



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Dipartimento di Territorio e Sistemi Agro-Forestali

Corso di laurea in Biotecnologie Agrarie

Screening di mutanti knock-out per una cerato platanina del fungo *Fusarium*
graminearum e preparazione di un costrutto per doppia delezione genica

Relatore:

Prof. Luca Sella

Laureando:

Valerio Renna

Matricola n. 1007032

ANNO ACCADEMICO 2013 - 2014

INDICE

RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUZIONE.....	3
2. OBIETTIVI.....	6
3. MATERIALI E METODI	
3.1. Screening di mutanti knock-out per il gene <i>Fgsg_10212</i>	
3.1.1. Estrazione DNA e analisi tramite PCR.....	7
3.1.2. Estrazione e digestione DNA genomico.....	8
3.1.3. Preparazione sonda marcata.....	10
3.1.4. Analisi Southern Blot.....	11
3.2. Preparazione costrutto per delezione del gene <i>Fgsg_11205</i>	
3.2.1. Amplificazione regioni fiancheggianti del gene <i>Fgsg_11205</i>	13
3.2.2. Fusione delle regioni fiancheggianti con il gene marker: “PCR fusion”	14
3.2.3. Ottenimento dei costrutti “SPLIT MARKER”	16
3.2.4. Inserzione dei costrutti “SPLIT MARKER” nel vettore pGEM® – T Easy.....	19
3.2.5. Trasformazione delle cellule competenti.....	20
3.2.6. Screening dei batteri trasformati: “PCR colony”.....	21
3.2.7. Estrazione e digestione del DNA plasmidico.....	22
4. RISULTATI	
4.1. Screening di mutanti knock – out per il gene <i>Fgsg_10212</i>	
4.1.1. Analisi PCR dei putativi mutanti knock – out per il gene <i>Fgsg_10212</i>	24
4.1.2. Analisi Southern Blot delle colonie fungine mutanti.....	25
4.2. Preparazione costrutto per delezione del gene <i>Fgsg_11205</i>	
4.2.1. Amplificazione regioni fiancheggianti il gene <i>Fgsg_11205</i>	29

4.2.2. Legame delle regioni fiancheggianti al gene marker: “PCR fusion”	30
4.2.3. Amplificazione, purificazione e clonaggio dei costrutti “SPLIT MARKER”	30
4.2.4. Analisi delle colonie trasformate tramite “ <i>PCR colony</i> ”	31
4.2.5. Estrazione e digestione del DNA plasmidico	33
5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	35
6. BIBLIOGRAFIA	37

RIASSUNTO

Le cerato platanine sono una famiglia di piccole proteine idrofobiche fungine che sembrano indurre risposte difensive nelle piante e in alcuni casi sono state dimostrate coinvolte nel processo infettivo di alcuni funghi patogeni. Nel genoma del fungo *Fusarium graminearum* sono stati individuati due geni putativamente codificanti cerato platanine (*Fgsg_10212* e *Fgsg_11205*) i quali sono espressi durante il processo infettivo.

Per caratterizzare la funzione di queste proteine di *F. graminearum*, in particolare durante la patogenesi, verranno prodotti doppi mutanti knock-out di questi due geni mediante due distinti eventi di trasformazione. In questo lavoro di tesi sono stati analizzati 47 putativi mutanti knock-out per il gene *Fgsg_10212*, precedentemente ottenuti mediante ricombinazione omologa sito specifica utilizzando un costrutto contenente il gene marker di resistenza all'igromicina. Una analisi PCR ha consentito di identificare dieci mutanti resistenti all'igromicina e privi del gene *Fgsg_10212*. Una successiva analisi Southern Blot di sette di queste colonie mutanti ha consentito di identificarne tre con una banda di ibridazione dell'igromicina in corrispondenza di un frammento delle dimensioni attese di circa 6 Kb. Questi mutanti contengono tuttavia altre integrazioni ectopiche del costrutto. Successivamente si è proceduto con la preparazione del costrutto per il secondo evento di delezione che consentirà di ottenere il knock-out del secondo gene codificante cerato platanina di *F. graminearum* (*Fgsg_11205*) mediante ricombinazione omologa sito specifica. In questo caso è stato scelto un gene marker diverso, quello che conferisce resistenza alla geneticina (*Gen*), e si è utilizzata la tecnica "SPLIT MARKER": il costrutto è stato diviso in due frammenti ciascuno composto da una regione fiancheggiante il gene bersaglio e da un frammento incompleto del gene marker *Gen*. I costrutti sono stati sintetizzati tramite PCR di fusione e PCR nested e inseriti in un vettore plasmidico di clonaggio. Dopo trasformazione sono state identificate mediante PCR alcune colonie batteriche putativamente trasformate con i costrutti di interesse. I DNA plasmidici estratti da queste colonie sono stati digeriti per verificare la presenza dei due costrutti e per exciderli dal vettore in modo da poterli utilizzare in futuro per trasformare un mutante $\Delta CP10212$ precedentemente selezionato e ottenere il doppio knock-out dei geni codificanti cerato platanine di *F. graminearum*.

ABSTRACT

Cerato platanins belong to a family of small hydrophobic fungal proteins which seems to induce defensive responses in plants and have been shown to be involved in the infection process of some pathogenic fungi. Two genes putatively encoding cerato platanins (*Fgsg_10212* and *Fgsg_11205*) have been detected in the genome of the fungus *Fusarium graminearum* and have been shown to be expressed during infection.

To characterize the function of these *F. graminearum* proteins, particularly during pathogenesis, a double knock-out mutant will be produced by means of two separate transformation events. In this thesis 47 putative knock-out mutants for the *Fgsg_10212* gene, previously obtained by site-specific homologous recombination using a construct containing the hygromycin resistance marker gene, were analyzed. A PCR analysis allowed the identification of ten hygromycin-resistant knock-out mutants lacking the *Fgsg_10212* gene. A subsequent Southern Blot analysis of seven of these mutant colonies has allowed to identify three mutants with a hygromycin hybridization band in the correspondence of a fragment of the expected size of about 6 Kb. These mutants showed however other ectopic integrations of the construct.

Subsequently we proceeded with the preparation of the construct for the second event of deletion that will allow the knock-out of the second *F. graminearum* cerato platanin encoding gene (*Fgsg_11205*) by site-specific homologous recombination. In this case, a different marker gene, conferring resistance to geneticin (*Gen*), and the "SPLIT MARKER" technique were used: the construct was divided into two fragments each comprising a flanking region of the target gene and an incomplete fragment of *Gen*. The constructs, synthesized by fusion PCR and nested PCR, were inserted into a plasmid vector for cloning. After transformation some bacterial colonies putatively transformed with the constructs of interest were identified by PCR. The plasmid DNAs extracted from these colonies were digested to verify the presence of the two constructs and to obtain their excision from the vector in order to use them in the future to transform a $\Delta CP10212$ mutant previously selected. This will allow to obtain a double knock-out of the *F. graminearum* cerato platanin encoding genes.

1 INTRODUZIONE

Le piante hanno evoluto meccanismi di difesa capaci di limitare, circoscrivere e/o prevenire le infezioni fungine o batteriche che si possono distinguere in preformati e indotti. I meccanismi preformati sono costitutivi e quindi presenti in tutte le fasi vitali delle piante; i principali sono presenza di metaboliti secondari antimicrobici denominati fitoanticipine, strutture morfologiche quali cuticola e parete secondaria capaci di ostacolare l'ingresso nei tessuti, presenza di proteine o enzimi capaci di inibire o degradare i fattori di patogenicità. Queste difese preformate garantiscono un livello basale di difesa dalle infezioni; un grado di protezione più elevato è dato dai meccanismi indotti, tra i quali i principali sono l'accumulo di proteine di patogenesi (*PR proteins*), capaci principalmente di degradare le pareti fungine, la cosiddetta risposta ipersensibile, caratterizzata dall'accumulo di specie reattive dell'ossigeno e dalla morte cellulare programmata dei tessuti interessati dall'infezione, la produzione di metaboliti secondari ad azione antimicrobica detti fitoalessine e il rafforzamento delle strutture antipenetrazione preformate quali le pareti lignificate (Boller and He, 2009).

Le risposte indotte sono scatenate nelle piante esclusivamente a seguito di rilevazione dell'attacco e/o della presenza di un patogeno da parte del suo sistema immunitario; la fase di riconoscimento è quindi fondamentale perché la pianta possa attivare le risposte di difesa di cui dispone. Le risposte indotte portano a un tipo di resistenza detta sistemica acquisita; essa protegge l'intera pianta dall'attacco in corso e da attacchi successivi ed è attiva nei confronti di un ampio spettro di organismi fitopatogeni, arrivando anche a impedire completamente la crescita del patogeno durante gli attacchi secondari (Mur et al., 2008).

La presenza del patogeno è rilevata dal sistema immunitario delle piante tramite il riconoscimento di determinate molecole dette elicitivi delle risposte di difesa. Gli elicitivi possono derivare dal patogeno, ad esempio molecole strutturali quali la flagellina, e in questo caso prendono il nome di *PAMPs* (Pathogen Associated Molecular Patterns) o *MAMPs* (Microbe Associated Molecular Patterns), o dalla pianta, ad esempio frammenti di parete cellulare degradata dal patogeno.

Tra le molecole di origine fungina individuate indurre resistenza sistemica acquisita vi è la famiglia delle cerato platanine, proteine di piccole dimensioni, circa 120 amminoacidi, con una lieve omologia di sequenza con le idrofobine in quanto esibiscono una moderata idrofobicità e possiedono quattro residui conservati di cisteina che formano due ponti disolfuro (Pazzagli et al.,

1999). La prima cerato platanina isolata è stata quella prodotta dal fungo *Ceratocystis fimbriata* (Pazzagli et al., 1999), un ascomicete patogeno. Le cerato platanine di questo fungo sono secrete, ma sono presenti in parte anche nella parete fungina (Espino et al., 2010).

Le cerato platanine sono prodotte da molti funghi fitopatogeni e varie evidenze hanno portato alla conclusione che questa famiglia di proteine agisce sulla pianta come un elicitore delle risposte di difesa: foglie di pomodoro, tabacco e *Arabidopsis thaliana* infiltrate con una cerato platanina di *Botrytis cinerea* hanno mostrato la comparsa di segnali tipici della risposta ipersensibile, quali la produzione di specie reattive dell'ossigeno, e l'espressione di geni di difesa considerati marker di tale risposta (Frias et al., 2011); foglie di platano trattate con cerato platanine di *Ceratocystis fimbriata* dimostrano di aver attivato la resistenza sistemica acquisita poichè sono in grado di inibire la germinazione di conidi di questo fungo (Fontana et al., 2008); un mutante di *Arabidopsis thaliana* knock-out per il gene *Bak1*, codificante per un importante componente della cascata di segnali caratterizzante il riconoscimento di *PAMPs*, è moderatamente meno sensibile all'induzione di risposta ipersensibile causata dai trattamenti con cerato platanine di *Botrytis cinerea*, similmente a quanto osservato per altri ben caratterizzati elicitatori della risposta ipersensibile quali la flagellina e la proteina EF-Tu (Frias et al., 2011).

Tuttavia, perché la risposta difensiva limiti efficientemente l'attacco del patogeno è fondamentale il tempismo dell'attivazione. La produzione di linee transgeniche capaci di esprimere costitutivamente elicitatori delle risposte di difesa si è dimostrata interessante in un'ottica di lotta alle malattie microbiche a impatto ambientale ridotto. In un recente lavoro una cerato platanina di *Magnaporthe grisea* è stata espressa in *Arabidopsis thaliana* sotto controllo di un promotore inducibile. Piante in cui veniva attivato il gene sono risultate essere notevolmente più resistenti grazie alla attivazione della resistenza sistemica acquisita (Yang et al., 2009). Questa resistenza si è inoltre rivelata essere efficace verso un ampio spettro di organismi patogeni, anche molto distanti filogeneticamente dai patogeni produttori le cerato platanine. Sebbene la resistenza di queste linee transgeniche sia aumentata, la salute generale delle piante è ridotta dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno a seguito di risposta ipersensibile (Yang et al., 2009).

Oltre a indurre le risposte di difesa le cerato platanine potrebbero svolgere un ruolo anche durante il processo infettivo di alcuni funghi fitopatogeni.

In *Botrytis cinerea* il gene *BcSp1* codifica per una cerato platanina la quale risulta una delle proteine maggiormente espresse durante la crescita del fungo in presenza di estratto di pomodoro (Frias et al., 2011). La delezione di questo gene dal genoma di *Botrytis cinerea* ha prodotto un mutante che esibisce una ridotta virulenza nei test condotti su foglie di pomodoro (Frias et al., 2011); la cerato

platanina prodotta dal gene *BcSpl1* può quindi essere considerata un fattore di virulenza di *B. cinerea*.

Fusarium graminearum (telomorfo *Gibberella zeae*) è un fungo fitopatogeno appartenente al phylum degli ascomiceti. È l'agente eziologico della fusariosi della spiga ("Fusarium Head Blight"), una malattia i cui sintomi tipici sono il disseccamento, il raggrinzimento e la riduzione in peso della cariosside (Goswami et al., 2004). Attacca numerose graminacee come il frumento, l'orzo, la segale, l'avena, il sorgo, il riso e provoca ingenti perdite di resa del raccolto, e riduzione della qualità finale della granella, in quanto durante il processo infettivo il patogeno secreta micotossine appartenenti al gruppo dei tricoteceni. Tra i tricoteceni la principale è il Deossinivalenolo (DON), un potente inibitore della sintesi proteica che ha la funzione di bloccare le risposte difensive della pianta. Il DON è tossico anche per i mammiferi, in particolare per l'uomo e per gli animali da reddito; la sua ingestione provoca infatti vomito, diarrea e malfunzionamenti del sistema ematopoietico, ma può provocare anche la morte se assunta in quantità elevate (Trenholm et al., 1994).

Nel genoma di *F. graminearum*, che è stato completamente sequenziato, sono presenti due geni putativamente codificanti cerato platanine; un recente studio di secretomica ha dimostrato che queste sono secrete durante il processo infettivo (Brown et al. 2011).

Tuttavia la funzione delle cerato platanine di *F. graminearum* non è nota; esse potrebbero svolgere un ruolo di induzione di risposta ipersensibile favorendo così la crescita necrotrofica del fungo. Un'ipotesi di questo tipo è supportata dal fatto che *B. cinerea*, un altro fungo necrotrofo, utilizza questa strategia durante il processo infettivo (Frias et al., 2011).

Tuttavia la presenza di geni codificanti per cerato platanine anche in microorganismi fitopatogeni biotrofi mette in dubbio tale ipotesi e suggerisce l'esistenza di un altro possibile ruolo per queste proteine. Mutanti del patogeno biotrofo *Magnaporthe oryzae* che non producono le cerato platanine esibiscono infatti virulenza ridotta (Jeong et al., 2007).

2 OBIETTIVI

Il knock-out genico consiste nella delezione di uno o più geni da un genoma ed è una tecnica utilizzata per lo studio della funzione di una proteina tramite confronto di un mutante knock-out con il rispettivo fenotipo selvatico.

Nel genoma di *Fusarium graminearum* sono presenti due geni codificanti per cerato platanine, *Fgsg_10212* e *Fgsg_11205*. La funzione di queste proteine in questo patogeno è ignota e il presente lavoro è parte di un più ampio progetto il cui obiettivo è quello di creare un doppio mutante knock-out di questi due geni per stabilire il ruolo durante il processo infettivo.

Tale scopo sarà perseguito tramite due distinti eventi di trasformazione per ricombinazione omologa sito specifica, ottenuti grazie all'utilizzo di costrutti di delezione contenenti le regioni fiancheggianti al gene da eliminare; la presenza nel costrutto di sequenze omologhe a sequenze genomiche provoca l'evento di ricombinazione omologa sito specifica che determina l'excisione del gene di interesse e la sua sostituzione con un gene marker (resistenza ad un antibiotico).

La delezione del gene *Fgsg_10212* è stata precedentemente effettuata nel laboratorio dove ho svolto la tesi utilizzando come gene marker di selezione il gene codificante per la resistenza alla igromicina.

Poiché l'espressione del gene marker e quindi la capacità di crescita su substrato contenente l'antibiotico può avvenire anche in caso di inserzione ectopica nel genoma, l'acquisizione di tale fenotipo non è direttamente associabile all'eliminazione del gene bersaglio.

In questo lavoro di tesi sono stati analizzati 47 putativi mutanti knock-out per il gene *Fgsg_10212* precedentemente ottenuti e capaci di crescere in presenza di igromicina tramite analisi PCR e Southern Blot. I mutanti effettivamente mancanti del gene potranno poi essere utilizzati per il successivo evento di trasformazione.

La seconda parte del lavoro si è quindi incentrata sulla preparazione di costrutti per la delezione del secondo gene codificante cerato platanina di *Fusarium graminearum*, il gene *Fgsg_11205*. In questo caso si è ricorso all'inserimento di un gene marker differente, il gene codificante per la resistenza alla geneticina (*Gen*). A causa delle dimensioni del costrutto intero, difficile da ottenere per PCR e clonare, è stato necessario ricorrere alla tecnica "SPLIT MARKER" che prevede la preparazione di due distinti costrutti, ciascuno composto da una delle due regioni fiancheggianti il gene *Fgsg_11205* e da un frammento incompleto del gene *Gen*.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Screening di mutanti knock – out per il gene *Fgsg_10212*

3.1.1 Estrazione DNA e analisi tramite PCR

Per eseguire lo screening delle colonie fungine putativamente prive del gene *Fgsg_10212* tramite analisi PCR si è estratto il DNA con metodo di estrazione rapida. Una piccola quantità di micelio in attiva crescita è stato recuperato dalle piastre e immerso in 50 µL di *TE buffer* (Tris HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 0.1 mM pH 7.5). Trascorsi 15 minuti di incubazione a – 20 °C i campioni sono stati riscaldati per due volte per 50 secondi in microonde a massima potenza. Dopo 5 minuti a temperatura ambiente i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 13.200 rpm ottenendo così un surnatante contenente il DNA.

Il protocollo permette l'estrazione di esigue quantità di DNA e non consente la rimozione di tutte le DNasi presenti nelle cellule, esso quindi può essere utilizzato solo immediatamente e non è possibile la conservazione.

Per l'amplificazione si sono utilizzati primers (Tab.1) che permettessero l'amplificazione del gene *Fgsg_10212*, così da poterne verificare la presenza o l'assenza, del gene *Hyg*, che dovrebbe essersi sostituito al gene *Fgsg_10212*, e del gene *Fgsg_11205*, utilizzato come controllo positivo.

Come DNA stampo sono stati utilizzati i DNA genomici estratti dai mutanti.

Nome primer:	Sequenza:	Ta (°C)	Dimensioni (bp)
INT 10212 for	TTCACTGGTATCCTCTCTGC	51	195
INT 10212 rev	GTTGACACCACCGATGTACT		
INT 11205 for	ACCAACCCCTCTCTCAATAC	51	262
INT 11205 rev	GATGCTCTTGCCCTGTAG		
HygPRB2 for	CTCTCTCAAAGCATCACTCT	55	418
HygPRB2 rev	TAGTGTACCACTTGACCAAAA		

Tab.1: Sequenze dei primers forward e reverse utilizzati per lo screening dei mutanti, temperatura di annealing, dimensioni dell'amplicone.

Per le amplificazioni è stata utilizzata la seguente miscela:

- 1 µL di primer *forward* (10 pmol)
- 1 µL di primer *reverse* (10 pmol)
- 1 µL di DNA genomico
- 7 µL di acqua sterile
- 10 µL di 2x *REDTaqReadyMix PCR reaction Mix with MgCl₂*

Per ogni campione si sono effettuate tre miscele diverse con tre diverse coppie di primers capaci di amplificare i geni *Fgsg_10212*, *Hyg* e *Fgsg_11205*.

Il ciclo adottato per tale reazione di amplificazione è il seguente :

- 94 °C: 30 secondi
- 51 – 55 °C (*T_a* riportate in Tab.1): 30 secondi
- 72 °C: 30 secondi

Il ciclo è stato ripetuto 35 volte.

3.1.2 Estrazione e digestione DNA genomico

Dieci mutanti di interesse e un ceppo wild type (WT) di *Fusarium graminearum* (8/1) come controllo positivo sono stati messi in coltura in terreno liquido CM (1% glucosio, 0,05% estratto di lievito, 0,5% YNE ["Yeast Nitrogen Base w/o amino acids", Difco Laboratories]) e dopo tre giorni di crescita è stato estratto il DNA genomico dal micelio.

Per l'estrazione sono stati seguiti i seguenti passaggi: il micelio dei dieci campioni e del WT è stato recuperato e asciugato su filtro sterile e sono state recuperate quantità comprese tra i 200 e i 400 mg. I campioni sono poi stati omogeneizzati in presenza di azoto liquido con l'uso di mortai sterilizzati e lavati con acido nitrico al 30%. Il micelio così polverizzato è stato trasferito in provette contenenti 2 mL di 2x CTAB (2% CTAB, 100 mM TrisHCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 1,4 M NaCl, 1 % PVP) e β-mercaptoetanol (in proporzione 1:100 con il 2x CTAB). Per favorire la rottura delle pareti cellulari, i campioni sono stati messi a incubare per un'ora e mezza nel bagno termostato a 65 °C.

Trascorsa l'incubazione sono stati aggiunti 2 mL di cloroformio/alcol – isoamilico (in proporzione 24:1) e i campioni sono stati tenuti in ghiaccio e in agitazione per un'ora e mezza. Per separare le proteine e tutte le impurità dagli acidi nucleici i campioni sono stati centrifugati per venti minuti a 9000 rpm. L'operazione ha portato alla formazione di due distinte fasi: il surnatante, fase contenente il DNA, è stato recuperato e gli acidi nucleici presenti sono stati precipitati tramite aggiunta di isopropanolo (700 µL per ogni mL di surnatante recuperato) e di sodio acetato 3 M pH 5.2 (1/10 del volume di surnatante recuperato). A questo punto il DNA è stato incubato per 20 minuti a – 20 °C e poi precipitato sul fondo della provetta tramite centrifugazione per 20 minuti a 9000 rpm. I pellet formati sono stati poi lavati con 500 µL di etanolo al 70% e ricentrifugati per 20 minuti a 9000 rpm. Una volta eliminato l'etanolo e asciugato il pellet, quest'ultimo è stato risospeso in 300 µL di acqua.

Il DNA genomico estratto è stato utilizzato per analisi Southern Blot: è stato quindi necessario digerirlo con l'enzima di restrizione *Vsp I* che ha siti di taglio solo all'esterno delle sequenze fiancheggianti e del gene *Hyg* di cui si vuole verificare il numero di integrazioni. Per ogni campione sono stati quindi digeriti 2 µg di DNA genomico e le quantità da digerire sono state calcolate in base alla visualizzazione dei DNA genomici mediante corsa elettroforetica. L'RNA presente negli estratti di DNA genomico è stato eliminato mediante trattamenti con RNasi.

Per la digestione di ognuno dei campioni di DNA è stata utilizzata la seguente miscela:

- 65 - 200 µL di DNA genomico (circa 1 µg)
 - 50 µL di *Buffer D 10x* (Promega)
 - 5 µL di *BSA* (bovine serum albumin) (10 mg/mL)
 - 3,5 µL di *Vsp I* (12u/µL)
 - 1 µL di RNasi (10 mg/mL)
 - 240,5 – 375,5 µL di acqua sterile
- Per un volume totale di 500 µL.

La digestione è avvenuta overnight a 37 °C.

Dopo aver saggiato l'avvenuta digestione mediante corsa elettroforetica i campioni di DNA sono stati precipitati tramite aggiunta di un egual volume di isopropanolo, incubazione di 16 ore a – 20 °C e centrifugazione a 13.200 rpm per 15 minuti. Il pellet formatosi è stato risospeso in 40 µL di acqua sterile.

3.1.3 Preparazione sonda marcata

Prima di procedere con l'analisi Southern Blot è stato necessario preparare la sonda marcata omologa al gene *Hyg*; la sintesi della sonda è avvenuta tramite reazione di amplificazione.

Come stampo è stato utilizzato un DNA plasmidico contenente il gene *Hyg* e i primers sono gli stessi utilizzati per amplificare il gene nello screening di mutanti (Tab.1).

È stata utilizzata la seguente miscela di reazione:

- 1 µL di DNA plasmidico (circa 50 ng)
- 60 µL di H₂O sterile
- 10 µL di Buffer 10x
- 6 µL di MgCl₂ (25mM)
- 5 µL di dATP (1mM)
- 5 µL di dGTP (1mM)
- 5 µL di dTTP (1mM)
- 4 µL di dTTP (1mM)
- 1 µL di dUTP digossigenina (1mM)
- 1 µL di primer forward (10 pmol)
- 1 µL di primer reverse (10 pmol)

Il ciclo adottato per tale reazione di amplificazione è il seguente :

- 94 °C: 1 minuto.
- 51 °C: 1 minuto.
- 72 °C: 2 minuto.

Il ciclo è stato ripetuto 35 volte.

La DNA polimerasi incorporerà nell'amplicone anche residui di uracile coniugato con digossigenina, molecola che permetterà la rilevazione per chemiluminescenza della sonda tramite riconoscimento con anticorpi.

Successivamente il prodotto PCR è stato purificato con kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean – up System* (Promega). Il protocollo prevede l'utilizzo di colonnine di estrazione con membrana in silice.

Per legare gli acidi nucleici alle membrane sono stati aggiunti 50 μ L di *Membrane Binding Solution* ai campioni e il tutto è stato trasferito sulla membrana e incubato per un minuto a temperatura ambiente. Una volta permesso il legame del DNA alle membrane si sono centrifugati i campioni per 1 minuto a 13.200 rpm. A questo punto si sono effettuati due lavaggi, il primo aggiungendo 700 μ L di *Membrane Wash solution* e centrifugando per 1 minuto a 13.200 rpm, il secondo con 500 μ L dello stesso reagente centrifugando per 3 minuti a 13.200 rpm. Successivamente un ulteriore ciclo di centrifuga per 2 minuti a 13.200 rpm ha permesso l'evaporazione di eventuali residui di *Membrane Wash solution*. Il DNA legato alla membrana lavata dalle impurità è stato eluito tramite aggiunta sulla membrana di 40 μ L di *Nuclease-Free Water* e, trascorso un tempo di incubazione di un minuto, centrifugando per 1 minuto a 13.200 rpm.

3.1.4 Analisi Southern Blot

I campioni di DNA digerito sono stati incubati a 65 °C per 5 minuti e poi caricati su gel d'agarosio senza etidio bromuro. La corsa elettroforetica è durata 4 ore ed è avvenuta in tampone TAE (0,8 mM Tris HCl, 0,4 mM Acido acetico, 0,04 mM EDTA, pH 8) a 80 V. Una volta ultimata la corsa si è proceduto con la colorazione tramite immersione del gel in una soluzione di 150 ml di acqua sterile contenente 7,5 μ L di etidio bromuro (10 μ g/ μ L) per circa 15 minuti. A questo punto è stato possibile osservare e fotografare il DNA digerito. Successivamente il gel è stato sciacquato in acqua per dieci minuti.

Per denaturare il DNA il gel è stato posto in agitazione per 45 minuti in soluzione denaturante (NaOH 0,5M; NaCl 1,5M) e poi per 45 minuti in soluzione neutralizzante (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 1M, pH 8).

Successivamente si è passati alla parte di trasferimento del DNA dal gel alla membrana di nylon carica positivamente (Amersham Hybond -N⁺; GE Healthcare Life Sciences); quest'ultima è stata messa a contatto con il gel d'agarosio overnight e il trasferimento del DNA è avvenuto per capillarità in presenza di tampone salino SSC 10X (175,3 g di NaCl e 88,2 g di Na citrato, pH 7).

Una volta avvenuto il trasferimento la membrana è stata sciacquata per 10 minuti in soluzione SSC 2x, asciugata e incubata a 80°C per 45 minuti per favorire la fissazione del DNA.

A seguito del fissaggio si è passati alla fase di ibridazione con sonda specifica per il gene *Hyg*, precedentemente bollita per 5 minuti e raffreddata in ghiaccio per un minuto. Il filtro, precedentemente incubato per tre ore a 65 °C con soluzione di pre ibridazione [N-lauril sarcosina 0.1%, SDS 0.02 %, SSC 5x, blocking reagent 0.5%(Roche Applied Science)], è stato ibridato con la

sonda diluita (5 ng/cm² di membrana) direttamente nella soluzione di pre ibridazione tramite incubazione overnight in agitazione a 65°C.

Successivamente sono stati eseguiti quattro lavaggi stringenti a 65°C delle membrane con due soluzioni riscaldate contenenti SSC 1x e SDS 0.1% (primi due lavaggi da 20 minuti) e SSC 0,1x e SDS 0.1% (due lavaggi da 35 minuti).

La membrana è stata quindi immersa in *Washing Buffer* (Acido maleico 1x, Tween-20 0.3 % v/v) per cinque minuti e poi incubata a temperatura ambiente in *Blocking Solution* [Maleic Acid Buffer 1x, blocking reagent 1% (Roche Applied Science)] per un'ora in agitazione; in tal modo si bloccheranno tutti i siti aspecifici ai quali potrebbe legarsi l'anticorpo *anti-Digossigenina*. Alla soluzione è stato quindi aggiunto l'anticorpo *anti-Digossigenina* coniugato alla fosfatasi alcalina (Stock 750 U/ml) diluito 1:15000. Dopo incubazione delle membrane per 30 minuti a temperatura ambiente si sono effettuati due lavaggi di 15 minuti con *Washing Buffer* per rimuovere l'anticorpo non legato. Infine le membrane sono state incubate per 3 minuti in *Detection Buffer* (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM) in cui è stato diluito 1:100 il CDP-Star (25mM [Roche Applied Science]) che funge da substrato chemiluminescente per la fosfatasi alcalina. Le membrane state poi avvolte in una pellicola trasparente ed esposte per 30 minuti ad una lastra autoradiografica (Kodak) al buio in una cassetta di esposizione (Sigma-Aldrich). Lo sviluppo chemiluminescente su lastra è avvenuto mediante lavaggi rapidi in una soluzione di sviluppo e in una soluzione di fissaggio.

3.2 Preparazione costrutto per delezione del gene *Fgsg_11205*

3.2.1 Amplificazione regioni fiancheggianti del gene *Fgsg_11205*

Le sequenze delle regioni che nel genoma di *Fusarium graminearum* fiancheggiano il gene *Fgsg_11205* sono state ottenute dal database "*Fusarium comparative database*" (Broad Institute) e sono state utilizzate per disegnare primers specifici per amplificarle tramite reazione di PCR.

I primers (Tab.2) sono stati disegnati in modo da ottenere le due regioni denominate UP (regione a monte) e DOWN (regione a valle) con lunghezza 1027 bp UP e 871 bp rispettivamente.

I primers *UPrev GEN 11205* e *DOWNfor GEN 11205* (Tab.1) sono dotati di piccoli frammenti, circa 20 basi, omologhi alle estremità 5' e 3' del gene codificante per la resistenza all'antibiotico geneticina (*Gen*) (Fig.1), con cui dovranno essere successivamente fuse le regioni UP e DOWN.

Come stampo nella reazione di PCR è stato utilizzato il DNA genomico di *Fusarium graminearum* (ceppo *PH1*). Le miscele di reazione utilizzate per le due reazioni PCR differiscono solo per le coppie di primers (Tab.2).

Per le PCR sono state utilizzate le seguenti miscele di reazione:

- 1 µL di primer *UPfor 11205/DOWNfor GEN 11205* (10 pmol)
- 1 µL di primer *UPrev GEN 11205/DONWrev 11205* (10 pmol)
- 1 µL di DNA genomico
- 25 µL di *REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂ 2x* (Sigma)
- 22 µL di H₂O sterile

Il ciclo adottato per la reazione è stato il seguente :

94 °C: 30 secondi.

55 °C: 30 secondi.

72 °C: 1 minuti.

Il ciclo è stato ripetuto 35 volte.

Numero di corrispondenza in figura 1:	Nome primer :	Sequenza:
1	UPfor 11205	GAAGAGATGGTTGATGGGACA
2	UPrev GEN 11205	AACAACGGCATGAATTCGGATGATATCAGATCgaaggtgttggtgtgga
3	DOWNfor GEN 11205	gatgggacgggatacgtttaGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCA
4	DONWrev 11205	TTTTCCGAGGTACCTTGCTG

Tab.2: Primers utilizzati per la reazione di amplificazione delle regioni fiancheggianti; disegnati con l'utilizzo del programma "Primer 3". Le code omologhe alle estremità 5' e 3' del gene di resistenza alla geneticina contenute nei primers UPrev GEN 11205 e DOWNfor GEN 11205 sono riportate in minuscolo.

I due prodotti PCR sono stati purificati con kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean – up System (Promega). Come precedentemente descritto nel paragrafo 3.1.3.



Figura 1: Rappresentazione schematica del gene target di cui si vuole effettuare il knock-out e delle regioni fiancheggianti UP e DOWN con la posizione dei primers utilizzati per la loro amplificazione. I primers UPrev GEN 11205 (2) e DOWNfor GEN 11205 (3) possiedono code omologhe, indicate con una linea zigzagata, alle estremità 5' e 3' del gene Gen. Le corrispondenze numeriche dei primers sono indicate in Tab.1.

3.2.2 Fusione delle regioni fiancheggianti con il gene marker: "PCR Fusion"

La "PCR Fusion" è una reazione nella quale frammenti diversi di DNA vengono fusi in un'unica molecola tramite reazione di PCR. In questo caso le due regioni fiancheggianti il gene *Fgsg_11205* saranno fuse con il gene *Gen* (2854 bp), codificante per la resistenza alla geneticina.

La presenza delle code omologhe alle estremità 5' e 3' del gene *Gen* nei primers *UPrev GEN 11205* e *DOWNfor GEN 11205* utilizzate nella precedente reazione di amplificazione delle regioni fiancheggianti hanno fatto sì che le stesse abbiano ora tali code alle estremità 3' e 5' rispettivamente; esse permetteranno che durante le fasi di annealing i due frammenti UP e DOWN si appaino al gene *Gen* e che la *DNA polimerasi* possa così utilizzare questo ibrido come stampo per sintetizzare una unica molecola composta nell'ordine da regione UP, geneticina e regione DOWN (Fig.2).

Per avere una fusione ottimale dei frammenti, nella miscela di reazione si dovrà avere un rapporto di 1:3:1 rispettivamente tra regione UP, geneticina e regione DOWN.

Sono direttamente le regioni UP e DOWN che fungono da innesco per la reazione catalizzata dalla *DNA polimerasi*.

La reazione è avvenuta in un volume totale di 50 µL contenenti:

- 2 µL di UP (100 ng)
- 3,3 µL di DOWN (100 ng)
- 12,8 µL di Geneticina (900 ng)
- 6,9 µL acqua sterile mq
- 25 µL di *REDTaqReadyMix PCR reaction Mix with MgCl₂ 2x* (Sigma)

Il ciclo adottato per la reazione di fusione è il seguente :

94 °C: 30 secondi.

60 °C: 1 minuto.

72 °C: 5 minuti.

Il ciclo è stato ripetuto 20 volte.

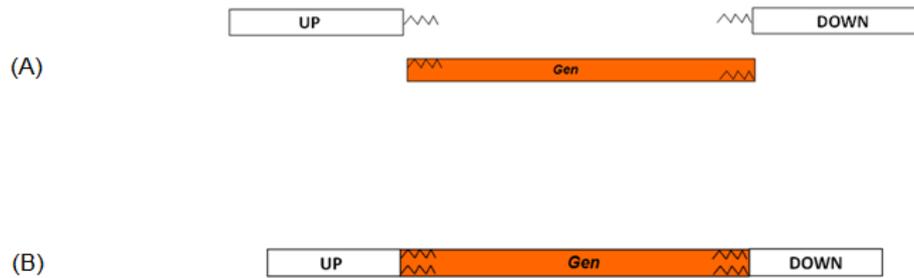


Figura 2: Rappresentazione schematica di: (A) regioni fiancheggianti e gene *Gen*; (B) prodotto della reazione di “fusion PCR”.

3.2.3 Ottenimento dei costrutti “SPLIT MARKER”

Il prodotto di amplificazione della *PCR fusion* è un frammento di 4752 paia di basi: tali dimensioni renderebbero difficoltose le operazioni di amplificazione nested e clonazione dell'intero costrutto.

Per ovviare a tale problema è stato utilizzato il cosiddetto approccio “SPLIT MARKER”: vengono prodotti due costrutti, denominati “SPLIT UP” e “SPLIT DOWN”, formati ciascuno da una regione fiancheggianti e da circa 1900 bp della sequenza del gene *Gen*, in modo che i due costrutti abbiano circa 1000 bp del gene *Gen* sovrapposti (Fig.3). Tale sovrapposizione permetterà l'unione mediante un evento di crossing over dei due frammenti e la ricomposizione dell'intera sequenza codificante.

L'utilizzo dei due costrutti SPLIT in luogo del singolo costrutto intero (FULL), costituito da entrambe le regioni fiancheggianti e dal gene *Gen*, permette inoltre di avere una maggiore specificità di trasformazione per il fatto che la loro integrazione nel genoma di *Fusarium graminearum* dipenderà da tre eventi di crossing-over quando invece per l'integrazione del costrutto FULL sono sufficienti due eventi di ricombinazione omologa (Fig.4).

I due frammenti SPLIT sono stati sintetizzati tramite PCR utilizzando come stampo il frammento ottenuto dalla reazione “*PCR fusion*”.

Per l'amplificazione dei costrutti SPLIT UP e SPLIT DOWN è stata utilizzata la seguente miscela di reazione (primers *for* e *rev* riportati in tab.3 e tab.4):

- 1 µL di primer forward (10 pmol)
- 1 µL di primer reverse (10 pmol)

- 1,5 µL di prodotto di *PCR fusion*
- 25 µL di *REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂ 2x* (Sigma)
- 21,5 µL di H₂O

Numero di corrispondenza in figura 3:	Nome primer :	Sequenza:
1	NESTED GEN 11205f	GCTGCATGGGTACAAGGTTT
2	SPLIT UP GEN REV	AATATCACGGGTAGCCAACG

Tab.3: *Primers utilizzati per la reazione di amplificazione del costrutto SPLIT UP.*

Numero di corrispondenza in figura 3:	Nome primer :	Sequenza:
3	SPLIT UP GEN FOR	GAAAGCGCGTTGGATTAGAG
4	NESTED GEN 11205r	ATGCGTTCGAAAATGTCTCC

Tab.4: *Primers utilizzati per la reazione di amplificazione del costrutto SPLIT DOWN.*

Il ciclo adottato per le reazioni di amplificazione è il seguente:

94 °C: 1 minuto.

55 °C: 30 secondi.

72 °C: 3 minuti.

Il ciclo è stato ripetuto 35 volte.

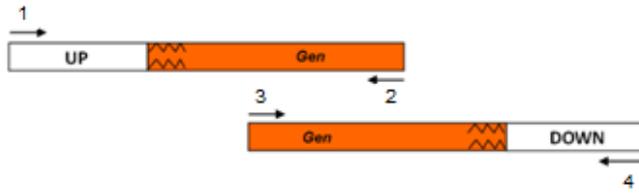


Figura 3: Rappresentazione schematica dei costrutti *SPLIT UP* e *SPLIT DOWN*. Con i numeri 5 – 8 sono indicati i primers utilizzati nella reazione di amplificazione dei frammenti (Tab.2 e Tab.3).

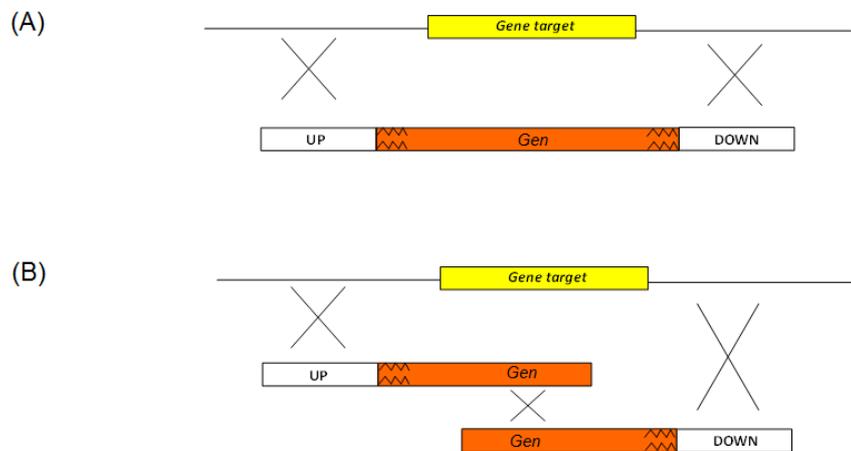


Figura 4: Rappresentazione schematica della modalità di inserzione nel genoma di *F. graminearum* di un costrutto *FULL* (A), per il quale sono sufficienti due *crossing-over*, e dei costrutti *SPLIT* (B), per il quale sono necessari tre eventi di *crossing-over*.

I due prodotti PCR sono poi stati purificati con kit *Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean – up System* come precedentemente descritto nel paragrafo 3.1.3.

3.2.4 Inserzione dei costrutti “SPLIT Marker” nel vettore *pGEM*[®] – *T Easy*

Il clonaggio dei costrutti è avvenuto tramite inserzione dei prodotti PCR purificati nel vettore plasmidico *pGEM*[®] – *T Easy Vector* (Promega) (Fig.5) e trasformazione di cellule competenti di *Escherichia coli* ceppo *DH5α*.

Il vettore plasmidico utilizzato permette la selezione delle colonie trasformate tramite coltura su terreno contenente ampicillina grazie alla presenza di un gene marker di resistenza a tale antibiotico, il gene *Amp*. L'identificazione delle colonie con inserto è possibile grazie al fatto che nel vettore *pGEM*[®] – *T Easy* è presente anche il gene *LacZ*, codificante per l'enzima β -galattosidasi, e che all'interno di tale gene si trovano i siti di policonaggio in cui si integra il frammento da clonare. L'effettiva integrazione interrompe la sequenza codificante per la β -galattosidasi e le cellule, non avendo la capacità di sintetizzare questo enzima, non sono in grado di metabolizzare il substrato *Xgal*, un galattosio modificato la cui degradazione produce un colore blu.

La presenza di *Xgal* nel terreno di coltura permette quindi di discriminare visivamente tra colonie trasformate, che risulteranno bianche, e colonie non trasformate, che risulteranno blu.

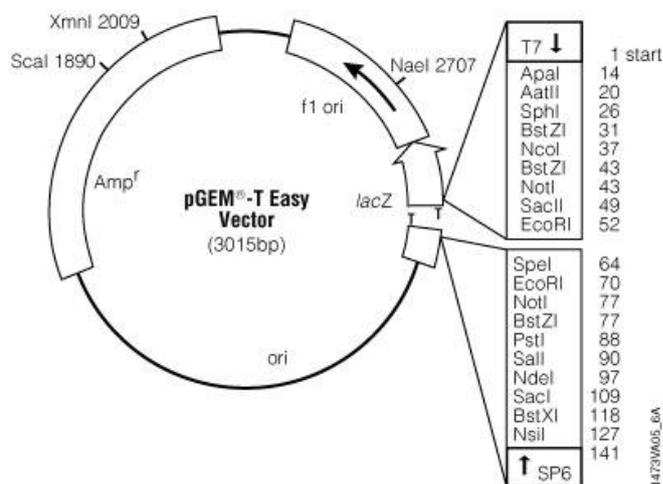


Figura 5: Vettore plasmidico *pGEM*[®] – *T Easy* (Promega). Si possono notare il gene marker *Amp*, conferente la resistenza all'ampicillina, il gene *lacZ*, i siti di poli clonaggio al suo interno, il locus di origine della replicazione *ori* e le timine alle estremità coesive.

La *Taq* polimerasi utilizzata nelle reazioni di PCR inserisce alle estremità dei frammenti che sintetizza un residuo di adenina; la presenza strategica di residui di timine alle estremità del vettore

favorisce quindi l'integrazione dei prodotti di reazione PCR. Il vettore linearizzato è incubato in presenza dell'insero in proporzione di 3 : 1 (insetto – vettore).

La reazione di ligazione è catalizzata dalla *DNA ligasi* (Promega).

I due costrutti SPLIT UP e SPLIT DOWN vengono ligati al vettore in due miscele separate:

Ligasi del costrutto SPLIT UP:

- 0,5 µL di *pGEM® – T Easy Vector* (25 ng)
- 3 µL (75 ng) di costrutto SPLIT UP
- 1 µL di *T4 DNA Ligase Buffer* (Promega, Madison, USA) (3u/ µL)
- 1 µL di *10X T4 DNA Ligase Buffer* (Thermo Scientific)
- 4,5 µL di H₂O per un totale di 10 µL.

Ligasi del costrutto SPLIT DOWN:

- 0,5 µL di *pGEM® – T Easy Vector* (25 ng)
- 4,7 µL (70 ng) di costrutto SPLIT DOWN
- 1 µL di *T4 DNA Ligase Buffer* (Promega, Madison, USA) (3u)
- 1 µL di *10X T4 DNA Ligase Buffer* (Thermo Scientific)
- 2,8 µL di H₂O sterile per un totale di 10 µL.

La reazione di ligazione è avvenuta overnight alla temperatura di 4°C.

3.2.5 Trasformazione delle cellule competenti

La miscela di ligasi è stata poi utilizzata per la trasformazione di cellule competenti di *Escherichia coli* ceppo *DH5α*. Le cellule conservate a – 80 °C sono state scongelate in ghiaccio e sono stati aggiunti 10 µL di miscela di ligasi; dopo venti minuti in ghiaccio le cellule sono state incubate a 42 °C per 50 secondi e poi per 2 minuti in ghiaccio. Questo shock termico è sufficiente a provocare l'ingresso del DNA plasmidico nelle cellule competenti e quindi la loro trasformazione.

Successivamente alle cellule sono stati aggiunti 900 µL di terreno di coltura liquido *LB - Broth* (Sigma-Aldrich) e la miscela è stata incubata un'ora e mezza a 37 °C in agitazione a 170 rpm.

Trascorso il tempo di incubazione le cellule sono state centrifugate per 5 minuti a 10.000 rpm; è stato così possibile rimuovere 500 µL di *LB – Broth* e risospendere le cellule nel volume rimanente.

Successivamente si è proceduto con la piastratura di 100 µL di sospensione batterica su piastre di *LB - Broth* solido (LB Broth liquido + 1,5% Bacto-Agar [Difco Laboratories]) contenenti ampicillina (100 µg/mL) e sulle quali erano stati precedentemente piastrati 40 µL di *X - Gal* (stock 25 ng/µL). Le piastre sono state incubate overnight a 37 °C e le colonie di colore bianco trasferite in 1 mL di *LB - Broth* (Sigma-Aldrich) liquido contenente ampicillina (100 ng/µL) e incubate overnight a 37 °C.

3.2.6 Screening dei batteri trasformati: “*PCR colony*”

Per verificare l'effettiva presenza dei costrutti *SPLIT UP* e *SPLIT DOWN* nei batteri trasformati col vettore plasmidico si è proceduto con una analisi PCR.

È stata utilizzata una variante della PCR detta *PCR colony* che si distingue dalla PCR ordinaria in quanto non occorre estrarre il DNA plasmidico che farà da stampo per la reazione di amplificazione in quanto uscirà dalle cellule a causa della lisi indotta dal trattamento di tre minuti a 95 °C che precede la reazione.

I primers utilizzati (Tab.3 e Tab.4) per amplificare il costrutto *SPLIT UP* e il costrutto *SPLIT DOWN* sono quelli utilizzati nella precedente reazione di amplificazione degli stessi a partire dal prodotto di amplificazione *fusion*.

Sono state utilizzate le seguenti miscele di reazione :

- 1 µL di primer forward (10 pmol)
- 1 µL di primer reverse (10 pmol)
- 1 µL di coltura batterica
- 10 µL di *REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂ 2x (Sigma)*
- 7 µL di H₂O sterile

Dopo tre minuti a 95 °C, il ciclo adottato per tale reazione di amplificazione è il seguente:

94 °C: 1 minuto.

55 °C: 30 secondi.

72 °C: 3 minuti.

35 volte.

Il ciclo è stato ripetuto

Dalle colture delle colonie risultate effettivamente trasformate con i plasmidi ricombinanti di interesse, 15 µL sono stati utilizzati per inoculare 50 mL di terreno di coltura liquido *LB - Broth* contenente ampicillina (100 µg/mL). La coltura è stata quindi incubata overnight a 37 °C in agitazione a 150 rpm. Dalle cellule cresciute in queste condizioni sarà estratto il DNA plasmidico.

3.2.7 Estrazione e digestione del DNA plasmidico

I DNA plasmidici contenenti i costrutti sono stati estratti dai batteri cresciuti nelle colture incubate precedentemente overnight con il kit *GenElute™ HP Plasmid Midiprep* (Sigma – Aldrich®).

Per recuperare le cellule ed eliminare il mezzo di coltura si è centrifugato a 4500 rpm per 10 minuti, si è eliminato il surnatante e si è risospeso il pellet formatosi in 4 mL di *Resuspension/Rnase A solution* precedentemente raffreddata a 4 °C. Per lisare le cellule sono stati aggiunti 4 mL di *Lysis Solution* e si è delicatamente invertito la provetta sei volte per favorire la reazione. Trascorsi 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente sono stati aggiunti 4 mL di *Neutralization Solution*; dopo aver invertito cinque volte la provetta si è potuto notare la formazione di un aggregato bianco contenente detriti cellulari, proteine, lipidi, SDS e DNA cromosomale. Dopo aver aggiunto 3 mL di *Binding Solution* e aver agitato si è filtrato tutto il contenuto utilizzando una siringa filtrante fornita con il kit. Il filtrato è stato poi trasferito in una colonna con membrana ed è stato centrifugato a 2500 rpm per 2 minuti. A questo punto, grazie alla presenza della *Binding Solution*, il DNA plasmidico sarà legato alla membrana. Si è proceduto quindi con due lavaggi della membrana eseguiti in successione con 4 mL di *Wash Solution 1* e 4 mL di *Wash Solution 2* centrifugando in entrambi i casi a 2500 rpm per 2 minuti. A questo punto la colonna dotata di membrana è stata trasferita in una nuova provetta e il DNA legato alla membrana è stato eluito con 1 mL di *Elution Solution* centrifugando a 2500 rpm per 5 minuti. Il DNA plasmidico è stato poi conservato a 4°C.

Una volta clonati, i costrutti SPLIT devono essere excisi dal vettore di clonaggio tramite digestione con endonucleasi che taglino all'esterno delle sequenze SPLIT.

L'analisi di restrizione è stata eseguita con il programma *DNA Man* e ha portato all'individuazione di un'enzima capace di eseguire un unico taglio a monte, *Apa I*, e uno capace di eseguire un unico taglio a valle, *Sac I*.

La digestione è avvenuta in una miscela composta come di seguito:

- 50 µL di DNA plasmidico ricombinante (10 µg)

- 25 µL di *Buffer Multicore 10x* (Promega)
- 25 µL di *Buffer A 10x* (Promega, Madison, USA)
- 5 µL di *Apa I* (10u/µL)
- 5 µL di *Sal I* (10u/µL)
- 390 µL di H₂O

La reazione di digestione è avvenuta overnight alla temperatura di 37 °C. Il DNA digerito è stato poi precipitato aggiungendo un egual volume di isopropanolo, e incubando overnight a -20 °C. La soluzione è stata poi centrifugata per 10 minuti a 13.200 rpm e il pellet di DNA formatosi è stato risospeso in 20 µL di acqua sterile.

Per verificare l'effettiva presenza del costrutto SPLIT UP nel vettore (dato che i due frammenti sono della stessa dimensione) si è effettuato inoltre una digestione di un'aliquota di DNA plasmidico solo con *Apa I*, linearizzando così il vettore; si è verificato così che le dimensioni del DNA plasmidico integrato con l'inserto corrispondessero alla somma delle dimensioni dei singoli frammenti (circa 6 Kb).

Per tale digestione è stata utilizzata la seguente miscela:

- 0,5 µL di DNA plasmidico ricombinante (100 ng)
- 1 µL di *Buffer A 10x* (Promega)
- 1 µL di *Apa I* (10u/µL)
- 7,5 µL di H₂O

4 RISULTATI

4.1 Screening di mutanti knock-out per il gene *Fgsg_10212*

4.1.1 Analisi PCR dei putativi mutanti knock-out per il gene *Fgsg_10212*

La trasformazione del fungo *F. graminearum* con un costrutto per la delezione del gene *Fgsg_10212* ha consentito di ottenere 47 colonie fungine (denominate $\Delta FgCP$) putativamente mutanti. Per verificare l'effettiva trasformazione si è effettuata un'analisi PCR nella quale sono stati analizzati tre geni: il gene *Hyg*, il gene *Fgsg_10212* e il gene *Fgsg_11205*.

La visualizzazione delle bande su gel d'agarosio ha consentito di identificare dieci putativi mutanti knock-out per il gene *Fgsg_10212* (Fig.6 e Fig.7).

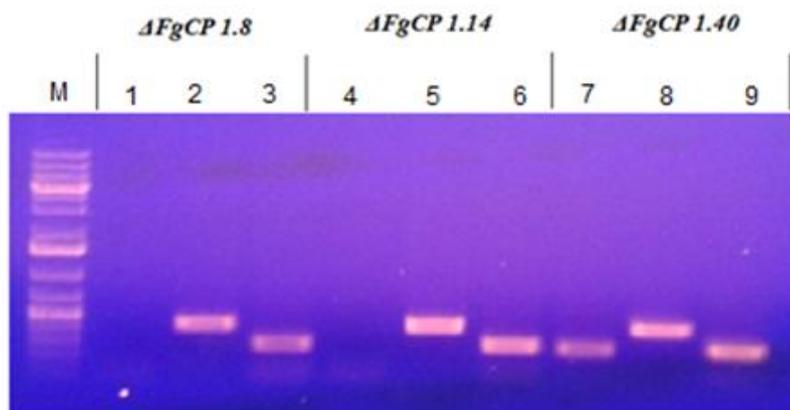


Figura 6: corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (w/v) degli ampliconi ottenuti dalla PCR di screening di tre colonie fungine putativamente mutanti. Corsia M: marker GeneRuler™1kb plus DNA ladder (Fermentas); corsie 1–3: mutante $\Delta FgCP$ 1.8; corsie 4–6: $\Delta FgCP$ 1.14; corsie 7–9: $\Delta FgCP$ 1.40. Per ogni mutante sono stati analizzati nell'ordine i seguenti geni: *Fgsg_10212*, *hyg*, *Fgsg_11205*.

Si nota l'assenza della banda del gene *Fgsg_10212* nei mutanti $\Delta FgCP$ 1.8 e $\Delta FgCP$ 1.14.

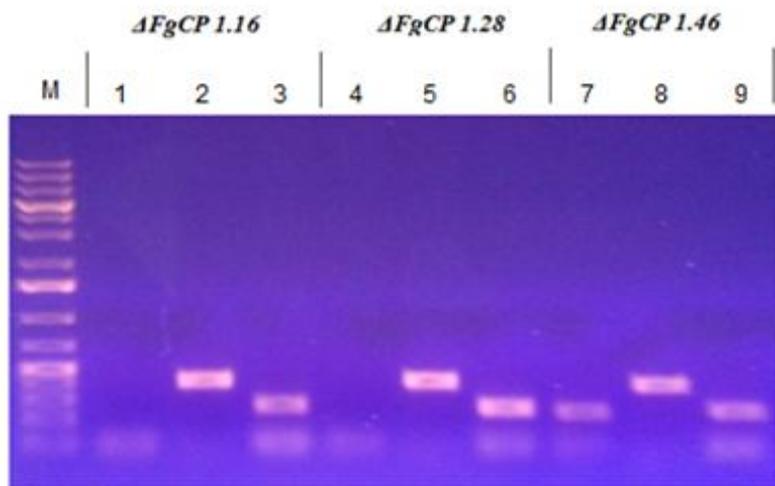


Figura 7: corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (w/v) degli ampliconi ottenuti dalla PCR di screening di tre colonie fungine putativamente mutanti. Corsia M: marker GeneRuler™1kb plus DNA ladder (Fermentas); corsie 1 – 3: mutante $\Delta FgCP 1.16$; corsie 4 – 6: mutante $\Delta FgCP 1.28$; corsie 7 – 9: mutante $\Delta FgCP 1.46$. Per ogni mutante sono stati analizzati nell'ordine i seguenti geni: *Fgsg_10212*, *hyg* e *Fgsg_11205*. Si nota l'assenza della banda del gene *Fgsg_10212* nei mutanti $\Delta FgCP 1.16$ e $\Delta FgCP 1.28$.

4.1.2 Analisi Southern Blot delle colonie fungine mutanti

Per effettuare l'analisi Southern Blot e rilevare il numero di integrazioni del gene *Hyg* nel genoma delle colonie fungine mutanti, il DNA genomico del ceppo WT e dei dieci mutanti ($\Delta FgCP 1.16$, $\Delta FgCP 1.28$, $\Delta FgCP 1.46$, $\Delta FgCP 1.28$, $\Delta FgCP 1.16$, $\Delta FgCP 1.40$, $\Delta FgCP 1.14$, $\Delta FgCP 1.8$, $\Delta FgCP 1.14$, $\Delta FgCP 1.8$) che l'analisi PCR ha consentito di individuare come positivi è stato estratto e visualizzato mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio (Fig.8 e Fig.9). In particolare le bande di DNA genomico si trovano alla altezza prevista di circa 20 Kb.

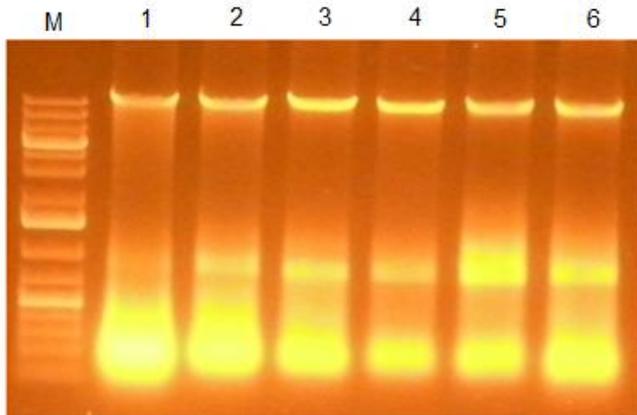


Figura 8: Corsa su gel d'agarosio 1% (w/v) degli acidi nucleici estratti dai putativi mutanti knock-out per il gene *Fgsg_10212*. Corsia M: marker GeneRuler™ 1kb plus DNA ladder (Fermentas); corsia 1: Δ FgCPI.14; corsia 2: Δ FgCPI.44; corsia 3: Δ FgCPI.43; corsia 4: Δ FgCPI.8; corsia 5: Δ FgCPI.28; corsia 6: Δ FgCPI.16. In tutti campioni si nota la banda corrispondente al DNA genomico di dimensioni intorno alle 20 Kb.

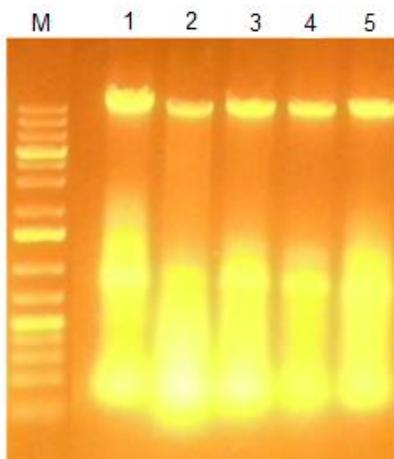


Figura 9: Corsa su gel d'agarosio 1% (w/v) degli acidi nucleici estratti dai putativi mutanti knock-out per il gene *Fgsg_10212*. Corsia M: marker GeneRuler™ 1kb plus DNA ladder (Fermentas); corsia 1: ceppo wild type di *Fusarium graminearum*; corsia 2: Δ FgCPI.30.1; corsia 3: Δ FgCPI.20; corsia 4: Δ FgCPI.19; corsia 5: Δ FgCPI.47. In tutti campioni si nota la banda corrispondente al DNA genomico, di dimensioni intorno alle 20 Kb.

Per l'analisi Southern Blot il DNA genomico di 7 colonie mutanti e del ceppo WT è stato digerito con l'enzima *Vsp I*. Una corsa elettroforetica su gel d'agarosio ha permesso di verificare la buona riuscita della reazione di digestione (Fig.10).

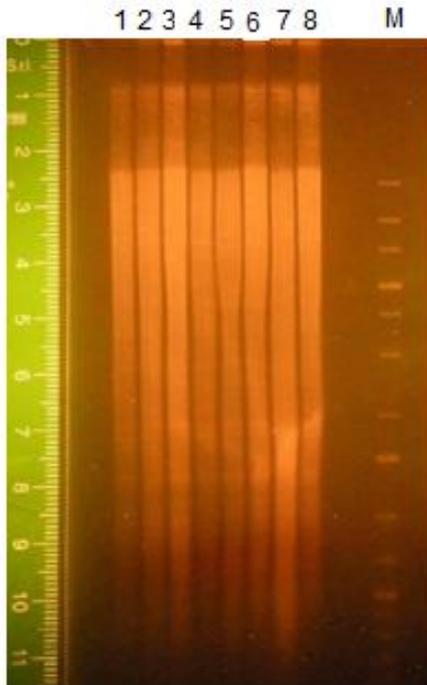


Figura 10: elettroforesi su gel d'agarosio 1% (w/v) del DNA genomico estratto dai mutanti knock-out per il gene *Fgsg_10212* e digerito con *Vsp I*. Corsia M: marker GeneRuler™ 1kb plus DNA ladder (Fermentas); corsia 1: ceppo wild type di *F. graminearum*; corsia 2: mutante $\Delta FgCP 1.8$; corsia 3: mutante $\Delta FgCP 1.16$; corsia 4: mutante $\Delta FgCP 1.19$; corsia 5: mutante $\Delta FgCP 1.20$; corsia 6: mutante $\Delta FgCP 1.28$; corsia 7: mutante $\Delta FgCP 1.30.1$; corsia 8: mutante $\Delta FgCP 1.43$.

La sonda utilizzata per l'ibridazione è omologa a un tratto del gene *Hyg*, codificante per la resistenza all'igromicina, e la reazione chemiluminescente catalizzata dalla fosfatasi alcalina ha permesso di impressionare su lastra autoradigrafica le posizioni nelle quali questa ha trovato siti di appiamento. Dei sette mutanti analizzati solo tre hanno mostrato una banda di ibridazione nella posizione attesa di 6 Kb ($\Delta FgCP 1.8$, $\Delta FgCP 1.16$ e $\Delta FgCP 1.43$). Questi mutanti presentano tuttavia nel loro genoma almeno altre due integrazioni ectopiche del costrutto (Fig.11). Gli altri mutanti presentano numerose integrazioni ectopiche (Fig.11).

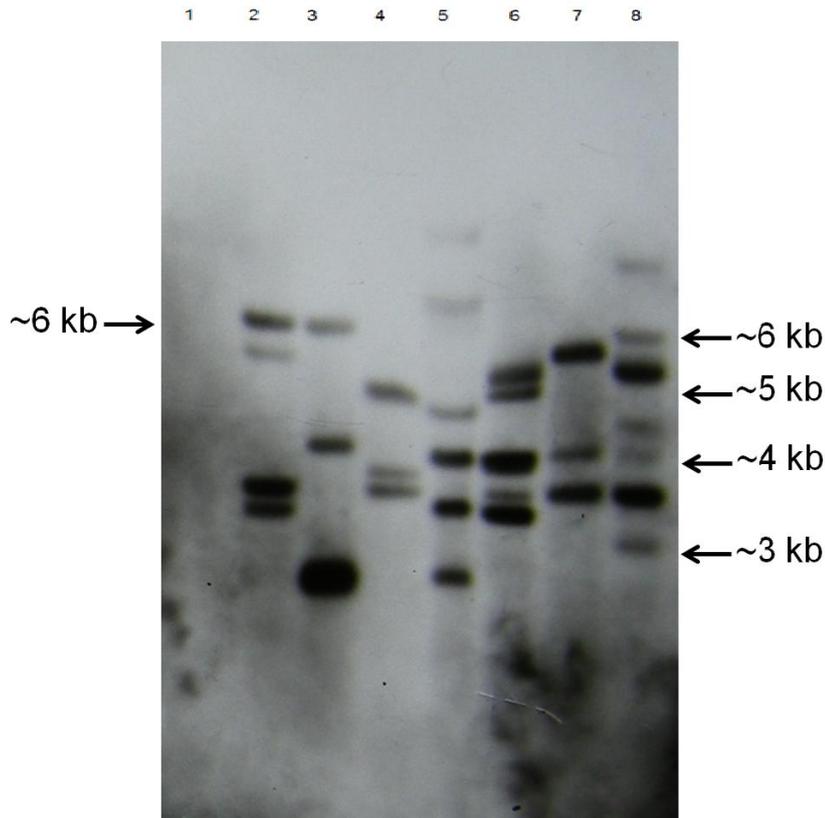


Figura 11: Lastra autoradiografica ottenuta dopo 30 minuti di esposizione ibridando il filtro con la sonda specifica per il gene *Hyg*. Corsia 1: ceppo wild type; corsia 2: mutante Δ FgCP 1.8; corsia 3: mutante Δ FgCP 1.16; corsia 4: mutante Δ FgCP 1.19; corsia 5: mutante Δ FgCP 1.20; corsia 6: mutante Δ FgCP 1.28; corsia 7: mutante Δ FgCP 1.30.1; corsia 8: mutante Δ FgCP 1.43.

Nei mutanti Δ FgCP 1.8, Δ FgCP 1.16 Δ FgCP 1.43, (corsie 2- 3 – 8), si può notare la presenza della banda di ibridazione nella posizione attesa di 6 Kb circa; negli stessi campioni si notano inoltre altre bande corrispondenti a integrazioni ectopiche del costrutto di delezione. In tutti gli altri campioni si riscontrano varie integrazioni ectopiche, ma nessuna integrazione nella posizione attesa.

4.2 Preparazione costruito per delezione del gene *Fgsg_11205*

4.2.1 Amplificazione regioni fiancheggianti il gene *Fgsg_11205*

Le regioni fiancheggianti il gene *Fgsg_11205* sono state amplificate tramite reazione PCR utilizzando come stampo il DNA genomico di *Fusarium graminearum* e primers specifici disegnati sulle sequenze ottenute dal database "Broad Insitute".

Le due regioni fiancheggianti presenti nei costrutti finali permetteranno l'inserzione del gene marker all'interno del genoma di *F. graminearum* tramite ricombinazione omologa sito specifica. Il gene precedentemente situato in quel locus verrà in tal modo deleto dal genoma fungino.

L'esito della reazione di amplificazione delle regioni fiancheggianti è stato saggiato tramite corsa su gel d'agarosio. Per ogni campione si è osservata la presenza di una banda singola, escludendo così la presenza di prodotti aspecifici. I frammenti ottenuti sono delle dimensioni attese, 1047 bp per la regione a monte (UP) e 891 bp per la regione a valle (DOWN) (Fig.12).

La corsa elettroforetica ha anche permesso una quantificazione visiva dei frammenti: 50 ng/μL per la regione fiancheggiante a monte e 30 ng/μL per la regione fiancheggiante a valle (Fig.12).

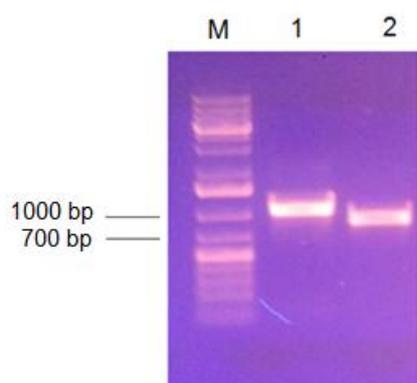


Figura 12: corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (w/v) degli ampliconi ottenuti dalla reazione di amplificazione delle regioni fiancheggianti UP e DOWN. Corsia M: marker GeneRuler™ 1kb plus DNA ladder (Fermentas); corsia 1: prodotto di amplificazione della regione fiancheggiante a monte (UP); corsia 2: prodotto di amplificazione della regione fiancheggiante a valle (DOWN).

4.2.2 Legame delle regioni fiancheggianti al gene marker: “PCR Fusion”

Il gene *Gen*, che verrà unito alle regioni fiancheggianti, è stato exciso dal plasmide *p1199*, nel quale era stato precedentemente clonato, con l'utilizzo delle due endonucleasi *Bgl II* e *Hind III*.

Il prodotto di *PCR Fusion* è un frammento costituito nell'ordine da regione fiancheggianti UP, gene *Gen* e regione fiancheggianti DOWN. Il legame dei tre frammenti è stato ottenuto mediante PCR grazie alle code omologhe alle estremità 5' e 3' del gene *Gen* presenti alle estremità 3' e 5' delle regioni fiancheggianti.

4.2.3 Amplificazione, purificazione e clonaggio dei costrutti “SPLIT Marker

Le dimensioni del prodotto di *PCR Fusion*, pari a 4754 bp, rendono molto difficoltose le operazioni di amplificazione nested e clonaggio dell'intero costrutto; si è quindi optato per l'utilizzo della tecnica “SPLIT Marker”: il costrutto è stato diviso in due frammenti costituiti da una regione fiancheggianti e da una parte del gene *Gen*; in tal modo si otterranno due frammenti di dimensioni pari a circa 3 Kb ciascuno, rendendo così più efficienti il clonaggio e l'amplificazione dei costrutti. I costrutti sono stati ottenuti tramite due reazioni di *nested PCR*.

Una corsa elettroforetica su gel d'agarosio dei prodotti di amplificazione ha permesso la visualizzazione di due bande nelle posizioni attese, 3 kb per il costrutto SPLIT UP e 2.8 kb per il costrutto SPLIT DOWN (Fig.13).

La visualizzazione delle bande su gel ha anche permesso una quantificazione visiva in 25 ng/μL per il costrutto SPLIT UP e in 15 ng/μL per il costrutto SPLIT DOWN.

Successivamente i due costrutti sono stati purificati e, tramite una reazione catalizzata dalla ligasi, inseriti nel vettore di clonaggio *pGEM*[®] – *T easy*. Le miscele di ligasi sono poi state utilizzate per trasformare le cellule competenti. La selezione delle colonie trasformate è avvenuta piastrando aliquote (100 μL) di cellule su terreno di coltura contenente ampicillina e XGal. La presenza dell'antibiotico ha garantito che i batteri non trasformati col plasmide non crescessero e la presenza dell'XGal ha permesso la selezione di numerose colonie bianche trasformate con plasmide ricombinante (Fig.14).

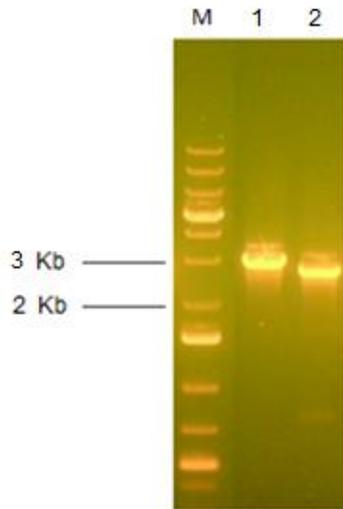


Figura 13: Corsa su gel d'agarosio 1% (w/v) dei prodotti di amplificazione SPLIT UP e SPLIT DOWN. Corsia M: marker GeneRuler™ 1kb plus DNA ladder (Fermentas); corsia 1: costruito SPLIT UP, dimensione di 3 Kb; corsia 2: costruito SPLIT DOWN, dimensione di 2,8 Kb.



Figura 14: esempio di piastra utilizzata per la selezione bianco-blu con XGal.

4.2.4 Analisi delle colonie trasformate tramite "PCR colony"

Dieci colonie bianche trasformate con il costruito SPLIT UP e dieci con il costruito SPLIT DOWN sono state saggiate mediante "PCR colony" utilizzando gli stessi primers utilizzati per amplificare inizialmente i costrutti (Tab.3 e Tab.4). Grazie alla corsa elettroforetica è stato possibile identificare due colonie contenenti l'inserto SPLIT UP e altrettante contenenti l'inserto SPLIT DOWN (Fig.15 e Fig.16).

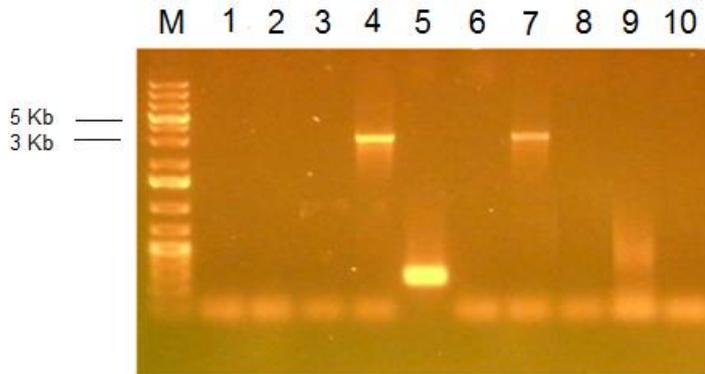


Figura 15: corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1% (w/v) dei prodotti di amplificazione delle reazioni di "PCR colony" effettuate per analizzare le colonie trasformate con costrutto SPLIT UP. Corsia M: marker GeneRuler™ 1kb plus DNA ladder (Fermentas); corsie 1-10: 10 µL di prodotto PCR ottenuto analizzando le colonie 1-10 trasformate con costrutto SPLIT UP. Nelle corsie 4 e 7 si può notare la banda a 3 Kb corrispondente all'amplificato del costrutto SPLIT UP. Queste colonie sono quindi state correttamente trasformate.

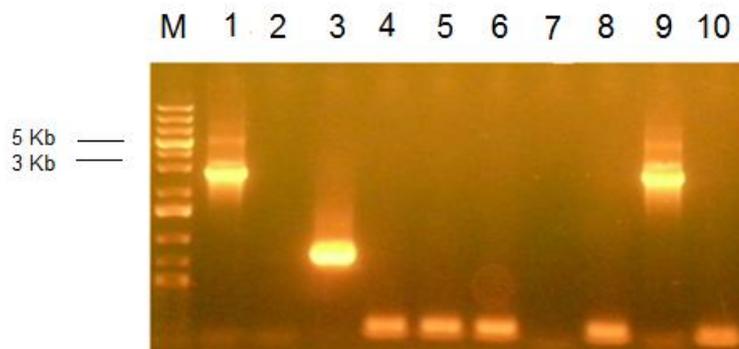


Figura 16: corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1% (w/v) dei prodotti di amplificazione delle reazioni di "PCR colony" effettuate per analizzare le colonie trasformate con costrutto SPLIT DOWN. Corsia M: marker GeneRuler™ 1kb plus DNA ladder (Fermentas); corsie 1-10: 10 µL di prodotto PCR ottenuto analizzando le colonie 1-10 trasformate con costrutto SPLIT DOWN. Nelle corsie 1 e 9 si può notare la banda a 2.8 Kb corrispondente all'amplificato del costrutto SPLIT DOWN. Queste colonie sono quindi state correttamente trasformate.

4.2.5 Estrazione e digestione del DNA plasmidico

I DNA plasmidici contenenti gli inserti SPLIT UP e SPLIT DOWN sono stati estratti rispettivamente dalle colonie 4 trasformata con costrutto SPLIT UP e 9 trasformata con costrutto SPLIT DOWN e quindi quantificati tramite analisi visiva su gel d'agarosio (Fig.17).

La corsa ha permesso di quantificare in circa 200 ng/μL entrambi i DNA plasmidici.

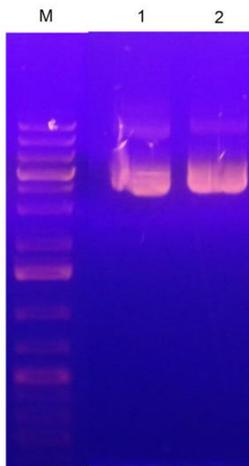


Fig.17: Corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1% (w/v) del DNA plasmidico purificato estratto dalle colonie di cellule competenti *E.coli* trasformate con vettore pGEM - T easy contenente i due costrutti SPLIT UP e SPLIT DOWN. Corsia M: marker GeneRuler™ 1kb plus DNA ladder (Fermentas); corsia 1: DNA plasmidico con costrutto SPLIT DOWN; corsia 2: DNA plasmidico con costrutto SPLIT UP.

Poiché la trasformazione del fungo è più efficiente se il costrutto è linearizzato è stato necessario digerire i DNA plasmidici per excidere i costrutti dai vettori.

Sono stati quindi digeriti 10 μg di ciascun DNA plasmidico con gli enzimi di restrizione *Apa I* e *Sac I*, una quantità necessaria per la futura trasformazione del fungo.

Una corsa elettroforetica ha permesso di verificare il successo della digestione (Fig.18).

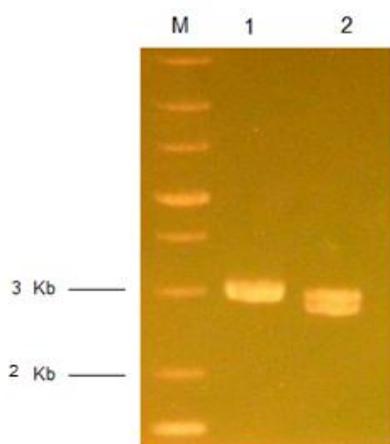


Figura 18: Corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1% (w/v) dei DNA plasmidici digeriti con gli enzimi *Apa I* e *Sac I*. Corsia M: marker GeneRuler™ 1kb plus DNA ladder (Fermentas); corsia 1: prodotto di digestione del DNA plasmidico contenente il costrutto SPLIT UP; il vettore e il costrutto hanno in questo caso uguali dimensioni (3 Kb) e le bande del vettore e del costrutto sono quindi sovrapposte; corsia 2: prodotto di digestione del DNA plasmidico contenente il costrutto SPLIT DOWN; il vettore e il costrutto hanno in questo caso dimensioni leggermente diverse (3 Kb il vettore, 2.8 Kb il costrutto) quindi le due bande sono distinguibili su gel.

Per confermare la presenza del costrutto SPLIT UP nel vettore plasmidico si è eseguito una digestione con un singolo enzima, *Apa I*. Il taglio singolo linearizza il vettore, quindi le dimensioni attese sono quelle date dalla somma del vettore e del costrutto in esso inserito, nel nostro caso circa 6 Kb (Fig.19).

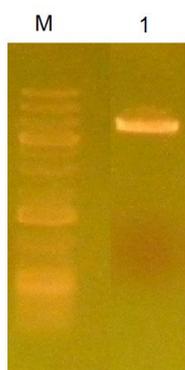


Figura 19: Corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1% (w/v) del prodotto di digestione del DNA plasmidico contenente il costrutto SPLIT UP e digerito con *Apa I*. Corsia M: marker GeneRuler™ 1kb plus DNA ladder (Fermentas); corsia 1: prodotto di digestione del vettore contenente il costrutto SPLIT UP. Le dimensioni del DNA corso su gel è di circa 6 Kb. Tale dimensione corrisponde alla somma delle dimensioni del vettore e del costrutto.

5 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

FUTURE

Le cerato platanine sono una famiglia di piccole proteine idrofobiche fungine che sembrano coinvolte nell'induzione di resistenza sistemica acquisita in pianta (Frias et al., 2009); in particolare per le cerato platanine prodotte da *Botrytis cinerea* e *Ceratocystis fimbriata* è stato dimostrato un ruolo diretto nell'induzione della risposta ipersensibile, caratterizzata dall'accumulo di specie reattive dell'ossigeno e dalla morte cellulare programmata (Frias et al., 2009; Scala et al., 2004). In alcuni casi ne è stato accertato un ruolo attivo durante la patogenesi: mutanti di un fungo biotrofo (*Magnaphorthe griseae*) e uno necrotrofo (*Botrytis cinerea*) privi di una cerato platanina sono risultati infatti meno virulenti (Jeong et al., 2007 e Frias et al., 2009).

Geni codificanti cerato platanine sono presenti nei genomi di numerosi funghi fitopatogeni; in particolare, nel genoma di *Fusarium graminearum* sono presenti due geni codificanti cerato platanine, ma il loro ruolo durante il processo infettivo non è ancora stato indagato. Il presente lavoro si inserisce in un progetto il cui scopo è quello di creare un doppio mutante knock-out per i due geni codificanti cerato platanine di *F. graminearum* allo scopo di chiarire il ruolo di queste proteine.

Una prima trasformazione con un costrutto per la delezione di uno dei due geni (*Fgsg_10212*) ha consentito di ottenere 47 mutanti resistenti all'igromicina. Per verificare che il gene marker avesse effettivamente sostituito il gene bersaglio nel genoma dei mutanti, si è effettuata un'analisi PCR: i mutanti nei quali non è stata rilevata la presenza del gene *Fgsg_10212* sono risultati dieci. Un'analisi Southern Blot di sette di queste colonie fungine mutanti ha consentito di rilevare che solo tre presentavano il gene marker integrato correttamente nel locus genomico bersaglio. Tutti i mutanti mostravano inoltre almeno due inserzioni ectopiche del costrutto.

Si è quindi proceduto con la preparazione di un costrutto per il knock-out del secondo gene codificante cerato platanina di *F. graminearum* (*Fgsg_11205*), utilizzando il gene marker di resistenza alla geneticina (*Gen*). A questo scopo è stata scelta la tecnica "SPLIT MARKER" che prevede la produzione di due costrutti ciascuno composto da una regione fiancheggiante il gene bersaglio e da un frammento incompleto del gene marker *Gen*. Tali costrutti sono stati sintetizzati mediante PCR di fusione e PCR nested. Il clonaggio dei costrutti ha avuto successo in quanto sono state identificate alcune colonie contenenti i due inserti di interesse. Una successiva estrazione di

DNA plasmidico e conseguente digestione ha permesso di verificare la presenza dei costrutti di interesse. I costrutti excisi dai rispettivi vettori saranno successivamente utilizzati per la trasformazione di uno dei mutanti knock-out per il gene *Fgsg_10212*, selezionati precedentemente per PCR e analisi Southern Blot. In tal modo si otterrà un doppio mutante di delezione nel quale i geni codificanti le cerato platanine saranno stati eliminati. Il fenotipo di questo mutante potrà essere analizzato mediante test di virulenza su piante ospiti quale frumento per poter verificare un eventuale ruolo delle cerato platanine nella patogenesi di *Fusarium graminearum*.

Il progetto nel quale si inserisce il presente lavoro prevede inoltre l'espressione eterologa delle cerato platanine di *F. graminearum* in *Pichia pastoris*, al fine di testare un loro eventuale ruolo come elicitori delle risposte di difesa sia su frumento che nella pianta modello *Arabidopsis thaliana*.

BIBLIOGRAFIA :

Brown N, Antoniw J, Hammond-Kosack KE (2012). The Predicted Secretome of the Plant Pathogenic Fungus *Fusarium graminearum*: A Refined Comparative Analysis. PLoS ONE, 7(4): e33731. DOI: 10.1371/journal.pone.0033731

Boller T and He SY (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. Science, 324: 742–744.

Dubin HJ, Gilchrist L, Reeves J, McNab A (1997) A *Fusarium* head scab: Global status and future prospects Proceedings of a Workshop; El Batan (Mexico).

Espino JJ, Gutierrez-Sanchez G, Brito N, Shah P, Orlando R, Gonzalez C (2010). The *Botrytis cinerea* early secretome. Proteomics 10: 3020–3034.

Frias M, Gonzalez C, Brito N (2011). BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. New Phytologist 192: 483–495.

Fontana F, Santini A, Salvini M, Pazzagli L, Cappugi G, Scala A, Durante M, Bernardi R (2008). Cerato-platanin treated plane leaves restrict *Ceratocystis platani* growth and overexpress defence-related genes. Journal of Plant Pathology 90: 295–306.

Goswami A, Kistler C (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crop. Molecular Plant Pathology 5(6): 515-25.

Govrin E, Levine A (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. Current Biology 10: 751–757.

Kazan K, Donald M, Gardiner J, Manners M (2011). On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. Molecular Plant Pathology, DOI: 10.1111/J.1364-3703.2011.00762.X.

Jeong JS, Mitchell TK, Dean RA (2007). The *Magnaporthe grisea* snodprot1 homolog, MSP1, is required for virulence. FEMS Microbiology Letters 273(2): 157-165.

Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? Journal of Experimental Botany, 59: 501–520.

Ngaje E, Bangsund D, Leistriz F, Wilson W, Tiapo N (2002). Estimating the economic impact of a crop disease: the case of the *Fusarium head blight* in U.S. wheat and barley. Agribusiness and Applied Economics Report No 538 July 2004.

Pazzagli L, Cappugi G, Manao G, Camici G, Santini A, Scala A (1999). Purification, characterization, and amino acid sequence of ceratoplatanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata*. Journal of Biology and Chemistry 274: 24959-24964.

Trenholm H, Foster C, Charmely L, Thompson B, Hartin K, Coppock R, Albassam M (1994). Effects of feeding diets containing *Fusarium* (naturally) contaminated wheat or pure deoxynivalenol (DON) in growing pigs. Canadian Journal of Animal Science, 74: 361-369.

Scala A, Pazzagli L, Comparin C, Santini A, Tegli S, Cappugi G (2004). Cerato-platanin, an early-produced protein by *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani*, elicits phytoalexin synthesis in host and non host-plants. Journal of Plant Pathology, 86(1): 27-33.

Valent B, Khang CH (2010) Recent advances in rice blast effector research. Current Opinion in Plant Biology, 13: 434–441.

Yang Y, Zhang H, Li G, Li W Wang X, Song F (2009). Ectopic expression of MgSM1, a cerato-platanin family protein from *Magnaporthe grisea*, confers broad spectrum disease resistance in Arabidopsis. Plant Biotechnology Journal 7: 763–777.