolte nella patogenesi, nella sporulazione e nella pigmentazione (Ringling *et al.*, 1989).

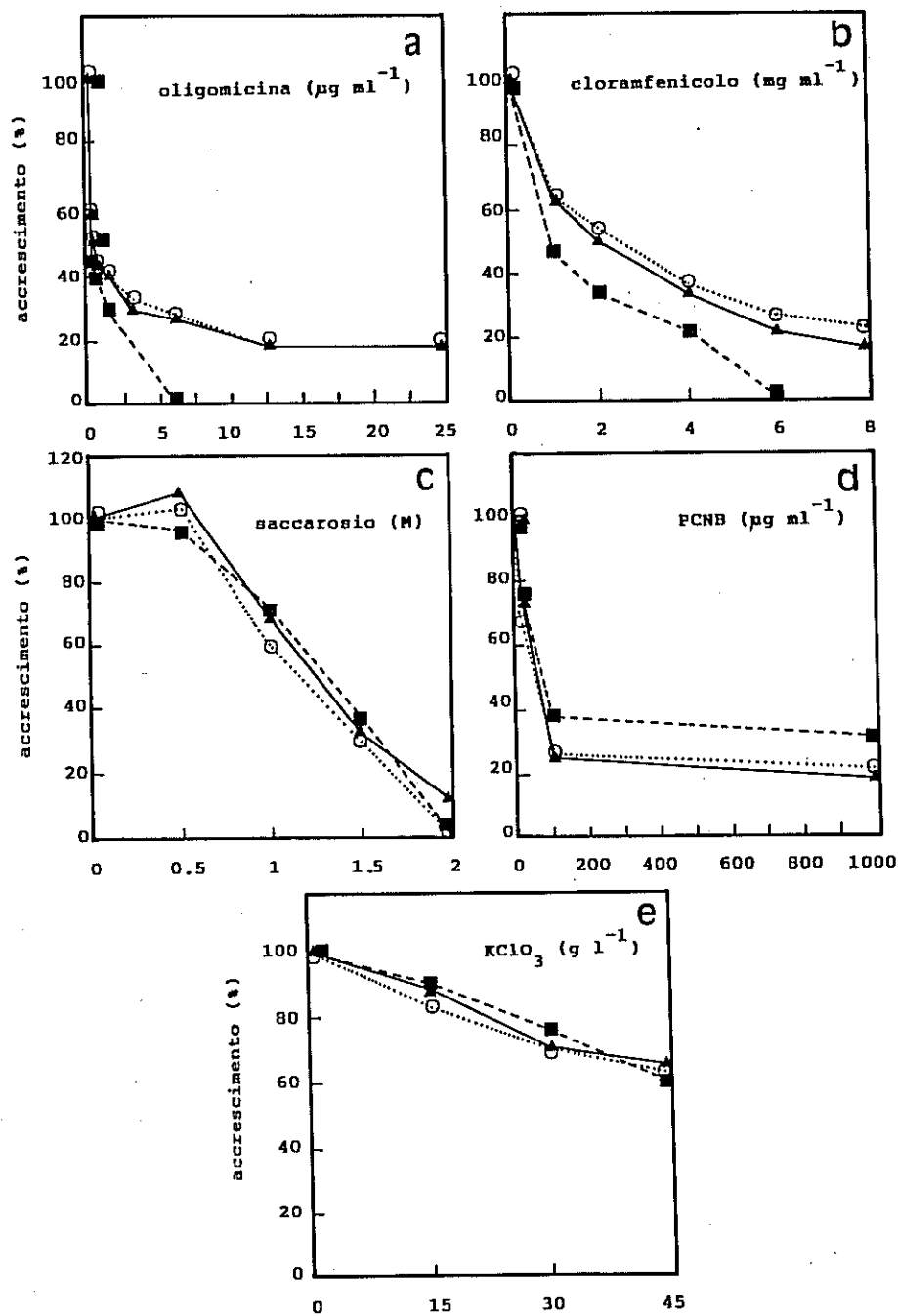
TAVOLA I



Tav. I - Sensibilità del ceppo selvaggio di *C. parasitica* (2) (▲—▲) del mutante *brw* (○—○) e del mutante *whi* (■---■) a dosi crescenti di $HgCl_2$ (a), $CoCl_2$ (b), $CuCl_2$ (c) e $ZnCl_2$ (d). I dati sono espressi come accrescimento percentuale rispetto al controllo.

Tav. II (pagina successiva) - Sensibilità del ceppo selvaggio di *C. parasitica* (2) (▲—▲) del mutante *brw* (○—○) e del mutante *whi* (■---■) a dosi crescenti di oligomicina (a), cloramfenicolo (b), saccarosio (c) PCNB (d) e $KClO_3$ (e). I dati sono espressi come accrescimento percentuale rispetto al controllo.

TAVOLA II



Circa la caratterizzazione dei ceppi saggiati per la sensibilità a sostanze chimiche diverse è opportuno ricordare che diversi costituenti dei substrati microbiologici sono capaci di legare una parte degli ioni metallici, appare chiaro quindi che i dati esposti circa queste sostanze hanno validità in riferimento al substrato di base impiegato (CM).

Concentrazioni crescenti di Hg^{2+} , saccarosio e potassio clorato inibiscono l'accrescimento dei ceppi saggiati in pari misura mentre la maggior parte delle rimanenti sostanze, ad eccezione del Cu^{2+} , è in grado di differenziare il mutante *whi* dagli altri due. Questo sembra confermare quanto esposto in precedenza circa la maggiore somiglianza genetica tra il ceppo selvaggio ed il mutante *brw*, rispetto al mutante *whi*. Quest'ultimo, tra l'altro, è normalmente più sensibile al Co^{2+} , allo Zn^{2+} all'oligomicina ed al cloramfenicolo mentre risulta più resistente al solo PCNB. Gli unici due metalli che consentono di differenziare il mutante *brw* dal ceppo selvaggio sono il Cu^{2+} e lo Zn^{2+} . Infatti la crescita di questo mutante è, rispettivamente, maggiore o minore se confrontata con quella del ceppo 2 quando allevato a concentrazioni intermedie tra quelle saggiate.

Facendo astrazione dalle differenze fra i singoli ceppi si può affermare che la sensibilità ai metalli pesanti saggiati vari nell'ordine $Hg^{2+} > Co^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+}$. Questa successione non è in linea con quello che sembra essere un comportamento generalizzabile nei funghi e che vede la successione così ordinata: $Cu^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+}$ (Cochrane, 1958). E' necessario, tuttavia, ricordare come *C. parasitica* produca, anche in coltura, acido ossalico (Havir e Anagnostakis, 1983; Bennett e Hindal, 1989). In agenti di carie del legno la produzione di questo acido è stata messa in relazione ad una ridotta tossicità del Cu^{2+} in quanto il metallo può precipitare sotto forma di cristalli di ossalato (Ross, 1975).

Circa le dosi di Zn^{2+} impiegate, che sono nettamente superiori rispetto a quelle degli altri metalli pesanti saggiati, occorre tenere presente che lo Zn^{2+} è un microelemento essenziale per la crescita dei funghi e diventa tossico solamente ad alte concentrazioni (Starling e Ross, 1991).

La resistenza agli antibiotici oligomicina e cloramfenicolo può risiedere in mutazioni mitocondriali utilmente impiegabili per studi di genetica (Rowland e Turner, 1975; Croft e Dales, 1983). Il ceppo selvaggio ed il mutante *brw* hanno mostrato una certa tolleranza anche a dosi elevate di tali sostanze, mentre il mutante *whi* è risultato piuttosto sensibile.

Il potassio clorato, analogo del nitrato, è stato impiegato per caratterizzare isolati di patogeni fungini sulla base della loro sensibilità a tale sostanza (Pearson *et al.*, 1986; Zizzerini e Tosi, 1989). Nel nostro caso, neppure a concentrazioni elevate si è avuta una sensibile riduzione dell'accrescimento evidenziando una scarsa sensibilità dei ceppi a tale sostanza.

Gli incrementi di crescita a basse dosi di saccarosio possono essere spiegati dal momento che una fonte di carbonio aggiuntiva potrebbe stimolare l'accrescimento; tali risultati concordano con quanto esposto da Hunter *et al.* (1976) sempre per *C. parasitica*.

Le informazioni raccolte consentiranno, quindi, di indagare la possibilità di ottenere mutanti spontanei resistenti ad alcune delle sostanze saggiate, allo scopo di impiegarli in studi sulla biologia del patogeno.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Prof. Tullio Turchetti per i preziosi suggerimenti forniti.

BIBLIOGRAFIA

ANAGNOSTAKIS S.L. (1988). *Cryphonectria parasitica*, cause of chestnut blight. In: Genetics of plant pathogenic fungi, (Sidhu G.S. Ed.), Academic Press, London, 123-136.

- BENNETT A.R., HINDAL D.F. (1989). Mycelial growth and oxalate production by five strains of *Cryphonectria parasitica* in selected liquid culture media. *Mycologia*, 81(4), 554-560.
- BRASIER C.M., KIRK S.A. (1986). Maternal inheritance of chloramphenicol tolerance in *Ophiostoma ulmi*. *Transaction of the British Mycological Society*, 87(3), 460-462.
- COCHRANE V.W. (1958). *Physiology of fungi*. New York, USA: Wiley.
- CROFT J.H., DALES R.B.G. (1983). Interspecific somatic hybridisation in *Aspergillus*. *Lecture Proceedings, 6th International Protoplast Symposium, Basel, August 12-16 1983*, 179-186.
- GARROD S.W., FULBRIGHT D.W., RAVENSCROFT A.V. (1985). Dissemination of virulent and hypovirulent forms of a marked strain of *Endothia parasitica* in Michigan. *Phytopathology*, 75, 533-538.
- HAVIR E.A., ANAGNOSTAKIS S.L. (1983). Oxalate production by virulent but not by hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. *Physiological Plant Pathology*, 23, 369-376.
- HUNTER P.P., GRIFFIN G.J., STIPES R.J. (1976). The influence of osmotic water potential on the linear growth of *Endothia* species. *Phytopathology*, 66, 1418-1421.
- JAYNES R.A., ELLISTON J.E. (1980). Pathogenicity and canker control by mixtures of hypovirulent strains of *Endothia parasitica* in American chestnut. *Phytopathology*, 70, 453-456.
- MCCARROL D.R., THOR E. (1985). Do "toxins" affect pathogenesis by *Endothia parasitica*? *Physiological Plant Pathology*, 26, 357-366.
- MICALES J.A., STIPES R.J. (1986). The differentiation of *Endothia* and *Cryphonectria* species by exposure to selected fungitoxicants. *Mycotaxon*, 26, 99-117.
- PEARSON C.A.S., LESLIE J.F., SCHWENK F.W. (1986). Variable chlorate resistance in *Macrophomina phaseolina* from corn, soybean, and soil. *Phytopathology*, 76, 646-649.
- PECCHIA S., PANATTONI A., FANTI S., VANNACCI G. (1991). Protoplast isolation and regeneration from wild-types and mutants of the chestnut blight pathogen *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, 56/2b, 443-456.
- RINGLING D., HEINIGER U., HOHL H.R. (1989). Reduction of laccase activity in dsRNA-containing hypovirulent strains of *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Phytopathology*, 79, 219-223.
- ROSS I.S. (1975). Some effects of heavy metals on fungal cells. *Transaction of the British Mycological Society*, 64(2), 175-193.
- ROWLANDS R.T., TURNER G. (1975). Three-marker extranuclear mitochondrial crosses in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics*, 141, 69-79.
- RUDOLPH K. (1976). Non-specific toxins. In: *Physiological Plant Pathology*, (Heitefuss R. e Williams P.H. Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 270-315.
- STARLING A.P., ROSS I.S. (1991). Uptake of zinc by *Penicillium notatum*. *Mycological Research*, 95(6), 712-714.
- TEOW S.C., UPSHALL A. (1983). A spontaneous mutation approach to genetic study of filamentous fungi. *Transaction of the British Mycological Society*, 81(3), 513-521.
- WOOD R.K.S. (1967). *Physiological Plant Pathology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, XII+570.
- ZAZZERINI A., TOSI L. (1989). Chlorate sensitivity of *Sclerotium bataticola* isolates from different hosts. *Journal of Phytopathology*, 126, 219-224.