

UNIVERSITÀ DI PISA
Facoltà di Agraria

*Corso di Laurea Magistrale in
Biotecnologie Vegetali e Microbiche*



Associazione molecolare
tra *Trichoderma virens*
e pianta
in diversi sistemi

Relatore:
Dott.ssa Mariarosaria Vergara

Correlatore:
Dott. Lorenzo Guglielminetti

Candidato:
Stefano Brizzolara

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. <u>INTRODUZIONE</u> | 4 |
| 1.1 <i>Trichoderma</i> | 4 |
| 1.2 <i>Trichoderma</i> come agente di biocontrollo | 5 |
| 1.3 Associazione molecolare fra <i>Trichoderma virens</i> e la pianta | 11 |
| 1.3.1 Induzione di resistenza nella pianta | 11 |
| 1.3.2 Promozione della crescita vegetale | 16 |
| 1.3.3 Colonizzazione radicale | 17 |
| 1.4 Enzimi degradativi della parete cellulare | 18 |
| 1.5 Geni codificanti per endopoligalatturonasi in funghi | 24 |
| 1.6 Importanza del genere <i>Trichoderma</i> in ambito biotecnologico | 26 |
| 1.7 Scopo della tesi | 28 |
| | |
| 2. <u>MATERIALI E METODI</u> | 30 |
| 2.1. Materiale biologico | 30 |
| 2.2 Sistema di interazione del fungo con radici vegetali in perlite | 31 |
| 2.2.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> | 32 |
| 2.2.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> | 33 |
| 2.2.3 Inoculazione degli apparati radicali | 35 |
| 2.2.4 Prelievo dei campioni | 35 |
| 2.3 Sistema di interazione del fungo con radici vegetali su piastra | 36 |
| 2.3.1 Crescita delle plantule | 37 |
| 2.3.2 Condizioni di interazione | 37 |
| 2.3.3 Trasferimento delle membrane | 38 |
| 2.3.4 Raccolta dei campioni | 38 |
| 2.4 Strumenti di bioinformatica | 39 |
| 2.4.1 Banche dati e strumenti bioinformatici | 39 |
| 2.4.2 Software per il disegno dei Primer | 40 |
| 2.5 Analisi biomolecolari | 40 |
| 2.5.1 Isolamento dell'RNA totale | 40 |
| 2.5.2 Trattamento dell'RNA con DNAsi | 41 |
| 2.5.3 RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR) | 42 |
| 2.5.4 Elettroforesi su gel di agarosio | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 3. <u>RISULTATI E DISCUSSIONE</u> | 44 |
| 3.1 I sistemi sperimentali di interazione <i>Trichoderma</i> / pianta | 44 |
| 3.1.1 Sistema induttivo in perlite | 44 |
| 3.1.2 Sistema induttivo in piastra con substrato agarizzato | 46 |
| 3.2 Analisi di espressione nell'interazione molecolare <i>T. virens</i> / <i>P. vulgaris</i> | |
| nel sistema in perlite | 48 |
| 3.2.1 Espressione dei geni <i>Tvpg1</i> e <i>Tvpg2</i> di <i>T. virens</i> in associazione con radici di <i>P. vulgaris</i> | 50 |
| 3.2.2 Espressione dei geni <i>pgip</i> di <i>P. vulgaris</i> nelle radici inoculate con <i>T. virens</i> | 52 |
| 3.3 Analisi di espressione nell'interazione molecolare <i>T. virens</i> / <i>A. thaliana</i> | |
| nel sistema in perlite | 55 |
| 3.3.1 Espressione dei geni <i>Tvpg1</i> e <i>Tvpg2</i> di <i>T. virens</i> in associazione con radici di <i>A. thaliana</i> | 57 |
| 3.3.2 Espressione dei geni <i>pgip</i> di <i>A. thaliana</i> nelle radici inoculate con <i>T. virens</i> | 59 |
| 3.4 Analisi di espressione nell'interazione con <i>T. virens</i> di <i>S. lycopersicum</i> e <i>A. thaliana</i> | |
| nel sistema in piastra | 62 |
| 3.4.1 Analisi di espressione nell'interazione <i>S. lycopersicum</i> / <i>T. virens</i> | 63 |
| 3.4.2 Analisi di espressione nell'interazione <i>A. thaliana</i> / <i>T. virens</i> | 67 |
| | |
| 4. <u>CONCLUSIONI</u> | 71 |
| | |
| 5. <u>BIBLIOGRAFIA</u> | 76 |

1. INTRODUZIONE

1.1 IL GENERE *TRICHODERMA*

Classificazione scientifica

Regno: Fungi

Divisione: Ascomycota

Subdivisione: Pezizomycotina

Classe: Sordariomycetes

Ordine: Hypocreales

Famiglia: *Hypocreaceae*

Genere: *Trichoderma*

Al genere *Trichoderma* appartengono funghi dalla distribuzione cosmopolita (Gams & Bisset, 1998) facilmente isolabili dal suolo e con attitudine saprofitaria; per quanto concerne le condizioni ambientali prediligono terreni acidi o sub-acidi e mostrano crescita ottimale fra i 25 e 30°C. I funghi appartenenti al genere sono a rapida crescita e producono una grande quantità di conidi unicellulari e, spesso, di clamidospore. In coltura su supporti quali cornmeal dextrose agar (CMD) le colonie risultano, in un primo momento, trasparenti oppure bianche su mezzi di crescita più ricchi, come potato dextrose agar (PDA). Tipicamente si assiste alla formazione dei conidi in una settimana ed essi presentano colorazioni che variano dal bianco al verde fino, con minore frequenza, al giallo. I conidi sono rinvenibili nel suolo, nell'aria, su semi e su materiale vegetale in decomposizione; le clamidospore si trovano essenzialmente nel terreno. Un pigmento giallastro può inoltre essere secreto nel mezzo, in particolar modo su PDA. Alcune specie producono un caratteristico odore dolce simile a quello della noce di cocco.

Persoon più di 200 anni fa classificò nel genere *Trichoderma* funghi rilevati nel suolo e nella materia organica in decomposizione introducendo questo genere nella tassonomia. Il nome si riferisce alla forma anamorfa, alla quale talvolta corrisponde una forma telomorfa appartenente

al genere *Hypocrea* (Cook & Backer, 1983). Tuttavia spesso la forma sessuata non è nota (Harman & Kubicek, 1998).

Questi microorganismi sono capaci di colonizzare una grande varietà di habitat grazie alla loro ottima adattabilità, alla minima necessità di nutrienti richiesta per il loro sviluppo ed all'elevata capacità di produrre enzimi degradativi extracellulari come cellulasi, chitinasi, glucanasi e pectinasi (Klein e Eveleigh, 1998), con i quali riescono a metabolizzare un'estesa gamma di materiali organici e di sostanze xenobiotiche. In generale è stato inoltre riscontrato che molti dei funghi appartenenti al genere sono resistenti a diverse tossine e composti xenobiotici presenti nella rizosfera, tra cui gli antibiotici delle piante, i fungicidi chimici (Harman *et al.*, 1996) e le fitoalessine prodotte dalle piante, molecole generalmente tossiche per la maggior parte dei funghi (Howell *et al.*, 2000).

1.2 **TRICHODERMA COME AGENTE DI BIOCONTROLLO**

Un agente di biocontrollo è un organismo che può contenere la crescita del patogeno, di un insetto o di erbe infestanti al fine di mantenerla al di sotto della soglia di danno economico.

Gli agenti di biocontrollo non lasciano residui sui prodotti destinati all'alimentazione, poiché vengono scelti tra quelli che non producono sostanze tossiche per l'uomo, sono quindi totalmente privi di rischi per la salute umana. Un'altra caratteristica vantaggiosa è la trascurabilità dell'impatto ambientale in quanto si tratta di organismi sono estremamente specifici e generalmente già presenti in natura.

Questi organismi possono essere impiegati per la costituzione di biofitofarmaci ma i prodotti che ne derivano presentano tuttora notevoli limiti rispetto all'efficienza e alla facilità d'utilizzo dei prodotti chimici: essi richiedono particolari condizioni di conservazione per il mantenimento della shelf-life; la loro efficacia è poco duratura e di entità variabile, spesso minore rispetto ai prodotti convenzionali; possiedono bassi livelli di compatibilità con altri

fitofarmaci o concimi.

Trichoderma riveste un ruolo importante nel controllo biologico delle colture grazie alle sue caratteristiche fisiologiche ed ecologiche come la presenza in molti suoli, le capacità antagonistiche, una versatilità metabolica molto elevata ed un'efficace colonizzazione della rizosfera delle piante, che sono ottimi presupposti per controllare un gran numero di funghi fitopatogeni (Papavizas, 1985). A queste caratteristiche si aggiunge spesso la capacità di comportarsi da induttore di resistenza e promotore della crescita delle piante.

Al genere *Trichoderma* appartengono molte specie in grado di comportarsi da agenti di biocontrollo, alcune delle quali già in commercio come biofitofarmaci di comune impiego. Esistono infatti più di 50 prodotti per l'agricoltura registrati nel mondo, a base di conidi o clamidospore di *Trichoderma* spp., che sono risultati efficaci in strategie di lotta biologica ed integrata. Un esempio è rappresentato da infestazioni telluriche di *Rhizoctonia solani* sensibilmente ridotte dall'utilizzo di questi biofitofarmaci (Koch, 1999; Lewis & Lumsden, 2001). L'isolato T39 di *T. harzianum* è uno dei ceppi più studiati come agente di biocontrollo ed ha importanti applicazioni: esso agisce efficacemente contro molti patogeni e su numerose colture, sia in campo che in serra, sfavorendo lo sviluppo delle fitopatie provocate da *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sphaerotheca fusca*, *Pseudoperonospora cubensis*, ecc. L'isolato sfrutta diversi meccanismi enzimatici per contrastare lo sviluppo di *B. cinerea*: la produzione di enzimi litici quali chitinasi e glucanasi, che agiscono direttamente sulle pareti cellulari del fungo, e l'azione di alcune proteasi (cisteinaproteasi) in grado di degradare gli enzimi prodotti e sfruttati dal patogeno per attaccare la pianta ospite (Kapat *et al.*, 1998; Elad, 2000). Gli oligomeri derivanti dalla parete cellulare del patogeno possono inoltre agire da induttori di resistenza sistemica nella pianta attaccata.

In generale gli enzimi litici (chitinasi, β -glucanasi e proteasi) sono considerati importanti enzimi attivi contro i patogeni vegetali (Calistru *et al.*, 1997). Il patogeno è impossibilitato a superare, mediante processi coevolutivi, il meccanismo d'azione messo in atto dall'agente di

biocontrollo siccome, anche nel caso in cui avvenissero modificazioni strutturali a livello della parete cellulare del patogeno, questi subirebbe una notevole variazione dell'adattabilità a quel determinato ambiente.

Per contrastare i fitopatogeni gli isolati antagonisti di *Trichoderma* utilizzano svariati meccanismi d'azione che spesso si integrano tra loro in maniera sinergica. I principali meccanismi sono l'antibiosi, la produzione di enzimi litici, la competizione per i nutrienti e per i siti d'infezione ed il micoparassitismo.

- Antibiosi e produzione di enzimi litici

L'antibiosi e la lisi enzimatica sono meccanismi d'azione che offrono la comune possibilità di agire contro il patogeno senza entrarvi in contatto diretto. Questi meccanismi possono inoltre avere un'azione sinergica che comporta una maggiore efficacia, come dimostrato da numerosi studi (Rey *et al.*, 2001; Howel, 2003; Limón *et al.*, 2004).

Gran parte dei funghi appartenenti al genere *Trichoderma* producono una vasta gamma di metaboliti secondari extracellulari, in molti casi con attività degradativa, e più di un centinaio di diversi metaboliti con attività antibiotica (Harman & Kubicek, 1998; Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998), che li rendono in grado di inibire lo sviluppo di una grande varietà di patogeni (Hjelrod & Tronsmo, 1988). Anche l'ambiente, oltre alle caratteristiche genetiche, influenza qualitativamente e quantitativamente la produzione di questi composti (Dennis & Webster, 1971; Claydon *et al.*, 1987; Vannacci & Pecchia, 1987; Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991; Howell & Stipanovic, 1995).

L'antibiosi nel genere *Trichoderma* è stata estesamente trattata da Howel (1998; 2003). Fra i numerosi antibiotici caratterizzati vi sono, ad esempio, la gliovirina e la gliotossina, isolata da ceppi di *T. viride* attivi contro *Pythium* spp. (Whilhite *et al.*, 1994), la trichodermina, prodotta in colture liquide da *T. viride* (Godtfredsen *et al.*, 1965), le trichozianine ed i peptaiboli, attivi contro un ampio spettro di funghi e batteri (Papavizas, 1985; Wiest *et al.*, 2002).

Il 6-Pentil- α -pirone (6-p-p), isolato per la prima volta da colture di *T. viride*, è tra gli antibiotici più comuni ed è il responsabile dell'aroma di noce di cocco caratteristico delle colture di molti isolati di *Trichoderma* (Collins & Halim, 1972). Questo antibiotico è in grado di inibire la germinazione conidica di *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, oltre a provocare una diminuzione della crescita ifale e dello sviluppo di sclerozi di *R. solani* (Scarselletti & Faull, 1994).

In generale chitinasi, cellulasi, β -glucanasi e proteasi sono importanti enzimi attivi nella degradazione della parete cellulare dei funghi fitopatogeni (Calistru *et al.*, 1997). L'antagonismo di *Trichoderma* mediato da queste tipologie di enzimi litici e proteasi è stato dimostrato in numerose ricerche, effettuate sia *in vivo* che *in vitro*. Sono inoltre molteplici gli studi che hanno permesso di dimostrare il loro ruolo nell'antagonismo e di rilevare i geni codificanti per tali enzimi in *Trichoderma* spp. (Mach *et al.*, 1999; Carsolio *et al.*, 1999; Limón *et al.*, 1999; Kullnig *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002).

I patogeni verso cui si esplica tale azione includono: *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* e *Botrytis cinerea*.

Da *Trichoderma* spp. sono stati purificati e caratterizzati numerosi enzimi litici (Lorito *et al.*, 1993), come quelli prodotti dall'isolato T5, appartenente a *T. viride*, che dispone di un ampio spettro di enzimi extracellulari amilolitici, cellulolitici, pectinolitici, lipolitici e proteolitici con azione antifungina dimostrata verso *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme*. Anche negli isolati T1 e T2 di *T. harzianum* sono state individuate le stesse attività (Calistru, 1997).

- Competizione per i siti d'infezione e per i nutrienti

La competizione è un importante meccanismo d'azione antagonista. In natura la capacità di sfruttare nutrienti e spazio a disposizione in maniera rapida ed efficace risulta fondamentale per la sopravvivenza di un microrganismo e nella regolazione dei rapporti ecologici di un ecosistema. E' importante dunque che un microrganismo, utilizzato come agente di biocontrollo, sia capace di crescere velocemente sfruttando il maggior numero possibile di fonti

di energia per esplicare al meglio la sua funzione.

La competizione per lo spazio consiste essenzialmente nella colonizzazione dei siti d'infezione attraverso le quali il patogeno penetra facilmente. Questa strategia è efficace, e quindi applicabile, solo verso quegli agenti eziologici che hanno siti d'infezione specifici, spesso perciò viene utilizzata sinergicamente insieme ad altri meccanismi d'azione, come l'antibiosi, la lisi enzimatica e la produzione di metaboliti tossici. Anche i funghi micorrizici sono interessanti candidati al controllo biologico in virtù della loro associazione obbligata con le radici: essi infatti, colonizzando l'apparato radicale, possono impedire l'attacco del patogeno competendo per il suo sito di infezione.

La competizione per i nutrienti è un meccanismo d'azione a più ampio target ed è una forma di controllo biologico in quanto le carenze nutritive rappresentano la causa di morte più comune dei microrganismi.

Quando i nutrienti nel suolo scarseggiano, i funghi del genere *Trichoderma* persistono allo stato quiescente sotto forma di clamidospore e conidi; quando invece si trovano in condizioni di abbondanza di nutrienti, questi funghi colonizzano il substrato rapidamente essendo caratterizzati da un elevato tasso di crescita e della capacità di ottenere ATP dal catabolismo di una grande diversità di fonti carboniose.

Come riscontrato dall'isolamento di un trasportatore (Gtt1) ad alta affinità nel ceppo 2413 di *T. harzianum* (Delgado-Jarana *et al.*, 2003), nella competizione per i nutrienti sembra giocare un ruolo chiave il sistema di trasporto del glucosio, così come la capacità di competere nell'assorbimento di elementi nutritivi presenti nell'ambiente in quantità limitanti. Molte specie appartenenti al genere *Trichoderma* producono efficienti trasportatori proteici ferro-chelanti (siderofori) che mobilizzano il ferro presente nel suolo rendendolo indisponibile per gli altri microrganismi, limitandone così la crescita e lo sviluppo (Chet & Inbar, 1994). Questo meccanismo interviene, ad esempio, nel controllo di *Pythium* spp. da parte di *Trichoderma* (Benítez *et al.*, 2004). *Trichoderma* spp. sono risultate efficaci sia a livello dei residui colturali

che a livello della spermatosfera dove, esercitando la competizione per gli essudati seminali, riducono la germinazione degli sporangi del fitopatogeno *Pythium ultimum* (Ahmad & Baker, 1988).

Per *B. cinerea*, *Sclerotinia* spp. e molti funghi del genere *Fusarium*, l'inoculo iniziale può essere ridotto impiegando ceppi antagonisti di *Trichoderma* che colonizzano e competono per i nutrienti a livello dei residui floreali di vite, per i primi due generi citati, o dei residui colturali, nel caso di *Fusarium*.

- Micoparassitismo

Il micoparassitismo è un meccanismo d'azione che implica un'interazione biologica di natura trofica da parte del fungo antagonista a spese del fungo patogeno, particolarmente utile per la distruzione delle strutture preesistenti del patogeno nel terreno, come sclerozi e spore. Dal punto di vista fisiologico il fenomeno consiste in una serie complessa di eventi che vanno dal riconoscimento dell'ospite alla penetrazione ed uccisione di questo da parte dell'antagonista: dopo la fase di riconoscimento l'antagonista va incontro a cambiamenti morfologici finalizzati alla parasitizzazione, formando avvolgimenti ifali attorno alle ife dell'ospite (*coilings*) e appressori per la penetrazione (Benítez *et al.*, 2004) e rilasciando in seguito enzimi litici (come glucanasi e chitinasi) che, degradando le pareti cellulari dell'ospite, gli permettono di nutrirsi dei suoi contenuti cellulari.

È un fenomeno ben documentato sia con esperimenti *in vitro* che *in vivo*.

Esistono circa una trentina di geni noti, proteine e altri metaboliti direttamente coinvolti nel micoparassitismo compiuto dal genere *Trichoderma* (Harman *et al.*, 2004). Un esempio riguarda l'attività micoparassitaria di *Trichoderma* spp. nei confronti di sclerozi di funghi fitopatogeni come *Sclerotium cepivorum*, *S. rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis tulipae* (Vannacci *et al.*, 1989; Sarrocco *et al.*, 2006).

1.3 ASSOCIAZIONE MOLECOLARE FRA *TRICHODERMA* E LA PIANTA

1.3.1 Induzione di resistenza nella pianta

Il ruolo di *Trichoderma spp.* come induttore di resistenza nelle piante è stato studiato solo recentemente. *Trichoderma* si è rivelato in grado di indurre nelle piante resistenza localizzata e sistemica (ISR) contro vari patogeni, caratteristica che potrebbe risultare addirittura più importante dell'effetto antagonista diretto che queste specie hanno sui patogeni delle piante (Harman *et al.*, 2004).

Nelle piante esistono due tipologie di resistenza agli stress biotici:

- *Passiva*: comprende i mezzi di difesa che la pianta utilizza costitutivamente; essi possono essere sia di natura fisica (barriere anatomiche quali la parete cellulare, la cuticola e la lignina) che chimica (fenoli, alcaloidi, saponine, tannini, proteasi, glucanasi, ecc...).
- *Attiva*: presuppone il riconoscimento del patogeno da parte della pianta ed è perciò caratterizzata dalla ricezione da parte dell'ospite di segnali elicitori del patogeno, quali glucani, tossine, soppressori o proteine codificate dai geni di avirulenza, o di segnali che scaturiscono dall'attacco all'ospite, come gli oligogalatturonidi liberati dalla parete cellulare vegetale in seguito all'idrolisi catalizzata dalle poligalatturonasi del patogeno.

Per quanto riguarda la resistenza attiva, la risposta della pianta al riconoscimento del patogeno comporta una profonda modificazione del metabolismo cellulare vegetale che, in base alla rapidità e all'intensità della reazione, può comportare la compatibilità fra ospite e patogeno ed il conseguente sviluppo della malattia, oppure l'incompatibilità con lo sviluppo di resistenza da parte della pianta.

La specificità dell'interazione ospite/patogeno ha portato alla definizione della teoria "gene per gene", secondo la quale un composto elicitore codificato da un gene di avirulenza del patogeno (*avr*) è riconosciuto da un recettore codificato da un gene di resistenza dell'ospite (R),

determinando la formazione di un ibrido molecolare che innesca la serie di eventi culminanti con la reazione incompatibile, lo sviluppo di resistenza. Questa si manifesta con cambiamenti sia di tipo istologico (suberificazioni, lignificazioni, formazione di tille, papille, gomme e strati di abscissione) che biochimico. In quest'ultimo caso si assiste alla produzione di sostanze antimicrobiche fra cui:

- Fenoli → sostanze tossiche la cui produzione è intensificata dall'attacco del patogeno e si realizza con l'attivazione di vie biosintetiche specifiche così come da processi di decompartmentazione cellulare.
- Fitoalessine → sostanze dal basso peso molecolare, chimicamente eterogenee (possono essere terpenoidi, flavonoidi o altre molecole) e dalla forte azione antimicrobica, che sono sintetizzate ex-novo in seguito ad attacco del patogeno.
- Proteine PR (Pathogenesis Related) → enzimi litici (chitinasi, glucanasi, proteasi) ed ossidasi (perossidasi, lipossigenasi, polifenolossidasi) con azione difensiva, che si esplica tramite l'attacco e la disgregazione delle pareti ifali dei funghi patogeni.
- ROS (Reactive Oxygen Species) → molecole chimicamente instabili e fortemente ossidanti normalmente prodotte nelle cellule vegetali, soprattutto in mitocondri e cloroplasti, e detossificate tramite sistemi enzimatici (catalasi, superossido dismutasi, perossidasi) e non. Durante lo stress biotico si assiste ad una iperproduzione delle ROS che svolgono un'azione antimicrobica e antivirale; a questa azione diretta se ne aggiunge una indiretta che vede il coinvolgimento delle ROS nella risposta ipersensibile (Hypersensitive Response, HR) all'attacco del patogeno.
- Etilene → ormone coinvolto, oltre che nella produzione di proteine PR e nella lignificazione cellulare, anche nell'attivazione della resistenza a livello sistemico, fenomeno che vede implicate comunque numerose altre sostanze, prima fra tutte l'acido salicilico (SA).

La resistenza sistemica acquisita (SAR) delle piante è un meccanismo per il quale, dopo che un sito primario di infezione necrotizza (sia a causa della HR che della sintomatologia della malattia), i tessuti adiacenti e, successivamente, l'intera pianta acquisiscono resistenza a successivi attacchi patogenetici. Si tratta di resistenza di tipo aspecifico in quanto non richiede il riconoscimento fra ospite e patogeno nell'infezione secondaria ed è ad ampio spettro: conferisce una duratura resistenza di tipo sistemico (risultano immuni anche tessuti molto distanti dal sito di infezione primaria) contro diversi patogeni quali funghi, batteri, virus ed oomiceti.

Questa resistenza è inoltre un carattere multigenico, che vede il coinvolgimento di numerosi mediatori chimici, fra i quali:

- acido salicilico, acido jasmonico (JA)
- l'acido 2,6-dicloroisonicotinico (INA)
- il benzotiodiazolo (BTH).

Queste molecole segnale attivano i pathway biochimici della SAR, che comportano un incremento nella sintesi e nell'attività degli enzimi chiave per la biosintesi dei metaboliti di difesa, come ad esempio l'enzima fenil-alanina ammonio-liasi (PAL) e calcione sintasi (CHS).

Anche i soli metaboliti prodotti dai patogeni, alcune sostanze inorganiche, nonché numerosi microrganismi non patogeni sono in grado di indurre una resistenza sistemica: in questi casi si parla di resistenza sistemica indotta (Induced Systemic Resistance, ISR). Questa tipologia di resistenza ha le stesse caratteristiche della SAR in quanto è un carattere multigenico e ha azione sistemica, duratura ed aspecifica; tuttavia i mediatori chimici più frequentemente associati alla risposta ISR sono l'acido jasmonico e i suoi derivati anziché l'acido salicilico, tipicamente coinvolto nella risposta di tipo SAR.

Alla fine degli anni '90 venne dimostrata per la prima volta l'induzione di resistenza sistemica acquisita operata dall'isolato T-39 di *Trichoderma harzianum* (Bigirimana *et al.*, 1997). Trattando il suolo con questo fungo, piante di *Phaseolus vulgaris* erano in grado di resistere

alle malattie causate da *Botritis cinerea* e *Colletotrichum lindemuthianum*: sebbene fosse tellurico l'agente di biocontrollo induceva nella pianta una risposta anche verso patogeni fogliari (Bigirimana *et al.*, 1997; De Meyer *et al.*, 1998).

Successivamente sono stati condotti numerosi studi ad ampio spettro su piante monocotiledoni e dicotiledoni utilizzando differenti specie ed isolati di *Trichoderma*. L'isolato T-22 di *T. harzianum*, ad esempio, è in grado di indurre resistenza in diverse piante; in particolare è stato evidenziato per la prima volta il suo ruolo d'induttore di resistenza sistemica in *Zea mays* (Harman *et al.*, 2004), ma in seguito ha mostrato attività anche in *Solanum lycopersicum*, che acquisiva resistenza nei confronti di *Alternaria solani* (Seaman, 2003; Harman *et al.*, 2004).

In uno studio recente è stata riportata l'induzione di resistenza in *Arabidopsis* da parte di *T. atroviride* (M. A. Salas-Marina *et al.*, 2011). In questo lavoro è stato osservato che la pianta, inoculata sull'apparato radicale con *T. atroviride*, risulta protetta dall'attacco fogliare con patogeni batterici e fungini. Inoltre è stata per la prima volta riscontrata l'espressione simultanea di enzimi facenti parte del pathway dell'Acido Salicilico e dell'Acido Jasmonico/Etilene, indotta dalla colonizzazione delle radici da parte di *T. atroviride*, che hanno conferito alla pianta resistenza contro fitopatogeni emibiotrofi e necreatrofi.

Ad oggi l'induzione di resistenza localizzata e sistemica da parte di *Trichoderma* spp. è ampiamente documentata in studi che si riferiscono a più di 10 monocotiledoni e dicotiledoni, incluse graminacee, solanacee e cucurbitacee. La resistenza riscontrata si esplica nei confronti di funghi (*R. solani*, *B. cinerea*, *Colletotrichum* spp., *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora* spp., *Alternaria* spp., ecc.), batteri (*Xanthomonas* spp., *Pseudomonas syringae*, ecc.) e virus (*Cucumber mosaic virus*).

Molti di questi esperimenti dimostrano infatti che la colonizzazione radicale o fogliare di ceppi selezionati di *Trichoderma*, fra cui *T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviride* e *T. asperellum*, riduce lo sviluppo o i sintomi causati da uno o due differenti patogeni applicati in un sito diverso rispetto a quello del ceppo induttore di resistenza (Woo *et al.*, 2006); nella pianta si

assiste infatti alla sovra-espressione di proteine difensive (chitinasi, glucanasi, perossidasi), fitoalessine ed enzimi coinvolti nella risposta ai patogeni (come PAL e CHS).

I ceppi rizosfera-competenti di *Trichoderma*, addizionati al suolo sottoforma di spore o altre strutture di propagazione, entrano in contatto con le radici delle piante, germinano e le colonizzano limitandosi ai primi strati di cellule radicali, probabilmente a causa della reazione locale dei tessuti della pianta, come la deposizione di barriere di callosio (Yedidia *et al.*, 1999). La pianta percepisce quindi la presenza di *Trichoderma*, che mima l'azione di un patogeno, e risponde alla colonizzazione mettendo in atto dei cambiamenti associati all'induzione di resistenza che prevengono poi future infezioni da parte di patogeni.

La risposta difensiva nella pianta è stimolata principalmente da 3 classi di molecole prodotte da *Trichoderma* spp. (Harman *et al.*, 2004):

- Proteine con funzione enzimatica → sono inclusi peptidi dai 6.2 ai 42 kDa che inducono la produzione di fitoalessine terpenoidiche: ad esempio le xilanasi determinano l'induzione della sintesi di proteine PR (Lotan & Fluhr, 1990), di etilene (Sharon *et al.*, 1993; Avni *et al.*, 1994) o di acido salicilico (Martinez *et al.*, 2001).
- Proteine omologhe a quelle codificate da geni di avirulenza (avr) → ad esempio dall'analisi del proteoma di *T. harzianum* T-22 sono state individuate proteine omologhe alla AVR4 ed AVR9 di *Cladosporium fulvum* (Woo *et al.*, 2003) in grado di indurre resistenza sistemica.
- Oligosaccaridi o altri composti a basso peso molecolare → rilasciati dalle piante o dai funghi patogeni in seguito all'interazione con *Trichoderma* spp. per effetto degli enzimi che degradano le pareti cellulari.

Il tempo di permanenza della ISR è generalmente variabile (Seaman, 2003) ma si può ipotizzare che ceppi rizosfera-competenti di *Trichoderma*, crescendo in stretta relazione con la pianta, determinino resistenze sistemiche di lunga durata (Harman *et al.*, 2004).

1.3.2 Promozione della crescita vegetale

Come numerosi altri funghi e batteri induttori di resistenza rizosfera competenti (Kloepper *et al.*, 1993; Lindsey & Baker, 1967; Pozo *et al.*, 2002), molte *Trichoderma* spp. sono capaci di promuovere la crescita delle piante e di incrementarne la produttività, nonostante il dispendio di energia necessario per l'attivazione nella pianta dei pathways metabolici implicati nella resistenza.

L'interazione di *Trichoderma* con le radici determina un serie di benefici per le piante, quali:

- l'incremento a livello della rizosfera della concentrazione di nutrienti importanti;
- la produzione di fitormoni;
- l'inattivazione di composti tossici eventualmente presenti nel suolo;
- l'effetto indiretto determinato dal biocontrollo della microflora avversa.

L'effetto principale che questi funghi hanno sulla pianta è il maggiore sviluppo dell'apparato radicale, che può determinare un incremento nella biomassa totale e nella produttività: ad esempio, in mais semi trattati con l'isolato T-22 di *T. harzianum* sono risultati in grado di crescere e di dare il massimo della produttività usando fertilizzanti contenenti il 40% in meno di azoto, rispetto ai semi non trattati (Harman, 2000; Harman, 2001; Harman & Donzelli, 2001). Alcuni autori hanno denominato questo effetto "biofertilizzazione" (Benítez *et al.*, 2004), dal momento che le piante possono beneficiare dei fattori di crescita prodotti dal fungo: Benítez *et al.* (1998) hanno rilevato un incremento nella germinazione di semi spazialmente separati da *Trichoderma* tramite membrane di cellophane, ad indicare il coinvolgimento di molecole diffusibili prodotte dal fungo.

Sono stati identificati isolati di *Trichoderma* in grado di produrre fattori di crescita simili alla citochinina zeatina, alla gibberellina GA3 e, di recente, anche all'acido indolacetico IAA: *T. atroviride* produce molecole indoliche correlate all'acido indolacetico con effetto stimolante sulla crescita di *Arabidopsis* (Benítez *et al.*, 2004; M. A. Salas-Marina *et al.*, 2011).

Il concetto della "biofertilizzazione" è basato, oltre che sulla produzione di fitormoni da parte

di alcuni funghi di questo genere, anche sulla loro capacità di incrementare la disponibilità per la pianta di nutrienti limitanti nel suolo mediante solubilizzazione (soprattutto: Rame, Fosforo, Ferro, Manganese e Sodio). L'isolato T-22 di *T. harzianum*, ad esempio, produce siderofori che chelano gli ioni Ferro rendendoli maggiormente assimilabili dalle radici delle piante e riduce gli ioni di ossidi metallici aumentandone la solubilità (Altomare *et al.*, 1999).

Inoltre *Trichoderma* spp. possono influenzare positivamente la crescita delle piante inattivando alcuni dei composti tossici eventualmente presenti nel suolo: molti microrganismi associati alla rizosfera producono cianuro, molecola tossica che può essere degradata da alcune specie di *Trichoderma* mediante due differenti enzimi (Ezzi & Lynch, 2002).

1.3.3 Colonizzazione radicale

Le specie di *Trichoderma* sono in grado di rilevare la presenza delle radici, aderire agli strati cellulari superficiali, penetrarvi all'interno e resistere ai metaboliti tossici prodotti dalla pianta in risposta all'invasione da parte di altri microrganismi, patogeni e non (Benítez *et al.*, 2004). Tale tolleranza ai composti antimicrobici vegetali è una caratteristica ritenuta essenziale per la colonizzazione delle radici ed è stata associata alla presenza di trasportatori ABC (ATP-binding cassette), importanti anche per la resistenza a molte tossine e composti xenobiotici.

Alcuni funghi appartenenti al genere *Trichoderma* sono in grado di colonizzare le radici delle piante soltanto in maniera localizzata (Metcalf & Wilson, 2001), a differenza di altri "rizosfera competenti" che colonizzano l'intera superficie radicale per settimane (Thrane *et al.*, 1997) o mesi (Harman, 2000).

La colonizzazione radicale da parte di *Trichoderma* spp. interessa inizialmente la superficie delle radici, fase nella quale i funghi differenziano spesso delle strutture simili a quelle del micoparassitismo (appressori e coilings attorno ai peli radicali); in seguito le ife invadono l'epidermide radicale della pianta penetrando, generalmente, solo i primi strati di cellule dei tessuti radicali (Yedidia *et al.*, 1999; Yedidia *et al.*, 2000 ; Metcalf & Wilson, 2001). Sono stati

anche identificati ceppi di *Trichoderma stromaticum* endofitici, capaci di svilupparsi nel sistema vascolare delle piante di cacao (Evans *et al.*, 2003). L'interazione fra *Trichoderma* spp. e l'apparato radicale è solitamente di tipo non patogenico anche se esistono ceppi o specie che si comportano da patogeni per le piante ospiti o che producono alti livelli di metaboliti fitotossici (Bailey & Lumsden, 1998), tuttavia nella maggior parte dei casi questi funghi limitano l'infezione ai tessuti superficiali della radice.

La colonizzazione delle radici compiuta da *Trichoderma* spp. determina nella pianta cambiamenti consistenti nel metabolismo (Woo *et al.*, 2005): nel proteoma di piante di pomodoro cresciute in presenza di *Trichoderma* spp. è stata rilevata una variazione consistente che interessa più di 100 proteine, molte delle quali coinvolte nei processi di resistenza della pianta ai patogeni.

Concludendo, al genere *Trichoderma* appartengono funghi che possono sviluppare con la pianta un'importantissima associazione ritenuta, secondo alcuni autori, di tipo opportunistico, simbiotico ed avirulento (Harman *et al.*, 2004). Le spiccate proprietà antagonistiche, unite alla capacità di promuovere la resistenza sistemica e la crescita nelle piante con le quali interagiscono, rendono questi funghi un importante strumento per la difesa delle colture che consente, oltretutto, di ridurre l'utilizzo di fertilizzanti minerali e di fitofarmaci a beneficio dell'ambiente.

1.4 ENZIMI DEGRADATIVI DELLA PARETE CELLULARE

La parete delle cellule vegetali è costituita da tre strati successivi.

- *Lamella mediana*

E' il collante interposto tra cellule adiacenti, di consistenza viscosa e di circa 0,1 µm di spessore; questo strato viene costituito da entrambe le cellule durante il processo di mitosi cellulare ed è principalmente composto da materiale pectico. La pectina (eteropolisaccaride;

monomero $C_6H_{10}O_5$) deriva dalla condensazione dell'acido galatturonico (a sua volta originato dall'ossidazione del carbonio 6 del galattosio) a gruppo carbossilico ed è formata da una catena di molecole concatenate da legami di tipo α 1-4. La catena poligalatturonica può possedere gruppi carbossilici esterificati da gruppi metilici o acetilici; inoltre sono talvolta presenti dei componenti glucidici, fra questi il più comune è l'L-ramnosio (ramnogalatturonani).

L'elemento costitutivo maggiormente presente nella lamella mediana, che le conferisce una consistenza gelatinosa creando un ambiente ricco d'acqua, è il pectato di calcio. La lamella mediana è inoltre attraversata da filamenti di citoplasma (plasmodesma) e prolungamenti del reticolo endoplasmatico (desmotubulo) che insieme formano i plasmodesmi.

- *Parete primaria*

E' caratteristica delle cellule giovani e in accrescimento. In generale essa è deposta da ciascun protoplasto successivamente al processo di divisione; il materiale viene immesso nello spazio tra la lamella mediana ed il plasmalemma fino a formare uno strato che può variare da 0.1 ad alcuni μ m. La parete primaria è una componente molto elastica, soggetta a continue rielaborazioni a causa dello stiramento meccanico dovuto alla crescita della cellula. L'85-90% è costituito da una componente glicoproteica, mentre il resto è componente fibrillare; le microfibrille di cellulosa sono immerse in modo disordinato in una matrice gelatinosa costituita da pectine e proteine. In corrispondenza dei plasmodesmi si formano delle depressioni, chiamate "campi delle punteggiature primarie", che garantiscono la comunicazione con le altre cellule.

- *Parete secondaria*

Viene deposta tra il plasmalemma e la parete primaria in seguito al completamento dell'accrescimento cellulare per distensione. Ha uno spessore indefinibile ed è molto meno elastica della parete primaria; l'85-95% della parete secondaria è costituita da una componente fibrillare, la restante parte è una componente glicoproteica. Questa parete può essere costituita da diverse sostanze tra le quali:

- Cutina → Polimero amorfo di dimensioni e peso molecolare indefiniti formato da acidi grassi a lunga catena con gruppi alcolici legati tra loro attraverso legami esterici. Le due famiglie di acidi grassi in essa contenute sono tipicamente lipidi saturi, a catena C16 (acido palmitico) e a catena C18 (acido stearico), o monoinsaturi (acido oleico). Conferisce alla parete impermeabilità ad acqua e gas.
- Suberina → Poliesteri di acidi organici, come l'acido fellonico e quello suberinico, uniti a composti aromatici la cui principale funzione è di conferire impermeabilità.
- Sali minerali → Principalmente rappresentati da carbonato di Ca o di SiO₂; conferiscono durezza e talvolta fragilità.
- Lignina → Costituita da differenti acidi e alcoli fenilpropilici (cumarilico, coniferilico e sinapilico); l'accoppiamento casuale di questi radicali crea un polimero amorfo caratteristico. Essa conferisce resistenza meccanica e può essere presente anche nella parete primaria.

Molti dei microrganismi che interagiscono con le piante sono capaci di degradare le componenti della parete cellulare delle piante grazie ad un corredo di enzimi litici, definiti CDWE (Cell Wall Degrading Enzymes), che depolimerizzano i polisaccaridi in essa contenuti. Questi enzimi sono utilizzati sia dai microrganismi saprofiti per nutrirsi dei residui vegetali che dai microrganismi fitopatogeni, i quali li utilizzano invece per la penetrazione delle cellule vegetali e la colonizzazione della pianta.

I CDWE comprendono diverse classi di enzimi, tra cui:

- Pectinasi → attaccano essenzialmente la lamella mediana e la parete primaria delle cellule vegetali, entrambe particolarmente ricche di componente pectica;
- Cellulasi → agiscono a livello della parete secondaria;

- *Emicellulasi* → intervengono sulla miscela di emicellulose presente in tutti e tre gli strati.

Gli enzimi pectinolitici sono i primi a intervenire nell'interazione con la pianta, poiché la pectina è il componente principale dello strato più esterno della parete cellulare vegetale. Questi enzimi sono molteplici e possono essere distinti in base al loro meccanismo d'azione (lasi, metiltransferasi, idrolasi), al substrato sul quale agiscono (pectine metilate o acidi pectici) e al sito d'azione, che può essere interno (endo-) o alle estremità (eso-) della molecola attaccata.

La loro attività provoca la separazione delle cellule per digestione del cemento intercellulare e la disgregazione della parete primaria, effetti che causano morte cellulare e si manifestano, a livello macroscopico, con marciumi molli e asciutti.

Fra i vari enzimi pectinolitici, le poligalatturonasi sono le prime ad interagire con le matrici vegetali rendendo gli altri componenti di parete immersi nella matrice di pectina (cellulosa ed i frammenti degli xiloglucani) fisicamente accessibili alle cellulasi e alle emicellulasi. Nello specifico le endo-poligalatturonasi (endo-PG) risultano più attive nella decomposizione del substrato polimerico: la loro azione consiste nell'idrolisi del legame α -1,4 delle catene di acido α -D-galatturonico che compongono la pectina, che viene così scissa in oligomeri.

Le poligalatturonasi presentano un elevato grado di polimorfismo, ad esempio l'endo-PG secreta *in vitro* da *Fusarium moniliforme* consiste di quattro isoforme codificate da un unico gene e distinte per il diverso grado di glicosilazione (Caprari *et al.*, 1993b). Le varie isoforme di uno stesso enzima possono differenziarsi per quel che riguarda la stabilità, l'attività specifica, il pH ottimale, la cinetica di degradazione, i tipi di oligosaccaridi liberati e altre caratteristiche come il grado e la modalità di induzione della risposta nella pianta ospite.

I meccanismi di regolazione della produzione di questa tipologia di enzimi sono stati ampiamente studiati nei batteri fitopatogeni che causano marciumi molli (Collmer & Keen, 1986; Barras *et al.*, 1994) e risultano simili nei funghi necrotrofi. E' noto, infatti, che l'attività

pectinolitica costitutiva di questi microrganismi determina la liberazione del monomero D-galatturonato a partire dal polimero peptico; tale monomero è un induttore trascrizionale per la sintesi degli enzimi poligalatturonasi e pectatoliasi che, una volta secreti, completeranno la demolizione della pectina. Fattori ambientali (ad esempio il pH) e nutrizionali (quantità e tipo di carboidrati, disponibilità di fosfato e di nucleotidi adenilati) possono influenzare poi la regolazione della sintesi degli enzimi pectinolitici e delle forme isoenzimatiche (Scott & Fielding, 1985; Dean & Timberlake, 1989; Leone *et al.*, 1990; Favaron & Marciano, 1992).

Per quanto riguarda i funghi fitopatogeni biotrofi, l'attività pectinolitica è stata a lungo messa in discussione dal momento che, per loro natura, non possono determinare la morte delle cellule vegetali attaccate; è presumibile perciò che questi organismi producano bassi livelli di pectinasi o che sia presente un meccanismo di inibizione degli altri complessi enzimatici che degradano la parete cellulare.

Di recente è stato ipotizzato che in *Trichoderma* spp. gli enzimi CWDE e in particolar modo quelli pectinolitici svolgano invece un ruolo importante nell'interazione con la pianta. Come precedentemente descritto, alcune *Trichoderma* spp. sono in grado di instaurare una relazione simbiotica con la pianta penetrando solamente i primi strati della corteccia radicale, grazie alla degradazione delle pareti cellulari dei tessuti invasivi, presumibilmente con il coinvolgimento degli enzimi CDWE ed in particolare delle endo-PG.

Le endo-PG prodotte da *Trichoderma* spp. potrebbero anche essere coinvolte nell'induzione di resistenza sistemica (ISR), effetto benefico riscontrato spesso nelle piante colonizzate dai funghi appartenenti a questo genere: è stato infatti dimostrato il ruolo dei prodotti dell'attività delle endo-PG, gli oligogalatturonidi, nell'attivazione della risposta ipersensibile (HR) nella pianta ospite. Ciò suggerisce che le PG possano anche essere determinanti di specificità nell'interazione ospite-patogeno (De Lorenzo *et al.*, 1997) e avere un ruolo pre-elicitante nell'induzione di resistenza sistemica da parte di microrganismi non patogeni che le producono, come appunto *Trichoderma*. In tal senso è stata messa in risalto la relazione molecolare che

esiste fra endo-PG di origine fungina e le proteine vegetali inibitrici dell'attività poligalatturonasica (PGIP: Poly-Galacturonase Inhibiting Protein) (Federici *et al.*, 2001).

Analisi strutturali sulla sequenza aminoacidica delle endo-PG di diversi funghi hanno portato all'identificazione di alcuni aminoacidi, facenti parte della regione ospitante il sito attivo dell'enzima, indispensabili per la formazione del complesso molecolare con la PGIP. Ulteriori studi strutturali e fisiologici sull'interazione specifica tra endo-PG fungine e PGIP confermano che la specificità di riconoscimento tra queste due molecole riveste un'importanza cruciale per il processo infettivo, determinando il successo della risposta di resistenza nella pianta (Stotz *et al.*, 2000). Le PGIP possono pertanto essere considerate recettori delle endo-PG, ed i geni che le codificano sono a tutti gli effetti dei geni di resistenza delle piante. Il ruolo delle PGIP nella risposta difensiva delle piante è stato ampiamente dimostrato. Ad esempio la sovra-espressione di PGIP in pomodoro, *Arabidopsis*, tabacco e vite è stata messa in relazione con la riduzione dei sintomi causati da *Botrytis cinerea* (Powell *et al.*, 2000; Ferrari *et al.*, 2003; Manfredini *et al.*, 2005, Agüero *et al.*, 2005).

I geni codificanti per queste proteine, presenti in numero limitato nei genomi vegetali, sono stati identificati in molte piante fra cui: *Arabidopsis thaliana* (Ferrari *et al.*, 2003), *Brassica napus* (Li *et al.*, 2003), *Phaseolus vulgaris* (D'ovidio *et al.*, 2004), *Glycine max* (D'ovidio *et al.*, 2006), *Oryza sativa* e *Triticum aestivum* (Janni *et al.*, 2006) e *Solanum lycopersicum* (Stotz *et al.*, 1994) così come sono state analizzate dal punto di vista molecolare le proteine PGIP. Da questi studi è emerso che le PGIP sono caratterizzate da regioni ripetute ricche in leucina (LRRs: Leucine-Rich Repeats) (Jones & Jones, 1997): si trovano solitamente 10 LRRs, da 24 residui ciascuno, contenenti un motivo consenso xxLxLxx, composto cioè da residui idrofobici conservati di leucina (L) e residui non conservati (x), ritenuto responsabile del riconoscimento delle poligalatturonasi (Di Matteo *et al.*, 2003).

La produzione di enzimi degradativi della parete cellulare CWDE, in particolar modo delle endo-poligalatturonasi in *Trichoderma* spp., può essere quindi messa in relazione con la

capacità di questi funghi di penetrare i primi strati della corteccia radicale e determinare così, mimando l'azione dei fitopatogeni, una risposta difensiva sistemica nella pianta. Questo effetto benefico dell'interazione pianta-*Trichoderma* coinvolge probabilmente anche recettori vegetali specifici per le endo-PG, le PGIP, caratterizzate a livello molecolare dalla presenza di regioni specifiche per il riconoscimento delle rispettive PG.

1.5 GENI CODIFICANTI PER ENDOPOLIGALATTURONASI IN FUNGHI

Ad oggi sono state depositate in banche dati più di 100 sequenze diverse di endo-PG fungine che mostrano, ad eccezione di quelle identificate in *Aspergillus* spp., limitate omologie di sequenza nelle regioni codificanti (Annis & Goodwin, 1997). Inoltre in alcune di queste sequenze, come in quelle dei funghi fitopatogeni *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* (Wubben *et al.*, 1999), *A. niger* (Pernicova *et al.*, 2000) e nel basidiomicete *Chondrostereum* (Williams *et al.*, 2002), sono stati identificati geni multipli endo-PG raggruppati in famiglie geniche. Sebbene la variabilità interna alle sequenze delle endo-PG sia alta, è possibile comunque individuare una regione altamente conservata di circa 80 aminoacidi, corrispondente al sito attivo dell'enzima, presente in endo-PG di organismi appartenenti a regni diversi (Annis & Goodwin, 1997).

Uno dei primi studi effettuati sui geni codificanti per endopoligalatturonasi è stato quello condotto sul fungo patogeno *Fusarium moniliforme*, per il quale è stato isolato e sequenziato il gene *FmPG* a partire dall'mRNA di micelio cresciuto su pectina come unica fonte di carbonio (De Lorenzo *et al.*, 1987; D'Ovidio *et al.*, 1990; Caprari *et al.*, 1993a).

In generale, studiando l'espressione genica di queste funzioni sono state rilevate differenze nel grado di inducibilità, nella secrezione della proteina o nel pattern di espressione, dipendenti dal substrato di crescita (Herron *et al.*, 2000). La presenza di geni multipli o di isoforme della proteina rappresenta l'elevata versatilità delle funzioni endo-PG, che possono adattarsi a

svariate situazioni garantendo il successo del fungo nelle diverse condizioni fisiologiche, ad esempio in relazione alla specificità per un tessuto oppure per un ospite.

Per quanto riguarda le sequenze nucleotidiche relative alla regione del promotore, solo per alcune specie fungine, appartenenti a *Botryotinia*, *Aspergillus* e *Fusarium*, sono state identificate ampie sequenze (>1 Kb) della zona regolativa a monte della regione codificante del gene. Recenti studi riportano l'analisi di un gene endo-PG (ThPG1) in *T. harzianum* la cui espressione è correlata alla interazione con la pianta (Morán-Diez, 2009). Nel Dipartimento che ospita la presente attività di tesi è stato isolato e sequenziato un gene fungino codificante per endo-PG nel fungo fitopageno *Diaporthe helianthi* (Vergara *et al.*, 2003), successivamente studi analoghi sono stati condotti su *Trichoderma virens*, fungo per il quale dal 2007 è depositato in banca dati l'intero genoma.

A una prima identificazione nell'isolato I10 di *T. virens* di un gene endo-PG (*Tvpg1*) e della sua regione promotrice (Falcone, 2006) è seguito l'isolamento di un secondo gene (*Tvpg2*), mediante indagini bioinformatiche sul genoma disponibile di *T. virens* (Baroncelli, 2008).

Sono stati inoltre messi a punto sistemi induttivi, in coltura liquida e su radici di pomodoro *in vitro*, che hanno permesso di analizzare in modo preliminare l'espressione dei due geni endo-PG identificati. Da questi studi è emerso un diverso profilo di espressione, infatti in risposta a pareti cellulari vegetali e pectina *in vitro* un gene (*Tvpg1*) risultava inducibile mentre l'altro (*Tvpg2*) costitutivo (Baroncelli, 2008). Successivamente, in un altro lavoro di tesi (Moncini, 2009), è stata analizzata in maniera più approfondita l'espressione dei geni *Tvpg1* ed *Tvpg2* quando *T. virens* I10 interagisce con *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom e ne colonizza l'apparato radicale. Queste ultime analisi sono state effettuate in un sistema sperimentale *in vitro* utilizzando come substrato di interazione la perlite.

Queste ricerche hanno rappresentato la base di partenza per la realizzazione del presente lavoro di tesi, con il quale si è voluta ulteriormente analizzare l'espressione dei suddetti geni di *T. virens* I10, quando il fungo interagisce con la pianta e ne colonizza l'apparato radicale,

realizzando analisi di espressione che hanno riguardato diverse piante e che sono state svolte utilizzando per l'interazione pianta-fungo anche un nuovo sistema sperimentale.

1.6 IMPORTANZA DEL GENERE *TRICHODERMA* IN AMBITO BIOTECNOLOGICO

I funghi del genere *Trichoderma* rivestono un ruolo molto importante dal punto di vista biotecnologico, infatti in questo ambito esistono numerose applicazioni così come è vasta la gamma delle prospettive per un impiego futuro di questi microrganismi in molti settori (agro-industriale, ambientale, alimentare, farmaceutico).

Le biotecnologie industriali utilizzano questi funghi per una delle applicazioni più significative ad essi associata: esse sfruttano l'enorme capacità di degradazione enzimatica extracellulare di *Trichoderma*. Le β -glucanasi, pectinasi (tra cui le poligalatturonasi) ed emicellulasi prodotte da molte specie di *Trichoderma* sono, ad esempio, utilizzate per la produzione di succhi di frutta e durante il processo di macerazione delle olive (Galante *et al.*, 1998), mentre *Trichoderma reesei* Rut C-30, produttore di elevate quantità di cellulasi extracellulari, viene applicato per la produzione e il riciclaggio della carta (Kubicek *et al.*, 1993; Beguin & Aubert, 1994; Domingues *et al.*, 2000; Dienes *et al.*, 2004). Una cellulasi di *Trichoderma* spp. viene inoltre utilizzata per la sintesi, a partire dal cellobiosio, dell'acido 2-O-(β -DGlucopyranosyl) ascorbico, molecola farmacologica dalle proprietà antiossidanti analoghe alla pro-vitamina C (Toyada-Ono *et al.*, 2004).

La produzione di enzimi extracellulari che degradano polimeri carboniosi complessi è risultata importante anche per altre applicazioni biotecnologiche, quale il trattamento dei rifiuti organici e minerali, sia domestici che agro- industriali: ad esempio una serie di funghi, fra cui *T. viride* e *T. harzianum*, è stata utilizzata per il compostaggio aerobico in reattore di rifiuti domestici (Iyengar & Bhave, 2005).

Fra le prospettive più interessanti in ambito ambientale vi sono sicuramente quelle relative al

biorisanamento (*bioremediation*). Infatti molte *Trichoderma* spp. possiedono capacità di bioaccumulo e detossificazione di sostanze xenobiotiche e di metalli pesanti, che possono essere sfruttate per il trattamento dei terreni contaminati. Ad esempio, *Trichoderma* spp. isolate da terreni contaminati da cobalto rilevano resistenza a questo elemento (Pal *et al.*, 2005), mentre *T. viride* è in grado, quando cresciuto *in vitro* su mezzo nutritivo ricco in rame, di eliminare parte di questo metallo dal substrato e deporlo sulla superficie della parete cellulare (Anand *et al.*, 2005).

Trichoderma ha rappresentato uno strumento biotecnologico molto importante anche nel settore agricolo, in quanto antagonista di funghi fitopatogeni, con applicazioni promettenti in riferimento alle tematiche di salvaguardia ambientale. In questo campo la crescente esigenza di produttività agroalimentare e il conseguente abuso di fitofarmaci ed erbicidi, hanno determinato un accumulo ambientale di questi prodotti di sintesi caratterizzati da elevata persistenza, con inquinamento degli ecosistemi ed effetti nocivi sulla salute umana ed animale. L'impiego indiscriminato di queste sostanze ha comportato anche l'insorgenza di fenomeni di resistenza negli organismi bersaglio ed effetti indesiderati su quelli non-target. Per tutte queste ragioni da anni si stanno ricercando strumenti alternativi alla lotta chimica nei confronti dei patogeni vegetali, fra cui l'impiego degli agenti di biocontrollo. Si annoverano in questa categoria anche molte specie di funghi appartenenti al genere *Trichoderma*, che possono costituire il principio attivo nei così detti "farmaci microbici" o "biofitofarmaci". A queste considerazioni si aggiungono le importanti acquisizioni scaturite da studi recenti sull'interazione fra *Trichoderma* e la pianta, dai quali emerge infatti che alcune specie appartenenti al genere *Trichoderma* non solo si sono dimostrate capaci di indurre resistenza sistemica ai patogeni nella pianta ma si sono comportate anche da promotori della crescita vegetale.

1.7 SCOPO DELLA TESI

I funghi del genere *Trichoderma* hanno numerose applicazioni in molti settori delle biotecnologie e in particolare, in ambito agricolo, alcune specie rivestono un ruolo di primaria importanza in quanto efficaci agenti di biocontrollo dei fitopatogeni.

Alcune di queste specie mostrano anche la capacità di indurre nella pianta una resistenza localizzata e sistemica (ISR) a successivi attacchi patogeni ed hanno spesso l'abilità di promuovere un incremento della crescita e della produttività vegetale, instaurando con le piante un'associazione, a livello dell'apparato radicale, di tipo simbiotico, opportunistico e avirulento.

Il fungo colonizza le radici della pianta penetrando i primi strati dell'epidermide corticale per mezzo di attività enzimatiche che degradano la parete cellulare vegetale, fra le quali le endopoligalatturonasi rivestono un ruolo primario. Questi enzimi svolgono una funzione importante anche come pre-elicitori della risposta di resistenza nell'ospite, che spesso comporta la produzione di inibitori delle endopoligalatturonasi da parte della pianta (PGIP).

Il presente lavoro ha avuto lo scopo di analizzare, dal punto di vista molecolare, l'interazione che si instaura fra *Trichoderma* e le radici di diverse piante. Allo scopo sono stati presi in esame due sistemi sperimentali il primo dei quali ha consentito la crescita di *T. virens* su radici di *Phaseolus vulgaris* e *Arabidopsis thaliana*; per quanto riguarda il secondo, questo sistema ha consentito di far interagire il fungo *in vitro* con intere plantule di *Arabidopsis thaliana* e *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom.

L'isolato fungino scelto, *T. virens* I10, è oggetto di studio nel laboratorio ospitante quale agente di biocontrollo e induttore di resistenza, mentre in generale pomodoro e fagiolo sono piante di indubbio interesse agronomico. Per quanto riguarda *A. thaliana*, così come la cultivar di pomodoro presa in esame, essa costituisce una pianta modello, in particolar modo per analisi di tipo genetico-molecolare. Sono state scelte queste specie in quanto per ognuna di esse esistono geni codificanti per PGIP depositate in banca dati.

L'obiettivo prefissato è stato quello di analizzare l'interazione fra *T. virens* e le radici delle varie piante per indagare l'espressione genica degli organismi quando entrano in relazione, con riferimento ai geni endo-PG nel fungo e PGIP nelle diverse piante.

Da questo lavoro possono quindi scaturire informazioni utili anche per ulteriori studi sulla interazione simbiotica esistente fra le specie appartenenti al genere *Trichoderma* e le piante di interesse agricolo, specialmente in riferimento all'induzione di resistenza nell'ospite, aspetto di enorme importanza in ambito fitopatologico.

2. MATERIALI E METODI

2.1 MATERIALE BIOLOGICO

Il fungo preso in esame in questo lavoro è *Trichoderma virens* ceppo I10, n° 1058 nella micoteca del Dip. di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose e depositato presso il CBS (n° 116947). Il fungo è conservato in collezione a 4°C in tubi contenenti mezzo nutritivo PDA (Potato Dextrose Agar, SIGMA) 39 g/l ricoperto di olio minerale. Il micelio è stato trasferito in capsule Petri contenenti PDA poste in cella termostatica a 24 °C con un fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio in modo da consentire la ripresa della crescita fungina (*Fig. 1*); da queste colture è stato possibile ottenere il micelio fungino e le sospensioni conidiche necessari per l'attività di tesi.

I campioni da cui estrarre l'RNA sono stati ottenuti impiegando una particolare tipologia di coltivazione: sono state inoculate capsule Petri da 10 cm di diametro, contenenti PDA, sulle quali era stato precedentemente adagiato un disco di cellophane del medesimo diametro, sterilizzato per 40 minuti in autoclave a 120°C. Il disco è stato introdotto al fine di facilitare le operazioni di raccolta del micelio: il cellophane consente al fungo che vi aderisce di estrarre le sostanze nutritive dal mezzo sottostante, impedendo però la crescita ifale a contatto diretto con il substrato di crescita, facilitando notevolmente il prelievo del micelio. Le piastre così ottenute sono state successivamente poste in cella termostatica a 24°C e cresciute al buio di modo da ridurre la sporulazione fungina a favore della crescita vegetativa. Dopo una settimana di incubazione il micelio è stato recuperato asportandolo con una spatola dal cellophane, quindi congelato a -80°C.

Nello studio dell'interazione di *T. virens* con le radici di pianta, per il materiale vegetale sono stati utilizzati semi di pomodoro cv. Micro-Tom (*Solanum lycopersicum*) forniti dalla ditta "Nickys Nursery LTD" (www.nickysnursery.co.uk), semi di fagiolo cv. Borlotto rosso di

Lucca (*Phaseolus vulgaris*) forniti dalla ditta Gargini Sementi (Lucca) e semi di *Arabidopsis thaliana* gentilmente offerti dalla sezione di Fisiologia Vegetale del Dip. Di Biologia delle Piante Agrarie dell'Università di Pisa.



Fig. 1- *Trichoderma virens* su piastre di Potato dextrose agar (PDA)

2.2 SISTEMA DI INTERAZIONE DEL FUNGO CON RADICI VEGETALI IN PERLITE

Nel presente lavoro si è utilizzato un sistema induttivo che prevedeva l'inoculazione dell'apparato radicale di plantule di *Phaseolus vulgaris* e *Arabidopsis thaliana* cresciute *in vitro* in perlite con una sospensione conidica di *T. virens*, al fine di valutare l'espressione dei geni fungini e vegetali indagati per l'attività di tesi.

Il sistema preso in considerazione prevede 4 fasi, quali: la germinazione dei semi in camera umida, il trasferimento dei semi germinati in contenitori per la coltura *in vitro*, l'inoculazione dell'apparato radicale delle giovani plantule con una sospensione conidica del fungo *T. virens* ed infine il prelievo dei campioni, in seguito impiegati nelle analisi biomolecolari. Le prime due fasi, germinazione dei semi e coltura delle plantule, sono descritte separatamente per i due sistemi vegetali. Le successive tappe di inoculazione e campionamento sono descritte insieme essendo comuni per le due piante.

2.2.1 *Phaseolus vulgaris*

- Germinazione dei semi di *P. vulgaris*

I semi di *P. Vulgaris* sono stati sterilizzati mediante trattamento per 5 minuti in una soluzione di etanolo (40%) ed ipoclorito di sodio (10%) cui seguivano 3 lavaggi da 5 minuti ciascuno in acqua distillata sterile; quindi sono stati trasferiti nel numero di 30 per ogni camera umida sterile allestita.

Le camere umide sono state ottenute utilizzando vasche quadrate di vetro pirex aventi lato 22cm e altezza 10cm, sterilizzate mediante trattamento in autoclave per 20 minuti a 120°C.

Sul fondo delle vasche sono stati adagiati 3 fogli di carta da filtro imbibiti con 15 ml di acqua distillata dopodiché vi sono stati disposti, distanziati regolarmente l'uno dall'altro, i semi precedentemente sterilizzati. Infine le camere umide sono state chiuse con coperchi in plastica (pre-trattati con etanolo al 75% in modo tale che risultassero anch'essi sterili), sigillati con parafilm e poi con carta alluminata, in maniera tale da mantenere i semi al buio. Le camere umide sono state incubate quindi in cella termostatica per 4 giorni a 24°C.

- Coltura *in vitro* di *P. vulgaris*

In seguito all'incubazione i semi germinati sono stati trasferiti in Vasi Microbox forniti dalla ditta Micropoli, contenitori in polipropilene autoclavabile con base circolare e dimensioni pari a 80x60 mm (altezza x diametro). I Microbox sono adibiti alla coltivazione *in vitro* e caratterizzati da un coperchio ermetico con filtro idrofobico che consente alla coltura gli scambi gassosi con l'ambiente esterno, pur mantenendo le condizioni di sterilità.

In ognuno di questi contenitori è stato posto un substrato inerte rappresentato da 10g di perlite imbibita con 8 ml di acqua distillata. Il tutto è stato sterilizzato in autoclave per 20 minuti a 120°C e in seguito ogni vaso è stato addizionato di 18,5 ml di soluzione nutritiva di Hoagland (*Tab. 1*) sterilizzata in autoclave con un trattamento analogo al precedente. Per evitare l'evaporazione dell'acqua sterile addizionata ai vasi precedentemente alla sterilizzazione,

necessaria per l'ottenimento della giusta diluizione della soluzione nutritiva in fase di coltura, i filtri idrofobici presenti sui tappi dei Microbox erano stati coperti con uno strato di scotch, eliminato al momento del trasferimento dei semi nei vasi.

Sono stati trasferiti, lavorando in condizioni di sterilità, 5 semi pre-germinati di *P. vulgaris* per ogni vaso; la coltura ottenuta è stata posta in camera di crescita per 6 giorni a 24°C con un fotoperiodo di 9 ore di luce ed una luminosità pari a 110 PPF (Photosynthetic Photon Flux Density).

Tab. 1 - Composizione chimica della soluzione di Hoagland

| | |
|--|-----------|
| KNO ₃ | 1 g/l |
| MgSO ₄ | 0,49 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 3 g/l |
| K ₂ HPO ₄ | 2 g/l |
| FeCl ₃ EDTA | 0,007 g/l |
| CaCl ₂ (2H ₂ O) | 0,15 g/l |
| MnSO ₄ (H ₂ O) | 0,01 g/l |
| NaCl | 1 g/l |
| ZnSO ₄ | 0,002 g/l |
| H ₃ BO ₃ | 0,003 g/l |
| CuSO ₄ (5H ₂ O) | 0,025 g/l |
| NaMoO ₄ (2H ₂ O) | 0,2 g/l |

2.2.2 *Arabidopsis thaliana*

Per la realizzazione del sistema di *Arabidopsis thaliana* sono state seguite procedure leggermente diverse per quanto riguarda le prime due fasi, in quanto adattate alle condizioni ottimali per questa pianta.

Perciò le tappe differenziali risultano: la germinazione dei semi di *A. thaliana* e il relativo accrescimento in vasi per colture *in vitro* su mezzo agarizzato, il trasferimento delle plantule su perlite in contenitori Microbox. L'inoculazione dell'apparato radicale con *T. virens* ed il prelievo dei campioni sono stati effettuati secondo lo schema comune alle due piante.

- *Germinazione dei semi e coltura in vitro di A. thaliana*

I semi di *Arabidopsis thaliana* sono stati sterilizzati mediante trattamento per 2 minuti in una soluzione di etanolo (40%) ed ipoclorito di sodio (10%) cui seguivano 3 lavaggi da 4 minuti ciascuno in acqua distillata sterile; quindi sono stati trasferiti nel numero di 80 per ogni contenitore Microbox allestito. Ognuno di questi contenitori è stato precedentemente addizionato con 30 mL di terreno nutritivo agarizzato di Murashige Skoog (Tab. 2), con le concentrazioni saline ridotte ad 1/3 della soluzione originale (MS/3), e sterilizzato in autoclave per 20 minuti a 120°C. Le piante sono rimaste 35 giorni in camera di crescita a 24°C con un fotoperiodo di 9 ore di luce ed una luminosità pari a 110 PPF (Photosynthetic Photon Flux Density).

Tab. 2 Composizione chimica della soluzione nutritiva di Murashige Skoog (MS)

| Sali maggiori | | Sali minori | |
|--------------------------------------|-------|---|-------|
| Sale | mg/l | Sale | mg/l |
| NH ₄ NO ₃ | 1,650 | H ₃ BO ₃ | 6.2 |
| KNO ₃ | 1,900 | MnSO ₄ ·4H ₂ O | 22.3 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 440 | ZnSO ₄ ·4H ₂ O | 8.6 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 370 | KI | 0.83 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 | Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.25 |
| Na ₂ EDTA | 37.5 | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.025 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27.8 | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.025 |

- *Trasferimento delle plantule di A. thaliana in perlite*

Per il trasferimento delle piantine sono stati allestiti vasi Microbox contenenti 5g di perlite imbibita con 5 ml di acqua distillata ciascuno; ad essi, successivamente alla sterilizzazione in autoclave per 20 minuti a 120°C, sono stati aggiunti 11,5 ml di soluzione nutritiva di Hoagland (Tab. 1), sterilizzata in autoclave con un trattamento analogo al precedente. Anche in questo caso i filtri idrofobici presenti sui tappi dei Microbox erano stati coperti con uno strato di

scotch, eliminato successivamente alla sterilizzazione. Sono state trasferite, lavorando in condizioni di sterilità, 15 piantine di *A. thaliana* per vaso, da inoculare immediatamente.

2.2.3 Inoculazione degli apparati radicali

Gli apparati radicali delle plantule sviluppatasi *in vitro* sono stati inoculati con una sospensione conidica di *T. virens* I10. Per l'ottenimento di questa sospensione si sono realizzate colture di *T. virens* I10 inoculando capsule Petri da 90 mm di diametro contenenti mezzo nutritivo PDA.

Dopo 7 giorni di incubazione in cella termostatica a 24°C e con fotoperiodo di 12 ore luce/buio, è stata recuperata dalle piastre di coltura la sospensione conidica; essa è stata diluita ad una concentrazione finale pari a 3×10^6 conidi/ml, quindi utilizzata per l'inoculazione dell'apparato radicale delle plantule di *P. vulgaris* e *A. thaliana* cresciute *in vitro* (Par. 2.2.1 e 2.2.2). Ciascun apparato radicale delle giovani plantule è stato inoculato con 1,5 ml e 500 µl di sospensione conidica nel caso del fagiolo e di *Arabidopsis* rispettivamente.

Dopo l'inoculazione le colture sono state nuovamente poste in camera di crescita alle stesse condizioni descritte in precedenza (Par. 2.2.1 e 2.2.2).

2.2.4 Prelievo dei campioni

A partire dall'inoculazione degli apparati radicali si sono effettuati i campionamenti per i 4 tempi presi in esame (24, 48, 72, 96 ore). Dopo aver asportato la porzione epigea delle plantule inoculate, mediante un taglio netto a livello del colletto con un bisturi sterile, è stato raccolto tutto il contenuto dei vasi di coltura, ovvero il substrato di crescita e gli apparati radicali inoculati di *P. vulgaris* e *A. thaliana*.

Sono state preparate anche delle tesi controllo per il fungo: in particolare sono stati allestiti vasi di coltura analoghi a quelli descritti (Par. 2.2.1 e 2.2.2) ma privi delle plantule e realizzati utilizzando una soluzione nutritiva di Hoagland (Tab. 1) addizionata di glucosio (5 g/l) e ammonio (4 g/l), al fine di sostenere la crescita di *T. virens* I10, in mancanza di nutrimento

derivante dalla presenza delle piante. La fase di inoculazione, eseguita come descritto precedentemente per i vasi con le piante, si è concretizzata con il rilascio uniforme della sospensione conidica di *T. virens* I10 nella perlite. Le tesi controllo sono state allestite in concomitanza dell'inoculazione nei sistemi induttivi, in modo da ottenere dei controlli coetanei da associare a ciascuno dei campioni prelevati ai diversi intervalli di tempo dall'inoculazione stessa.

E' stato previsto inoltre un controllo per le piante rappresentato dagli apparati radicali non inoculati di plantule di *P. vulgaris* e *A. thaliana*, cresciute in vasi di coltura analoghi a quelli del sistema induttivo ma senza l'aggiunta della sospensione conidica di *T.virens*. I campioni ottenuti e le tesi controllo sono stati conservati a -80°C in appositi contenitori (piastre Petri sterili) sino al momento del loro utilizzo.

2.3 SISTEMA DI INTERAZIONE DEL FUNGO CON RADICI VEGETALI SU PIASTRA

Sono state effettuate ulteriori analisi nel tentativo di saggiare la validità di un nuovo sistema di studio, utilizzando come modello l'interazione di *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* con *T. virens*. Lo schema sperimentale era realizzato facendo interagire gli organismi all'interno di una piastra Petri su substrato agarizzato, invece che in vasi Microbox su perlite come nel precedente sistema, e interponendo tra i diversi campioni (pianta o fungo) e i relativi substrati agarizzati di crescita un disco di cellophane, per facilitare la raccolta del materiale biologico e per poter campionare separatamente pianta e fungo anche ad interazione avvenuta (Fig. 2).

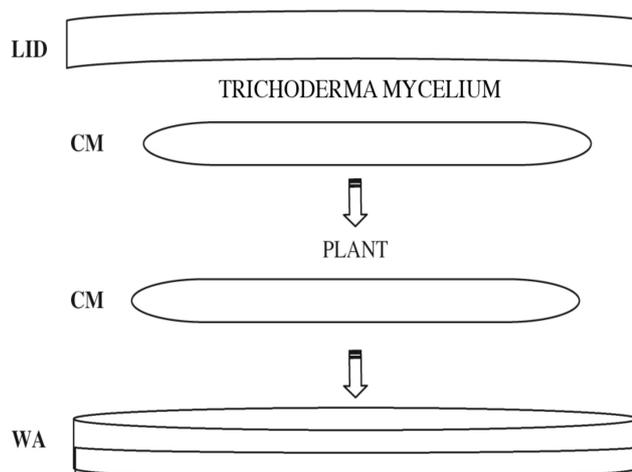


Fig. 2 - Schema del sistema a membrane realizzato in piastra: le plantule sono state adagiate su una membrana sterile di cellophane (CM) posta su WA e il fungo, cresciuto in precedenza su una membrana di cellophane posta invece su PDA, è stato prelevato e adagiato a sua volta sulle plantule. Il tutto è stato chiuso con il rispettivo tappo e incubato in camera di crescita.

2.3.1 Crescita delle plantule

- *Pomodoro*

Sono state utilizzate plantule di *S. lycopersicum* cresciute con il metodo descritto per il fagiolo (2.2.1). In questo caso però ogni vaso conteneva: 5g di perlite addizionata con 5 ml d'acqua distillata precedentemente alla sterilizzazione e 11,5 ml di soluzione nutritiva di Hoagland (Tab. 1) successivamente; 9 semi trasferiti in perlite dopo 4 gg di pre-germinazione. Le plantule sono state inoculate dopo 10 gg di coltura in camera di crescita.

- *Arabidopsis*

Sono state utilizzate plantule di *A. thaliana* cresciute nelle stesse modalità descritte in precedenza (2.2.2).

Le plantule sono state recuperate per l'inoculazione dopo 35 gg di coltura a queste condizioni.

2.3.2 Condizioni di interazione

Al momento dell'inoculazione le plantule sono state recuperate dai rispettivi substrati di crescita ed adagiate, nel numero di 10 per piastra per il pomodoro e di 13 per *Arabidopsis*, su un substrato di Water Agar (WA) all'1,5%. Queste piastre da 10 cm di diametro erano state

precedentemente addizionate con uno strato di cellophane sterile. Questo materiale è permeabile alle soluzioni biologiche con cui entra in contatto, consentendo la diffusione di macro e micro molecole (Kullnig *et al.*, 2000), e permette il recupero di campioni molto più puliti in quanto crea comunque una barriera fisica tra la pianta e il fungo. Quest'ultimo infatti non entra direttamente in contatto con la superficie della pianta, mentre l'interazione è stabilita mediante gli essudati che diffondono da entrambe le parti. Per la realizzazione del sistema sono state utilizzate piantine di pomodoro e *Arabidopsis* rispettivamente di 2 e 4 settimane, per poter lavorare con campioni di dimensioni analoghe.

Per quanto riguarda *T. virens*, esso è stato cresciuto su PDA in piastre Petri da 10 cm di diametro addizionate di uno strato di cellophane sterile, identico a quello utilizzato per le piantine. Ogni piastra è stata inoculata con 100 μ L di una sospensione conidica 5×10^5 spore/mL e lasciata 4 giorni in cella termostatica a 24 °C con un fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio.

2.3.3 Trasferimento delle membrane

Le membrane di cellophane su cui si è fatto crescere il fungo sono state trasferite, servendosi di due paia di pinzette di metallo sterilizzate, sopra la membrana su cui si erano adagiate precedentemente le plantule. Per quanto riguarda il timing si sono fatti coincidere il giorno del trasferimento delle piantine su WA con il quarto giorno di incubazione del fungo. A questo punto le piastre così realizzate sono state sigillate utilizzando del parafilm e trasferite in camera di crescita alle solite condizioni (a 24°C con un fotoperiodo di 9 ore di luce ed una luminosità pari a 110 PPFD).

2.3.4 Raccolta dei campioni

A 24 e 48 ore dall'inoculazione sono state recuperate 4 piastre/tesi raccogliendo separatamente fungo e pianta grazie alla presenza del cellophane. Sono state predisposte inoltre tesi di

controllo sia per *T. virens* da solo, su PDA, che per le piante senza il fungo, su WA, recuperate anch'esse insieme ai campioni a 24 e 48 ore dall'inoculazione, in quanto coetanee delle precedenti. Anche per i controlli sono state recuperate 4 piastre per il fungo e 4 per le piante ai due tempi di campionamento.

Tutti i campioni ottenuti (e le tesi controllo) sono stati conservati a -80°C sino al momento del loro utilizzo.

2.4 STRUMENTI DI BIOINFORMATICA

2.4.1 Banche dati e strumenti bioinformatici

Le banche dati biomolecolari sono archivi informatici di dati genomici e/o proteomici di diversi organismi interfacciate in modo da consentire l'estrapolazione di informazioni su specifiche sequenze (DNA, RNA e proteine), sia in termini di struttura e funzione che di referenze bibliografiche connesse.

Le banche dati sono distinte in *primarie*, quando contengono informazioni indispensabili per descrivere e caratterizzare le sequenze nucleotidiche o aminoacidiche raccolte, e *derivate*, quando collezionano informazioni specifiche che derivano o sono complementari a quelle contenute nelle banche dati primarie. Una volta estrapolati i dati, relativi alle sequenze nucleotidiche utilizzate in questo lavoro, interrogando le principali banche dati primarie (GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>], National Center for Biotechnology Information, NCBI; EMBL [<http://www.ebi.ac.uk/embl>], European Bioinformatics Institute, EBI; DDBJ [<http://www.ddbj.nig.ac.jp>]), essi sono stati analizzati servendosi di alcuni tra i numerosi strumenti bioinformatici implementati per eseguire ricerche ed estrarre dai dati immagazzinati l'informazione più significativa per le successive analisi (Masseroli *et al.*, 2004).

I *Sequence based tools* sono programmi che consentono di svolgere confronti fra la sequenza

fornita dall'utilizzatore ed ognuna delle sequenze registrate all'interno di una banca dati. Nel presente lavoro di tesi sono stati utilizzati per saggiare i primer utilizzati nelle analisi. In particolare è stato utilizzato BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) perchè abbina ad ogni sequenza simile (matching) a quella inserita (query) una stima statistica di similarità ed è caratterizzato da un'elevata affidabilità e rapidità di esecuzione. Con questo strumento è possibile effettuare, oltre all'allineamento fra la sequenza nucleotidica query e quelle in banca dati (Blastn), anche la traduzione della sequenza nucleotidica immessa nei sei possibili codici di lettura per poter individuare poi l'omologia delle proteine derivate con quelle contenute in una banca dati proteica (Blastx) o in una banca dati contenente sequenze aminoacidiche derivanti dalla traduzione di sequenze genomiche (tBlastx).

2.4.2 Software per il disegno dei Primer

Per disegnare i primer utilizzati nel presente lavoro sulle sequenze note di *A. thaliana* e *P. vulgaris* è stato utilizzato il software PRIMER3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). In seguito è stata valutata la compatibilità fra i primer individuati (in base alle temperature di melting, T_m) e l'eventualità di formazione di hairpin, dimeri e/o cross-dimeri utilizzando un altro software, NETPRIMER (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch>)

Una volta ottenute le sequenze, gli oligonucleotidi (selezionati nel lavoro) sono stati sintetizzati su commissione dalla ditta "Eurofins MWG Operon" (www.eurofinsdna.com).

2.5 ANALISI BIOMOLECOLARI

2.5.1 Isolamento dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto a partire dai campioni e dalle tesi controllo precedentemente prelevati (Par. 2.2.4 e 2.3.4), che sono stati dapprima liofilizzati e poi polverizzati in mortaio

con N₂ liquido. Tutti i materiali e le soluzioni utilizzate per l'isolamento dell'RNA sono stati sterilizzati dopo trattamento con un inibitore delle RNAsi: dietil pirocarbonato (DEPC).

Ad ogni campione è stato aggiunto un tampone di estrazione (1 ml ogni 20 mg di materiale liofilizzato iniziale) contenente nel rapporto 1:1:1 Sodio Acetato 0.15 M, SDS (Sodio-dodecilsolfato) 4% e Fenolo/Cloroformio/Isoamilalcol (50/49/1). Dopo 15 minuti di incubazione in ghiaccio i campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm per 5 minuti a 4°C ed estratti 3 volte con Cloroformio/Isoamilalcol (24:1). La fase superiore è stata poi precipitata con 2.5 volumi di Etanolo centrifugando a 13000 rpm per 30 minuti a 4°C ed il pellet ottenuto è stato risospeso in un opportuno volume di H₂O distillata trattata con DEPC. I campioni sono stati quindi conservati a -80°C.

2.5.2 Trattamento dell'RNA con DNAsi

Gli RNA isolati dai campioni sono stati purificati da eventuali residui contaminanti di DNA, mediante trattamento con DNAsi.

Ad ogni campione sono stati aggiunti i seguenti reagenti (forniti da Promega): enzima DNAsi (0,5 U/μg RNA), tampone di reazione BufferRQ DNAsi e l'enzima RNAsin (0,5 U/μg RNA) inibitore di RNAsi. La miscela di reazione è stata incubata per 45 minuti a 37°C ed in seguito estratta due volte con 1 volume di Fenolo:Cloroformio:Isoamilalcol (50:49:1) e due volte con 1 volume di Cloroformio:Isoamilalcol (49:1) centrifugando ogni volta a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C. I campioni sono stati poi addizionati di 0,1 volumi di Sodio Acetato 3 M pH4.0 (trattato con DEPC) e precipitati per una notte a -20°C con 3 volumi di Etanolo al 95%. Il giorno seguente sono stati centrifugati a 13000 rpm per 30 minuti a 4°C e lavati 2 volte con Etanolo al 75% centrifugando a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C.

I campioni sono stati infine risospesi in un opportuno volume di acqua sterile trattata con DEPC per ottenere la concentrazione finale di 0,5 μg RNA/μl e conservati a -20°C.

2.5.3 RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR)

La RT-PCR è una tecnica che prevede due fasi:

- retrotrascrizione dell'RNA in cDNA
- amplificazione del cDNA

Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato il kit RT-PCR Access (Promega) che consente la retrotrascrizione e l'amplificazione del cDNA ottenuto in una singola fase. Infatti in un singolo tubo di reazione viene addizionato sia l'enzima trascrittasi inversa AMV (isolato da Avian Myeloblastosis Virus), per la sintesi del primo filamento di DNA complementare (cDNA), che la DNA Polymerasi *Tfl* (isolata da *Thermus flavus*), per la sintesi del secondo filamento di cDNA e le successive reazioni di amplificazione. La miscela di reazione per ogni campione di RNA analizzato è stata ottenuta seguendo le indicazioni del protocollo fornito dal produttore (Promega) ed usando i reagenti forniti, con la sola aggiunta dei primer forward e reverse specifici.

La reazione di RT-PCR in questione è costituita da una fase di 45 minuti a 48°C per la sintesi del primo filamento di cDNA e da una fase a 94°C per 2 minuti volta all'inattivazione dell'AMV RT ed alla denaturazione di primer/RNA/cDNA; seguita 40 cicli di amplificazione a tre temperature (1: 30 secondi a 94 °C, 2: 1 minuto ad una temperatura specifica per la coppia di primer utilizzata, 3: 2 minuti a 68°C); la reazione è terminata con una fase di estensione di 7 minuti a 68°C.

2.5.4 Elettroforesi su gel di agarosio

La valutazione dei prodotti di amplificazione derivanti dalle RT-PCR è stata eseguita mediante elettroforesi su gel di agarosio per verificarne la lunghezza, in paia di basi, mediante l'uso di un marcatore di peso molecolare.

Questo metodo sfrutta la migrazione, indotta da un campo elettrico, di un frammento di DNA o la separazione di una miscela di frammenti sulla base del loro diverso peso molecolare. Il gel

utilizzato è stato preparato con agarosio all'1% in TBE 1X (Tris 89 mM, Acido Borico 89 mM, EDTA 2 mM) aggiungendo Gel-red (Biotium) 1:10000 (1 µl/10 ml gel) per la visualizzazione del DNA alla luce UV.

Per caricare i campioni sul gel così costituito, è stata aggiunta ad ognuno una soluzione colorante 6X (EDTA pH 8 25 mM, glicerolo 30%, orange G 0,5%, xilene-cianolo 0,075%) che ne favorisce, grazie alla presenza del glicerolo, il deposito all'interno dei pozzetti e, grazie ai coloranti in esso presenti, la visualizzazione del fronte di migrazione dei campioni nel gel.

Per l'identificazione dei pesi degli amplificati è stato utilizzato come marcatore 1Kb DNA Ladder (Promega) e la corsa è stata eseguita a temperatura ambiente in tampone di corsa TBE 0,5X. Terminata l'elettroforesi i gel sono stati esposti ai raggi UV e le immagini sono state acquisite su supporto elettronico tramite apparecchio UVP ImageStore 5000 oppure stampate utilizzando la stampante termica Sony-Video Graphic UP-860CE.