

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione
Dipartimento di Territorio e Sistemi Agro-Forestali

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie per l'Alimentazione

Tesi di Laurea

**Caratterizzazione di due proteine della famiglia
delle cerato-platanine prodotte dal fungo tossigeno
*Fusarium graminearum***

Relatore: *Prof. Francesco Favaron*
Dip. di Territorio e Sistemi Agro-Forestali

Correlatore: *Dott. Luca Sella*
Dip. di Territorio e Sistemi Agro-Forestali

Laureanda: *Alessandra Quarantin*
Matricola: 1039134

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

*“Non il possesso della conoscenza, della verità irrefutabile,
fa l'uomo di scienza, ma la ricerca critica,
persistente e inquieta, della verità”*

Karl Popper

Alla mia famiglia

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 Risposte di difesa delle piante indotte dal riconoscimento del patogeno	5
1.2 Le cerato-platanine (CP)	7
1.3 Il fungo tossigeno <i>Fusarium graminearum</i>.....	10
2. SCOPO DELLA TESI.....	13
3. MATERIALI E METODI.....	15
3.1 Analisi filogenetica delle cerato-platanine di <i>F. graminearum</i>.....	15
3.2 Studio dell'espressione dei geni <i>Fgcp10212</i> e <i>Fgcp11205</i> in spighe di frumento inoculate con <i>F. graminearum</i>	15
3.2.1 <i>Produzione di spore di F. graminearum WT e mutanti.....</i>	15
3.2.2 <i>Estrazione RNA da spighe di frumento inoculate con F. graminearum</i>	15
3.2.3 <i>Quantificazione RNA</i>	16
3.2.4 <i>Trattamento dell'RNA estratto con DNasi e retrotrascrizione</i>	16
3.2.5 <i>Real-Time PCR (qPCR)</i>	17
3.3 Knock-out sito specifico del gene <i>Fgcp10212</i> di <i>F. graminearum</i>	18
3.3.1 <i>Primers impiegati per il knock-out del gene Fgcp10212.....</i>	18
3.3.2 <i>Condizioni di crescita ed estrazione del DNA genomico di F. graminearum....</i>	19
3.3.3 <i>Amplificazione mediante PCR delle regioni fiancheggianti a monte e a valle del gene Fgcp10212.....</i>	20
3.3.4 <i>Purificazione degli ampliconi e PCR "fusion"</i>	21
3.3.5 <i>PCR "nested" e purificazione del costrutto</i>	22
3.3.6 <i>Integrazione del costrutto nel vettore pGEM-T Easy</i>	22
3.3.7 <i>Trasformazione batterica di cellule competenti di Escherichia coli</i>	24
3.3.8 <i>Screening delle colonie batteriche trasformate mediante PCR ("Colony-PCR")</i>	24
3.3.9 <i>Estrazione del DNA plasmidico e purificazione</i>	25
3.3.10 <i>Amplificazione del costrutto NESTED Fgcp10212</i>	25
3.3.11 <i>Protoplasting del fungo F. graminearum.....</i>	26
3.3.12 <i>Trasformazione dei protoplasti con il costrutto NESTED Fgcp10212.....</i>	27

3.3.13 Selezione dei mutanti	27
3.3.14 Preparazione e marcatura delle sonde per analisi Southern Blot	29
3.3.15 Digestione del DNA genomico dei ceppi mutanti e WT e analisi Southern blot	30
3.4 Test di patogenicità dei mutanti di <i>F. graminearum</i>	32
3.4.1 Test di patogenicità in soia.....	32
3.4.2 Test di patogenicità in frumento	32
3.5 Espressione eterologa delle cerato-platanine FgCP10212 e FgCP11205 di <i>F. graminearum</i> nel lievito <i>Pichia pastoris</i>	33
3.5.1 Disegno dei primers da utilizzare per il clonaggio delle ORF dei geni Fgcp10212 e Fgcp11205 nel vettore pGEM-T Easy	33
3.5.2 Estrazione, quantificazione e retrotrascrizione dell'RNA da spighette di frumento infette.....	33
3.5.3 Clonaggio delle intere sequenze codificanti Fgcp10212 ORF e Fgcp11205 ORF nel vettore pGEM-T Easy.....	34
3.5.4 Screening mediante "Colony PCR" delle colonie trasformate e purificazione dei DNA plasmidici ricombinanti	35
3.5.5 Sequenziamento dei DNA plasmidici ricombinanti	36
3.5.6 Disegno dei primers da utilizzare per il clonaggio delle sequenze codificanti le proteine FgCP10212 e FgCP11205 senza peptide segnale nel vettore pPICZαA	36
3.5.7 Amplificazione dai plasmidi ricombinanti delle sequenze codificanti le proteine FgCP10212 WSP e FgCP11205 WSP.....	37
3.5.8 Digestione degli ampliconi Fgcp10212 WSP e Fgcp11205 WSP.....	39
3.5.9 Ligasi degli inserti Fgcp10212 WSP e Fgcp11205 WSP nel vettore pPICZαA	39
3.5.10 Trasformazione di cellule competenti di <i>E. coli</i> con i vettori pPICZαA ricombinanti.....	40
3.5.11 Screening mediante "Colony PCR" delle colonie di <i>E.coli</i> trasformate contenenti i vettori pPICZαA ricombinanti.....	40
3.5.12 Estrazione e purificazione dei DNA plasmidici pPICZαA ricombinanti dai batteri trasformati.....	41
3.5.13 Linearizzazione, precipitazione e risospensione dei plasmidi pPICZαA ricombinanti.....	41
3.5.14 Preparazione di cellule competenti di <i>P. pastoris</i>	42
3.5.15 Trasformazione di <i>P. pastoris</i> per elettroporazione	42
3.5.16 Analisi mediante "Colony PCR" delle colonie trasformate di <i>P. pastoris</i>	43
3.5.17 Induzione dell'espressione in <i>P. pastoris</i>	44

3.5.18	<i>Precipitazione delle cerato-platanine ricombinanti FgCP10212 e FgCP11205 (salting out)</i>	45
3.5.19	<i>Analisi SDS-PAGE delle cerato-platanine ricombinanti FgCP10212 e FgCP11205</i>	45
3.6	Elicitazione di risposte di difesa in foglie di <i>Arabidopsis thaliana</i> infiltrate con le CP ricombinanti di <i>F. graminearum</i>	45
3.6.1	<i>Saggio per la rilevazione di perossido di idrogeno (H₂O₂) in foglie di A. thaliana infiltrate con le CP di F. graminearum</i>	45
3.6.2	<i>Saggio per la rilevazione di sintomi di necrosi in foglie di A. thaliana infiltrate con le CP di F. graminearum</i>	46
3.6.3	<i>Estrazione di RNA da foglie di A. thaliana infiltrate con le CP ricombinanti e retrotrascrizione</i>	46
3.6.4	<i>Analisi di espressione mediante qPCR dei geni PR1, PDF1.2 e UBG di A. thaliana infiltrata con le CP ricombinanti</i>	47
4.	RISULTATI	49
4.1	Le CP di <i>F. graminearum</i> appartengono a due gruppi distinti di sequenze “CP-like” fungine	49
4.1.1	<i>Selezione dei geni di F. graminearum codificanti cerato-platanine (CP)</i>	49
4.1.2	<i>Creazione di un albero filogenetico di proteine “CP-like” fungine</i>	51
4.2	Il gene <i>Fgcp10212</i> è l’unico espresso durante le prime fasi del processo infettivo	52
4.3	Knock-out sito specifico del gene <i>Fgcp10212</i> di <i>F. graminearum</i>	53
4.3.1	<i>Ottenimento del costrutto NESTED da utilizzare per il knock-out genico</i>	53
4.3.2	<i>Selezione dei mutanti knock-out ΔFgCP10212 mediante PCR e Southern Blot</i>	55
4.4	Virulenza dei mutanti ΔFgCP10212 su soia e frumento	58
4.4.1	<i>Test di patogenicità su soia</i>	58
4.4.2	<i>Test di patogenicità su frumento</i>	60
4.5	Espressione eterologa delle cerato-platanine FgCP10212 e FgCP11205 di <i>F. graminearum</i>	61
4.5.1	<i>Clonazione delle intere sequenze codificanti Fgcp10212 e Fgcp11205 nel vettore pGEM-T Easy</i>	61
4.5.2	<i>Clonazione delle sequenze codificanti le proteine FgCP10212 e FgCP11205 senza peptide segnale nel vettore di espressione pPICZαA</i>	65
4.5.3	<i>Trasformazione di P. pastoris e selezione delle colonie trasformate</i>	68
4.5.4	<i>Produzione eterologa delle CP ricombinanti</i>	69

4.6 Le CP di <i>F. graminearum</i> inducono accumulo di acqua ossigenata, necrosi ed espressione di geni di difesa in <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
4.6.1 <i>Le CP ricombinanti inducono produzione di H₂O₂ in foglie di A. thaliana</i>	70
4.6.2 <i>Le CP ricombinanti inducono sintomi di necrosi in foglie di A. thaliana</i>	72
4.6.3 <i>Espressione dei geni PR1 e PDF1.2 in foglie di A. thaliana infiltrate con le CP ricombinanti.....</i>	73
5. DISCUSSIONE	77
6. BIBLIOGRAFIA.....	81

RIASSUNTO

Le cerato platanine (CP), indicate anche come proteine *SNOD-like*, appartengono ad una famiglia di piccole proteine fungine idrofobiche con attività fitotossica che sembrano indurre risposte di difesa e necrosi in pianta. Alcune CP sono state dimostrate contribuire inoltre alla virulenza di funghi patogeni quali *Botrytis cinerea* e *Magnaporthe grisea*.

Fusarium graminearum è un patogeno fungino necrotrofo che provoca una malattia nota come Fusariosi della spiga (FHB), la quale colpisce principalmente specie graminacee quali frumento e altri cereali causando ingenti perdite sia quantitative che qualitative. Nel suo genoma vi sono due geni (*Fgcp10212* e *Fgcp11205*) putativamente codificanti per CP la cui funzione è ancora sconosciuta. Scopo di questo lavoro di tesi è stato caratterizzare la funzione di queste proteine di *F. graminearum* durante la patogenesi. Per prima cosa, è stata analizzata l'espressione dei due geni codificanti CP nelle primissime fasi del processo infettivo (24-72 hpi) mediante qPCR; poiché il gene *Fgcp10212* è risultato trascritto già dopo 24 ore e la sua espressione viene indotta a 72 ore, mentre il trascritto del gene *Fgcp11205* non è stato rilevato a questi tempi, si è ritenuto che il gene *Fgcp10212* fosse il principale candidato a svolgere un ruolo nelle prime importanti fasi di colonizzazione del tessuto ospite. Per verificare quindi il contributo della FgCP10212 alla virulenza del fungo, sono stati prodotti mutanti knock-out del gene codificante mediante ricombinazione omologa sito-specifica. La virulenza dei mutanti Δ FgCP10212 è stata testata su piante ospiti quali frumento e soia, dimostrata recentemente sensibile a marciumi radicali e del colletto causati da *F. graminearum*. Poiché i mutanti testati hanno dimostrato una virulenza comparabile con quella del fungo *wild-type*, si è dedotto che questa proteina non svolge un ruolo essenziale per il successo del processo infettivo di *F. graminearum*.

Successivamente si è verificato se le CP di *F. graminearum* fossero in grado di elicitare risposte difensive in pianta. Le due proteine di circa 15 kDa sono state espresse eterologamente nel lievito *Pichia pastoris* ed utilizzate per infiltrare foglie di *Arabidopsis thaliana*. Entrambe le CP sono risultate in grado di causare sintomi di necrosi e accumulo di H₂O₂ nei tessuti infiltrati. Si è quindi testato l'effetto di questi trattamenti di infiltrazione sull'espressione di geni di difesa di *A. thaliana* quali *PR1* (*Pathogenesis-Related 1*) e *PDF1.2* (*Plant Defensin 1.2*) a 24 e 48 ore dal trattamento. L'infiltrazione ha determinato un'induzione dell'espressione di *PR1* ad entrambi i tempi analizzati, con un livello maggiore di trascritto dopo 48 ore. Diversamente, dopo un'iniziale induzione a 24

ore, l'espressione del gene *PDF1.2* cala drasticamente dopo 48 ore tornando a valori basali.

Poiché queste CP sono in grado di indurre precocemente l'espressione di geni di difesa, potrebbero essere testate per verificarne l'efficacia nell'aumentare la resistenza dei tessuti trattati a microrganismi patogeni.

ABSTRACT

The cerato-platanin (CP), also referred to as *SNOD-like* proteins, belong to a family of small fungal hydrophobic proteins with phytotoxic activity which induce defense responses and necrosis in plants. Some CPs have been also shown to contribute to the virulence of pathogenic fungi such as *Botrytis cinerea* and *Magnaporthe grisea*.

Fusarium graminearum is a necrotrophic fungal pathogen that causes a disease known as Fusarium head blight (FHB), which primarily affects species such as wheat and other small grains causing huge quantitative and qualitative losses. In its genome there are two genes (*Fgcp10212* and *Fgcp11205*) putatively encoding for CPs, but their function is still unknown. The aim of this thesis was to characterize the function of these *F. graminearum* proteins during pathogenesis. Firstly, the expression of the two CP encoding genes was analyzed by qPCR in the early stages of the infection process (24-72 hpi); since the *Fgcp10212* gene was already transcribed 24 hours post infection (hpi) and its expression was induced at 72 hpi, while the *Fgcp11205* transcript was not detected at these time points, the *Fgcp10212* gene was considered as the main candidate to play an important role in the early stages of colonization of the host tissue. To verify the contribution of FgCP10212 to the virulence of the fungus, gene knock-out mutants were produced by site-specific homologous recombination. The virulence of the Δ FgCP10212 mutants was tested on host plants such as wheat and soybean, recently shown to be sensitive to root and crown rot caused by *F. graminearum*. Since the tested mutants showed a virulence comparable with that of the *wild-type* strain, it has been inferred that this protein does not play an essential role in the success of *F. graminearum* infection process.

Subsequently, we characterized the ability of the *F. graminearum* CPs to elicit defensive responses in plants. The two proteins of about 15 kDa were heterologously expressed in the *Pichia pastoris* yeast and used to infiltrate *Arabidopsis thaliana* leaves: both CPs were able to cause necrotic symptoms and accumulation of H₂O₂ in the infiltrated tissues. The effect of these infiltration treatments was therefore tested on the expression of *A. thaliana* defense genes such as *PR1* (*Pathogenesis-Related 1*) and *PDF1.2* (*Plant Defensin 1.2*) at 24 and 48 hours after treatment. The infiltration determined an induction of *PR1* gene expression at both time points analyzed, with a higher transcript level at 48 hours. In contrast, after an initial induction, the expression of the *PDF1.2* gene was drastically reduced at 48 hours returning to baseline values.

Since CPs are able to induce an early expression of defense genes, they could be tested to verify their effectiveness in increasing the resistance of treated plant tissues to pathogenic microorganisms.

1. INTRODUZIONE

1.1 Risposte di difesa delle piante indotte dal riconoscimento del patogeno

Le piante hanno evoluto meccanismi di difesa capaci di limitare, circoscrivere e/o prevenire le infezioni fungine o batteriche. Questi meccanismi di difesa si possono distinguere in preformati e indotti (Jones e Dangl, 2006). I meccanismi preformati sono costitutivi, quindi presenti in tutte le fasi vitali delle piante e garantiscono un livello basale di difesa dalle infezioni; i principali sono la presenza di metaboliti secondari antimicrobici denominati fitoanticipine, strutture morfologiche capaci di ostacolare l'ingresso nei tessuti (cuticola e parete secondaria), presenza di proteine o enzimi capaci di inibire o degradare i fattori di patogenicità.

Un grado di protezione più elevato è dato dai meccanismi di difesa indotti, scatenati nelle piante a seguito del riconoscimento dell'agente patogeno; in questo caso l'attivazione di risposte di difesa è determinata dal riconoscimento di molecole note come elicitatori o induttori di risposte di difesa. Gli elicitatori possono derivare dalla pianta (*DAMPs*, *Damage Associated Molecular Patterns*), ad esempio frammenti di parete cellulare degradata dal patogeno come oligogalatturonidi, o dal patogeno (*PAMPs* o *MAMPs*, *Pathogen or Microbe-Associated Molecular Patterns*) (Boller e He, 2009).

Il riconoscimento di queste molecole da parte di recettori generici di parete di pianta denominati *PRR* (*Pattern Recognition Receptors*) innesca una serie di risposte di difesa che vanno a costituire il complesso sistema dell'immunità (Dodds e Rathjen, 2010). La prima forma di risposta di difesa è nota come *PTI* (*PAMPs Triggered Immunity*) (Boller e He, 2009); tuttavia, durante l'infezione, molti patogeni possiedono un sistema di contro-difesa e secernono nelle cellule vegetali proteine effettrici in grado di inibire la *PTI* (Jones e Dangl, 2006). A loro volta le piante, in una vera e propria "corsa agli armamenti", hanno evoluto proteine di resistenza in grado di riconoscere questi effettori e attivare difese inducibili note come *ETI* (*Effectors Triggered Immunity*) (Boller e He, 2009; Thomma et al., 2011).

Una prima risposta indotta dall'attacco patogeno è la rapida produzione da parte delle cellule vegetali di una quantità massiva di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, *ROS*), denominata *burst ossidativo*. Tra le diverse specie reattive dell'ossigeno, il perossido di idrogeno (H_2O_2) gioca un ruolo fondamentale agendo come messaggero molecolare secondario poiché diffonde intra ed intercellularmente, ha bassa reattività ma

a concentrazioni elevate è tossico per l'ospite e l'agente patogeno (Van Breusegem et al., 2001). Il H_2O_2 è anche coinvolto nel rafforzamento della parete cellulare con deposizione di callosio e lignina e un suo accumulo a livelli soglia o cambiamenti nella sua omeostasi sono necessari per l'attivazione di segnali di trasduzione. L'attivazione intracellulare delle risposte di difesa richiede quindi un meccanismo di trasduzione del segnale mediato dalla sintesi e attivazione di cascate di MAP-chinasi (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Pitzschke et al., 2009; Hamel et al., 2012); generalmente i loro target finali sono fattori trascrizionali che, in stato fosforilato e quindi attivato, agiscono a livello nucleare regolando l'espressione di geni di difesa quali le proteine PR di patogenesi (*Pathogenesis-Related Proteins*) (chitinasi, β -1,3 glucanasi), la biosintesi di metaboliti secondari ad azione antimicrobica denominati fitoalessine e di fitormoni. Questi ultimi, principalmente acido salicilico (SA), acido jasmonico (JA) ed etilene (Et), contribuiscono in associazione al H_2O_2 alla risposta ipersensibile (*Hypersensitive Response*, HR), una forma di morte cellulare programmata (PCD) dei tessuti interessati dall'infezione, spesso associata a una forma di resistenza delle piante (Mur et al., 2008; Torres et al., 2010). Anche l'ossido nitrico (NO) rappresenta una importante molecola segnale che viene rapidamente generata dopo il riconoscimento del patogeno ed è in grado di agire sinergicamente con H_2O_2 durante la PCD (Caselli et al., 1995; Gaupels et al., 2011).

L'attacco del patogeno può infine indurre in pianta altre forme di resistenza denominate resistenza sistemica acquisita (SAR), in cui è coinvolto il fitormone SA, e resistenza sistemica indotta (ISR), in cui sono coinvolti JA ed Et, che proteggono l'intera pianta dall'attacco in corso e da attacchi successivi (Ryals et al., 1996; Durrant e Dong, 2004; Grant e Agnello, 2006; Van Wees et al., 2008). SAR e ISR sono attive nei confronti di un ampio spettro di organismi fitopatogeni fino ad impedire completamente la loro crescita durante attacchi secondari (Mur et al., 2008). Tuttavia SAR e ISR sembrano competere tra loro; in particolare, le risposte difensive regolate da SA sono considerate più efficaci contro i patogeni biotrofici ed emibiotrofici, mentre quelle regolate da JA/Et contro i patogeni necrotrofici (Zhang e Cai, 2005).

Il riconoscimento dell'agente patogeno risulta quindi fondamentale per consentire di attivare rapidamente le risposte di difesa della pianta e contrastare efficacemente la colonizzazione del tessuto vegetale da parte del patogeno (van Loon et al., 2006; Zipfel et al., 2009).

Numerosi sono i PAMP batterici identificati, per esempio la flagellina, una molecola strutturale riconosciuta dal sistema immunitario innato delle piante che determina

l'attivazione di varie risposte di difesa contro agenti patogeni (Felix et al., 1999; Zipfel et al., 2004). Nei funghi le molecole universalmente considerate come PAMP sono principalmente la chitina e la sua variante chitosano, le xilanasi, i β -glucani, le proteine Nep-like (*necrosis and ethylene-inducing proteins*) e l'ergosterolo (Boller et al., 2009). Solo recentemente sono state caratterizzate alcune proteine non catalitiche di piccole dimensioni, dotate anche di un'attività fitotossica, secrete da funghi fitopatogeni appartenenti al *phylum* degli Ascomiceti e Basidiomiceti. Queste proteine sono state proposte fungere da PAMP poichè coinvolte in vari aspetti della patogenesi: sono infatti in grado di stimolare i sistemi difensivi delle piante, inducendo ad esempio la sintesi di fitoalessine, e di indurre morte cellulare o sopprimere il meccanismo di difesa dell'ospite favorendo lo sviluppo dei sintomi di malattia (Templeton et al., 1994; Stergiopoulos e De Wit, 2009). Queste proteine fungine comprendono elicotine, idrofobine e la famiglia delle cerato-platanine (CPF) e condividono alcune caratteristiche biochimiche, per esempio il basso peso molecolare (6-15 kDa), la presenza da 4 a 8 residui di cisteina (Cys) coinvolti nella formazione di ponti disolfuro (S-S) e la localizzazione a livello di parete cellulare fungina.

1.2 Le cerato-platanine (CP)

La famiglia delle cerato-platanine (CPF) comprende più di 40 proteine prodotte da funghi Ascomiceti e Basidiomiceti, il cui meccanismo molecolare di azione nelle piante e soprattutto il loro ruolo biologico nella vita dei funghi non è ancora stato del tutto chiarito. Si tratta di una nuova famiglia di proteine caratterizzate da una elevata somiglianza di sequenza amminoacidica ma non sempre caratterizzate da una chiara somiglianza funzionale. Alcune di queste proteine sono state denominate proteine "SNOD-like" poiché presentano omologia di sequenza con una proteina fitotossica denominata Snodprot1 secreta dal fungo patogeno *Stagonospora nodorum* (Hane et al., 2007). La prima cerato-platanina (CP) isolata è una proteina secreta da *Ceratocystis fimbriata*, un Ascomicete patogeno del platano europeo (*Platanus acerifolia*) e agente causale della malattia del cancro colorato (Pazzagli et al., 1999). Nella banca dati *European Molecular Biology Laboratory (EMBL)*, la CP di *C. fimbriata* viene segnalata come il primo membro della famiglia delle cerato-platanine (CPF) ed è una proteina di piccole dimensioni di circa 120 aminoacidi (12.4 kDa) che probabilmente gioca un ruolo nella patogenesi ed è in grado di attivare risposte di difesa nelle piante ospiti come la sintesi di fitoalessine e morte cellulare (Pazzagli 1999; Scala et al., 2004). Questa CP,

rilevata anche nella parete cellulare di ascospore, ife e conidi (Boddi et al., 2004), contiene 4 cisteine conservate che formano due ponti disolfuro (Cys20-57 e Cys60-115) ed è moderatamente idrofoba (40% di residui idrofobici). Il gene codificante è costituito da un unico esone e possiede 42 bp che codificano per un peptide segnale di 14 residui che viene rimosso durante la secrezione della proteina matura (Pazzagli 1999; Pazzagli 2006). La struttura primaria della proteina CP di *C. fimbriata* è molto simile a quella di altre proteine secrete da altri Ascomiceti: SnodProt1 di *Phaeosphaeria nodorum*, espressa solo durante l'infezione di foglie di grano (Sharen et al., 1970); SnodProt1 di *Neurospora crassa*; l'allergene Asp f13 di *Aspergillus fumigatus*, che provoca una reazione allergica negli esseri umani (Kurup et al., 2000); l'antigene CS di 19 kDa di *Coccidioides immitis*, agente eziologico di una malattia umana respiratoria (Pan et al., 1995); SP1 di *Leptosphaeria maculans*, agente patogeno della gamba nera in *Brassica napus* (Wilson et al., 2002).

Le CP presentano alcune caratteristiche strutturali e funzionali in comune con la famiglia delle idrofobine, proteine idrofobiche di piccole e medie dimensioni (75-120 residui) secrete da molti funghi saprofiti o patogeni. In particolare l'idrofobicità potrebbe creare sulle ife fungine e sulla superficie dei conidi un rivestimento "acqua-repellente" in grado di ridurre la tensione superficiale, mediando l'interazione tra fungo e ambiente (Wessels et al., 1997; Ebbola, 1997; Wösten et al., 2001). Inoltre le idrofobine possiedono una notevole capacità di auto-assemblarsi prendendo parte a processi fisiologici e/o patologici (Wösten et al., 1993; Wösten et al., 2000), e questa capacità di auto-assemblaggio è anche stata dimostrata anche per la CP di *C. fimbriata* (Pazzagli et al., 2009). Al contrario, CP e idrofobine differiscono nella loro sequenza amminoacidica in quanto le idrofobine sono caratterizzate da 8 residui di cisteina, invece dei 4 tipici delle CP, e dalla sequenza consenso CCN, invece delle tipiche sequenze CSN o CSD caratteristiche delle CP (Boddi et al., 2004).

Recentemente per le cerato-platanine è stato ipotizzata anche una funzione simile alle espansine, proteine presenti principalmente nelle piante le cui funzioni principali sono l'allentamento della parete cellulare mediante distruzione dei legami non covalenti dei polisaccaridi di parete senza esercitare un'attività idrolitica e la regolazione dei processi legati a crescita e sviluppo (Sampedro e Cosgrove, 2005; Bouzarelou et al., 2008; Brotman et al., 2008).

Diverse proteine appartenenti alla famiglia delle cerato-platanine dei funghi patogeni sono state dimostrate agire come elicitatori (PAMP) di risposte di difesa a livello locale e

sistemico, in quanto inducono l'accumulo di fitoalessine, l'espressione di geni di difesa e la produzione di ROS (Wilson et al., 2002; Scala et al., 2004; Carresi et al., 2006; Seidl et al., 2006; Djonovic et al., 2006; Djonovic et al., 2007; Vargas et al., 2008). Ad esempio la CP di *Ceratocystis platani* induce risposte di difesa strutturali e fisiologiche in piante ospiti e non ospiti tra cui plasmolisi, morte cellulare, accumulo di composti fenolici e fitoalessine e induzione dell'espressione di geni di difesa (Scala et al., 2004; Bennici et al., 2005); foglie di platano trattate con la CP di *C. platani* attivano SAR e sono risultate in grado di inibire la germinazione di conidi di questo fungo (Fontana et al., 2008); nel genoma di *Botrytis cinerea* sono stati identificati due geni codificanti putative CP e l'infiltrazione di una di queste (BcSPL1) in foglie di pomodoro, tabacco e *Arabidopsis thaliana* ha indotto la comparsa dei segnali tipici di HR quali la produzione di ROS e l'espressione di geni di difesa (Frías et al., 2011).

È stato recentemente ipotizzato che la capacità della CP di *C. fimbriata* di auto-aggregarsi in soluzione formando “aggregati ordinati” sia connessa con la capacità di migliorare le risposte di difesa (Pazzagli et al., 2009). Tuttavia il meccanismo con cui le CP attivano risposte di difesa nelle piante ospiti e non-ospiti è ancora poco conosciuto poiché la proteina è in grado di interagire con componenti idrofobe dell'ospite, ad esempio la cuticola, senza penetrare la parete cellulare. Questo suggerisce un insolito meccanismo di trasduzione del segnale, sotto certi aspetti ancora da chiarire, non essendo ancora stato identificato un recettore PRR di pianta.

I dati attuali presenti in letteratura non aiutano a dipanare la questione, poiché queste proteine vengono solitamente infiltrate nei tessuti vegetali. Anche le vie di segnalazione attivate dalle CP sono in parte sconosciute, ma sembra esserci un coinvolgimento di SA, come dimostrato recentemente con la BcSPL1 di *B. cinerea* in tessuti di tabacco (Frías et al., 2013).

Oltre a indurre risposte di difesa le cerato platanine potrebbero svolgere un ruolo anche durante il processo infettivo di alcuni funghi fitopatogeni. Il gene *BcSpl1* di *B. cinerea* è fortemente espresso durante la crescita del fungo in presenza di estratto di fragola (Frías et al., 2011) e la delezione di questo gene dal genoma del fungo ha prodotto un mutante che esibisce ridotta virulenza su foglie di tabacco e pomodoro (Frías et al., 2011): la CP codificata dal gene *BcSpl1* può quindi essere considerata un fattore di virulenza di *B. cinerea*. Inoltre, mutanti del patogeno biotrofo *Magnaporthe grisea* che non producono CP hanno mostrato una virulenza ridotta in riso (Jeong et al., 2007). Altre CP dimostrate agire come fattori di virulenza sono SnodProt1 di *Phaeosphaeria nodorum*, SP1 di

Leptosphaeria maculans e MpCP1 di *Moniliophthora perniciosa* (Wilson et al., 2002; Jeong et al., 2007; Zapparoli et al., 2009).

1.3 Il fungo tossigeno *Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum (teleomorfo *Gibberella zeae*) è un fungo fitopatogeno emibiotrofo appartenente al *phylum* degli Ascomiceti; esso non produce strutture di penetrazione quali austori o appressori ma penetra nell'ospite tramite aperture naturali o attraverso le cellule dell'epidermide utilizzando corte ife infettive ed enzimi degradativi (Wanyoike et al., 2002). *F. graminearum* è l'agente eziologico della malattia nota come *Fusariosi della spiga* (*Fusarium head blight*, FHB) che colpisce specie monocotiledoni cerealicole quali frumento, orzo e mais (Goswami e Kistler, 2004), ed è inoltre responsabile di marciumi radicali e del colletto di plantule di soia, una specie dicotiledone, nella fase iniziale di sviluppo (Martinelli et al., 2004; Pioli et al., 2004).

La FHB si manifesta in frumento con scolorimento della spiga ed avvizzimento delle cariossidi ed è considerata una malattia del fiore, essendo le antere il sito primario di infezione; infatti le spore del fungo, trasportate dal vento e dall'acqua, ricadono e germinano sulle antere e da qui le ife raggiungono l'ovario in cui successivamente diffondono inter e intracellularmente per poi raggiungere sistemicamente il rachide e colonizzare l'intera spiga (Wanyoike et al., 2002). La FHB è una malattia diffusa in tutto il mondo e gravi epidemie si sono verificate in particolar modo nelle aree temperate o semitropicali, con recenti focolai in Canada, Europa, Asia, Australia e Sud America (O'Donnell et al., 2004). Le ingenti perdite economiche nell'industria agro-alimentare derivano sia dalla riduzione in peso della cariossidi che dalla contaminazione dei semi con micotossine appartenenti al gruppo dei tricoteceni secrete dal fungo durante la colonizzazione delle spighe (Goswami et al., 2004). Tra i tricoteceni, il deossinivalenolo (DON) è la principale causa di contaminazione del frumento: la sua presenza nel grano infetto causa gravi disfunzioni intestinali negli animali monogastrici non-ruminanti, risultando peraltro tossico, se assunto in elevate quantità, anche per altri animali e per l'uomo, con manifestazioni di vomito, nausea, anoressia e convulsioni (McMullen et al., 1997). La secrezione di DON nei tessuti infetti facilita il processo infettivo di *F. graminearum*: questa micotossina è infatti un fattore di virulenza del fungo in frumento in quanto blocca le risposte difensive dell'ospite, consente la diffusione del fungo nel rachide e quindi nell'intera spiga (Proctor et al., 1995; Bai et al., 2002) ed elicitando morte cellulare (Desmond et al., 2008).

Durante il processo infettivo *F. graminearum* secerne inoltre numerosi enzimi degradativi della parete cellulare, tra cui una endo-1,4- β -xilanasi in grado di indurre morte cellulare e produzione di H₂O₂ nei tessuti trattati indipendentemente dalla sua attività enzimatica; tuttavia questa endo-xilanasi non sembra essere essenziale per la virulenza del fungo (Sella et al., 2013).

Nel genoma di *F. graminearum*, completamente sequenziato (MIPS database, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/fusarium/>), sono presenti due geni (*Fgcp10212* e *Fgcp11205*) codificanti putative cerato-platanine di tipo SnodProt1. Sebbene un recente studio di proteomica abbia evidenziato che queste due proteine sono secrete *in planta* durante il processo infettivo di spighe di frumento (Paper et al., 2007), la loro funzione non è ancora nota.

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente lavoro è stato caratterizzare la funzione delle cerato platanine (CP) del fungo tossigeno *Fusarium graminearum*. Nel genoma del fungo sono stati identificati due geni (*Fgcp10212* e *Fgcp11205*) codificanti per putative CP, la cui espressione è stata analizzata mediante *Real-Time* PCR (qPCR) nelle prime fasi del processo infettivo di spighe di frumento (24-72 ore dall'inoculo). Poiché solo il gene *Fgcp10212* è risultato trascritto e potrebbe quindi svolgere un ruolo nelle prime importanti fasi di infezione, il primo obiettivo della presente tesi è stato effettuare il knock-out sito-specifico di questo gene per chiarire il contributo di questa CP alla virulenza del fungo durante il processo infettivo. Sono stati quindi prodotti dei mutanti di delezione utilizzando un costrutto sintetizzato mediante PCR contenente un gene marker di selezione all'antibiotico igromicina (*Hyg*), il quale va ad excidere il gene di interesse mediante eventi di ricombinazione omologa sito-specifica. Le colonie putativamente mutanti ottenute sono state analizzate mediante PCR e Southern Blot per confermare la delezione genica, e la virulenza dei mutanti è stata testata eseguendo inoculi sulle piante ospiti frumento e soia. Il secondo obiettivo di questo lavoro è stato quello di verificare se le CP di *F. graminearum* fossero in grado di elicitare risposte difensive in pianta. Le due proteine sono state quindi espresse eterologamente nel lievito *Pichia pastoris* e le proteine secrete dalle colonie trasformate, sono state analizzate con SDS-PAGE per confermare la produzione eterologa delle due proteine ricombinanti. Queste sono state successivamente utilizzate in esperimenti di infiltrazione di foglie di *A. thaliana* per verificare la loro capacità di causare sintomi di necrosi e indurre accumulo di H₂O₂ e l'espressione di geni di difesa nei tessuti vegetali infiltrati; in particolare è stata analizzata l'espressione dei geni *PRI* (un marker della via difensiva mediata dall'acido salicilico) e *PDF 1.2* (un marker della via biosintetica mediata da acido jasmonico ed etilene).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Analisi filogenetica delle cerato-platanine di *F. graminearum*

Le sequenze amminoacidiche codificanti cerato-platanine di diverse specie fungine, ottenute da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) in formato FASTA, sono state allineate con il software ClustalW. Nell'allineamento sono state incluse anche le sequenze amminoacidiche delle due putative cerato platanine di *F. graminearum* (teleomorfo *Gibberella zeae*) codificate dai geni *Fgcp10212* e *Fgcp11205* e identificate consultando il “*Fusarium graminearum* MIPS DATABASE” (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/fusarium/>). Ottenuto l'allineamento, si è costruito un albero di tipo *Neighbor Joinig* (NJ) mediante l'utilizzo del software MEGA5.

3.2 Studio dell'espressione dei geni *Fgcp10212* e *Fgcp11205* in spighe di frumento inoculate con *F. graminearum*

3.2.1 Produzione di spore di *F. graminearum* WT e mutanti

Il fungo *F. graminearum* wild-type (ceppo 8/1) e i mutanti sono stati allevati a 24°C in piastre Petri contenenti terreno PDA (Potato Dextrose Agar, Difco Laboratories). La produzione di spore è stata ottenuta allevando tondelli di micelio in attiva crescita in terreno liquido CMC [0.1% (w/v) NH₄NO₃, 0.1% (w/v) KH₂PO₄, 0.05% (w/v) MgSO₄, 0.1% (w/v) estratto di lievito, 1.5% (w/v) carbossimetilcellulosa (Cappellini e Peterson, 1965)]. Dopo 4 giorni di incubazione a temperatura ambiente in agitazione a 100 rpm il micelio è stato trattenuto con garze sterili e le spore sono state recuperate, centrifugate a 2500 rpm per 10 minuti, diluite in 5 ml di glicerolo sterile 10% (v/v) e contate in camera di Thoma.

3.2.2 Estrazione RNA da spighe di frumento inoculate con *F. graminearum*

Spighe di frumento (cv. Bobwhite) sono state inoculate ciascuna con 10 µl di sospensione conidiale contenente circa 2000 conidi di *F. graminearum* WT (ceppo 8/1) e poi recuperate a diversi tempi dall'inoculo (24, 48 e 72 ore). Le spighe infette, pestellate con l'utilizzo di azoto liquido, sono state utilizzate per l'estrazione di RNA mediante l'utilizzo del kit “*RNeasy Plant Mini Kit*” (Qiagen), seguendo quanto riportato nel protocollo del fornitore.

3.2.3 Quantificazione RNA

L'RNA estratto è stato inizialmente quantificato mediante lettura dell'assorbanza a 260 nm; il valore ottenuto viene convertito in concentrazione (ng/μl) attraverso la formula: $C = A_{260} \cdot 40 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot \text{fattore di diluizione}$. Nel nostro caso il fattore di diluizione impiegato è 200 poichè 2.5 μl di RNA sono stati diluiti con H₂O sterile a 500 μl finali.

Il valore di concentrazione ricavato spettrofotometricamente è stato utilizzato per stimare la concentrazione da caricare su gel denaturante d'agarosio all'1% (w/v) [0.5 g di agarosio sciolti in 37 ml di acqua sterile e 5 ml di MOPS 10X (MOPS 0.2 M; sodio acetato 0.05 M; EDTA 0.001 M) e successiva aggiunta di 8 ml di formaldeide 37% (v/v)]. Circa 500 ng di RNA di ciascun campione sono stati incubati a 65 °C per 5 minuti per denaturare eventuali strutture secondarie e, prima della corsa, a ciascun campione sono stati aggiunti 2 μl di Etidio Bromuro 0.1% (v/v) per visualizzare le bande di RNA ribosomiale. Come tampone di corsa è stato utilizzato MOPS 1X. La quantità di RNA di ogni campione è stata quindi valutata visivamente in base alle intensità delle bande rilevate su gel.

3.2.4 Trattamento dell'RNA estratto con DNasi e retrotrascrizione

Per rimuovere eventuali contaminazioni di DNA genomico, i campioni di RNA estratti sono stati trattati con DNasi come riportato di seguito:

- 8 μl RNA;
- 1 μl Buffer DNasi 10X (Promega);
- 1 μl DNasi (Promega);

Dopo incubazione per 30 minuti a 37 °C, ad ogni campione è stato aggiunto 1 μl di Stop Solution e la DNasi è stata denaturata mediante trattamento a 65 °C per 10 minuti.

La retrotrascrizione (RT) è stata eseguita utilizzando l'enzima Reverse Transcriptase ImProm–IITM (Promega). Per la reazione di RT (30 μl finali) sono stati utilizzati 500 ng di RNA e il primer Oligo dT (15/18 timine che si appaiano alla coda poliA dei trascritti eucariotici) seguendo il protocollo della ditta.

Reagenti	Campione 24 hpi	Campione 48 hpi	Campione 72 hpi
RNA trattato con DNasi	8.25 μl	9.3 μl	10 μl
Oligo dT (500 ng/μl)	1.5 μl	1.5 μl	1.5 μl
H ₂ O sterile	5.25 μl	4.2 μl	3.5 μl

Per denaturare le strutture secondarie dell'RNA le miscele sono state incubate a 70 °C per 5 minuti e poi raffreddate a 4 °C per altri 5 minuti.

L'effettiva retrotrascrizione dell'RNA messaggero è avvenuta mediante l'enzima trascrittasi inversa. Ai precedenti 15 µl sono stati aggiunti i seguenti reagenti:

Reagenti	Campione 24 hpi	Campione 48 hpi	Campione 72 hpi
Buffer 5X ImPromII (Promega)	6 µl	6 µl	6 µl
MgCl ₂ (stock 25mM)	0.63 µl	0.25 µl	-
dNTPs (stock 10mM)	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
RT ImPromII (Promega)	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
H ₂ O sterile	5.37 µl	5.75 µl	6 µl

La retrotrascrizione è avvenuta in un termociclatore alle seguenti condizioni:

- Ibridazione per 5 min a 25 °C per consentire l'appaiamento degli oligo dT;
- Estensione per 60 min a 42 °C per la sintesi del cDNA;
- Inattivazione della trascrittasi inversa per 15 min a 70 °C.

3.2.5 Real-Time PCR (qPCR)

Il cDNA ottenuto è stato usato come stampo in una reazione di qPCR eseguita in un termociclatore Rotor–Gene Q (Qiagen) utilizzando una Master Mix (Qiagen) contenente il colorante fluorogenico SYBR–Green-I.

I primers impiegati nella reazione di qPCR sono stati disegnati per l'amplificazione dei geni *Fgcp10212* e *Fgcp11205*, che codificano per le due cerato-platanine di *F. graminearum*, e del gene costitutivo *Fgsg_06611*, codificante la β-tubulina di *F. graminearum* (Tabella 1).

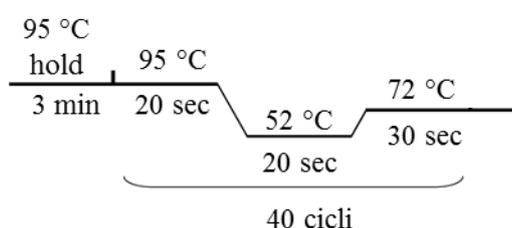
Tabella 1. Primers Forward e Reverse impiegati nella reazione qPCR per la quantificazione relativa dell'espressione dei geni *Fgcp10212* e *Fgcp11205* di *F. graminearum* durante il processo infettivo. I primers sono stati disegnati con il programma PRIMER 3 (<http://primer3.ut.ee/>). Per la quantificazione relativa è stato utilizzato il gene costitutivo *Fgsg_06611* codificante la β-tubulina del fungo.

Nome gene	Nome primer	Sequenza 5'- 3'
<i>Fgcp10212</i>	INT 10212 for	TTCACTGGTATCCTCTCTGC
	INT 10212 rev	GTTGACACCACCGATGTACT
<i>Fgcp11205</i>	INT 11205 for	ACCAACCCCTCTCTCAATAC
	INT 11205 rev	GATGCTCTTGCCCTTGTAG
β-tub <i>Fgsg_06611</i>	β-tub FGSG_06611 for	CCCAACAACGTCCAAACTTCC
	β-tub FGSG_06611 rev	CCTCGGTGAATTCCATCTCGTC

Per l'amplificazione dei geni di interesse ai diversi tempi dall'inoculo (24, 48 e 72 ore) sono state preparate miscele da 20 µl contenenti:

- 10 µl di SYBR Green PCR Master Mix [Stock 2X] (HotStarTaq Plus DNA Polymerase, SYBR Green PCR Buffer, dNTP mix);
- 1 µl primer Forward [100 pmol] (Tabella 1);
- 1 µl primer Reverse [100 pmol] (Tabella 1);
- 3 µl cDNA;
- 5 µl H₂O Milli-Q (Millipore).

Il ciclo qPCR è avvenuto alle seguenti condizioni:



La specificità dei prodotti di amplificazione è stata verificata tramite *Melting Analysis*.

3.3 Knock-out sito specifico del gene *Fgcp10212* di *F. graminearum*

3.3.1 Primers impiegati per il knock-out del gene *Fgcp10212*

Le coppie di oligonucleotidi impiegati per la costruzione del costrutto per il knock-out sito specifico del gene *Fgcp10212* e per lo screening delle colonie fungine putativamente mutanti sono state disegnate con il programma PRIMER3 (<http://primer3.ut.ee/>).

Tabella 2. Primers per l'amplificazione delle sequenze UP e DOWN. Ta (°C) indica la temperatura di appaiamento utilizzata nella reazione di PCR.

N.	Nome primer	Sequenza 5'- 3'	Ta (°C)	Dimensione (bp)
1	UP for ₁ 10212	ATGCCACAGCATTGAAAACA	55	890 bp
2	UP rev ₂ 10212	agatgccgaccgaacaagagctgtcccccACGGTTGTGG GTTTTTGTGT		
3	DOWN for ₃ 10212	tcaatgctacatcacccacctcgtcccccACGGCTGCAAC TCTACGACT	55	985 bp
4	DOWN rev ₄ 10212	TTGTTGAAGTGCTCCAGTGC		

Tabella 3. Primers per la NESTED PCR. Ta (°C) indica le temperatura di appaiamento utilizzate nella reazione di PCR.

N.	Nome primer	Sequenza 5'- 3'	Ta (°C)	Dimensione (bp)
5	NESTED for ₅ 10212	GCGGTGGAACCTTCGATTTTA	52-54-56	3460 bp
6	NESTED rev ₆ 10212	TCATCGTGCATCAGCTAACA		

Tabella 4. Primers per lo screening dei mutanti $\Delta FgCP10212$. Ta (°C) indica la temperatura di appaiamento utilizzata nella reazione di PCR.

Nome primer	Sequenza 5'- 3'	Ta (°C)	Dimensione (bp)
INT 10212 for	TTCACTGGTATCCTCTCTGC	51	252 bp
INT 10212 rev	GTTGACACCACCGATGTACT		
INT 11205 for	ACCAACCCCTCTCTCAATAC	51	262 bp
INT 11205 rev	GATGCTCTTGCCCTTGTAG		
HygPRB2 for	CTCTCTCAAAGCATCACTCT	55	418 bp
HygPRB2 rev	TAGTGTACCACTTGACCAAA		

3.3.2 Condizioni di crescita ed estrazione del DNA genomico di *F. graminearum*

Il DNA genomico di *F. graminearum* wild type (ceppo 8/1) è stato estratto da micelio allevato per 4 giorni in agitazione a 25 °C in 50 ml di terreno liquido CM (Tabella 5).

Tabella 5. Composizione del terreno liquido colturale Complete Medium (CM).

Terreno	Composizione
Complete Medium (CM)	1% (w/v) glucosio, 0.05% (w/v) estratto di lievito, 0.5% (w/v) "Yeast Nitrogen Base w/o amino acids" (Difco Laboratories)

Il micelio è stato omogeneizzato con l'uso di mortaio e pestello in presenza di azoto liquido ed in seguito si sono aggiunti 2 ml di CTAB 2X [2% (w/v) CTAB, 100 mM TrisHCl pH=8, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1% (w/v) PVP] e 20 μ l di β -mercaptoetanololo ogni 200-400 mg di micelio. La miscela è stata vortexata ed incubata a 65 °C per 1 h per favorire un'efficace lisi cellulare. Successivamente, alla miscela sono stati aggiunti 2 ml di cloroformio:alcol isoamilico (24:1) e si è incubato in ghiaccio in agitazione per 1-2 ore. Dopo centrifugazione a 9.000 rpm per 15 min, la fase liquida in cui sono risospesi gli acidi nucleici è stata recuperata e il DNA è stato precipitato aggiungendo 1 volume di isopropanolo e 1/10 di volume di sodio acetato 3 M. Dopo incubazione a -20 °C il campione è stato quindi nuovamente centrifugato a 9.000 rpm per 10 min e il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo 70% e risospeso in 50 μ l di acqua sterile. Successivamente l'RNA presente negli estratti di DNA genomico è stato eliminato

mediante trattamento con RNasi. Per verificare il successo dell'estrazione, il DNA genomico è stato sottoposto a corsa elettroforetica su gel agarosio 1% (w/v) contenente 0.6 µg/ml di etidio di bromuro.

3.3.3 Amplificazione mediante PCR delle regioni fiancheggianti a monte e a valle del gene Fgcp10212

Per ottenere il costrutto per la delezione del gene *Fgcp10212* di *F. graminearum*, le rispettive regioni fiancheggianti (denominate UP e DOWN), necessarie per la ricombinazione omologa sito-specifica, sono state amplificate utilizzando oligonucleotidi specifici (Tabella 2) e come template il DNA genomico estratto.

In particolare, i primers UP rev e DOWN for posseggono “code” di 29 basi non appaiabili (^^^)^ omologhe alle estremità del gene marker per la resistenza all'antibiotico igromicina (Hyg) che verranno utilizzate come innesco per la successiva reazione di “fusion” PCR.

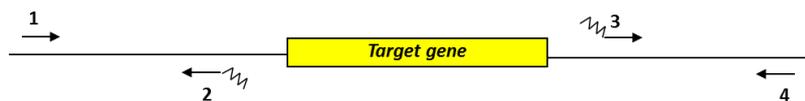
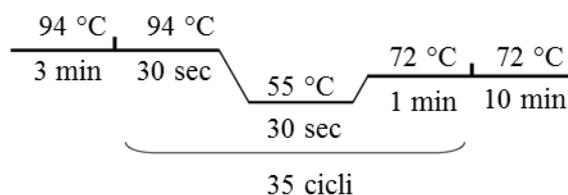


Figura 1. I numeri indicano i rispettivi primers impiegati nell'amplificazione delle regioni fiancheggianti UP e DOWN del gene Fgcp10212 riportati in Tabella 2.

L'amplificazione è stata effettuata mediante PCR in un volume totale di 50 µl contenente:

- 1 µl primer for (100 ng) (Tabella 2);
- 1 µl primer rev (100 ng) (Tabella 2);
- 1.5 µl di DNA genomico;
- 25 µl di REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich) contenente 3 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTP mix 0.06 unità/µL di Taq DNA polimerasi;
- 21.5 µl H₂O sterile.

I 35 cicli di amplificazione sono avvenuti alle seguenti condizioni:



La successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (w/v) ha consentito di verificare il successo dell'amplificazione. La corretta dimensione degli ampliconi ottenuti è stata valutata utilizzando come standard il marcatore di peso molecolare 1 Kb DNA Ladder (Gene Ruler™ - Fermentas).

3.3.4 Purificazione degli ampliconi e PCR "fusion"

Gli ampliconi ottenuti sono stati purificati seguendo la procedura riportata nel protocollo di purificazione del kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). La quantità di amplificato presente nei campioni di DNA purificato, eluito con 40 µl di acqua sterile, è stata stabilita mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (w/v).

Gli ampliconi purificati sono stati utilizzati in una seconda PCR "fusion" per fondere le regioni fiancheggianti omologhe UP e DOWN con il gene di resistenza *Hyg* (igromicina B fosfotransferasi), sfruttando le "code" dei frammenti UP e DOWN che fungono da primers.

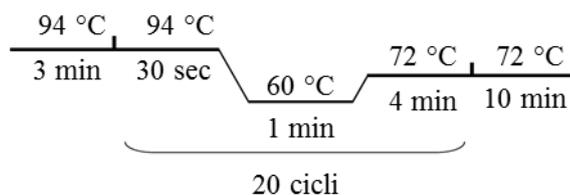


Figura 2. PCR di fusione delle regioni fiancheggianti UP e DOWN del gene *Fgcp10212* con la sequenza del gene codificante per la resistenza all'igromicina (*Hyg*).

La reazione di PCR è stata realizzata in un volume totale di 50 µl contenenti:

- 25 µl di REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl₂ (Sigma-Aldrich);
- 3 µl di *Fgcp10212* UP (100 ng);
- 3 µl di *Fgcp10212* DOWN (100 ng);
- 3 µl di *Hyg* (300 ng);
- H₂O sterile fino al volume indicato.

L'amplificazione è stata ottenuta alle seguenti condizioni:



3.3.5 PCR “nested” e purificazione del costrutto

I prodotti di PCR “fusion” sono stati utilizzati come stampo in una successiva reazione di PCR “nested” al fine di aumentare la sensibilità e specificità dell’amplificazione. La coppia di primers NESTED utilizzata (Tabella 3) è stata disegnata per appaiarsi a regioni leggermente più interne del prodotto di fusione (Figura 3).

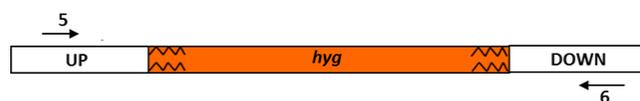
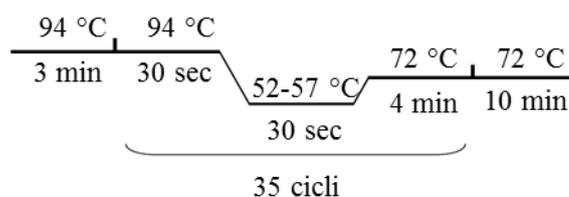


Figura 3. I numeri indicano i primers riportati in Tabella 3 impiegati nella reazione di PCR NESTED del gene *Fgcp10212*.

La PCR è stata eseguita in un volume di 25 µl contenenti:

- 25 µl di REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl₂ (Sigma-Aldrich);
- 1 µl di primer NESTED for (100 ng) (Tabella 3);
- 1 µl di primer NESTED rev (100 ng) (Tabella 3);
- 1.5 µl di prodotto “fusion”;
- 9 µl di H₂O sterile.

Per amplificare l’amplicone è stata eseguita una “gradient PCR” impiegando una temperatura di annealing variabile da 52 a 57 °C. La reazione è avvenuta ripetendo per 35 cicli le seguenti condizioni:



I prodotti di amplificazione del costrutto NESTED *Fgcp10212* sono stati purificati con il kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e la concentrazione è stata stimata con una successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (w/v).

3.3.6 Integrazione del costrutto nel vettore pGEM-T Easy

Il costrutto NESTED *Fgcp10212* è stato clonato nel vettore plasmidico pGEM[®]-T Easy (Promega) (Figura 4) sfruttando la presenza nel costrutto di estremità coesive di adenine create dalla Taq polimerasi durante la reazione di PCR.

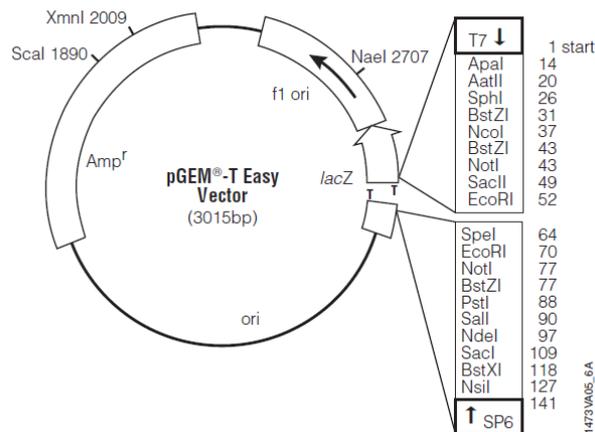


Figura 4. Vettore pGEM[®]-T Easy (Promega) utilizzato per il clonaggio: contiene un gene marker di resistenza all'ampicillina (*Amp*), un sito multiplo di clonaggio all'interno della sequenza codificante l'enzima β -galattosidasi (gene *lacZ*), siti unici di restrizione, una timina ad ogni estremità 3' del vettore linearizzato per consentire l'integrazione di prodotti PCR dalla ottenuti con Taq polimerasi.

L'inserimento del costrutto nel vettore già linearizzato è mediato dall'enzima DNA ligasi (Promega) (Figura 5). La reazione di ligasi da 10 μ l è stata eseguita mantenendo un rapporto 3:1 inserto-vettore e conteneva:

- 0.5 μ l di pGEM-T Easy (stock 50 ng/ μ L);
- 1.5 μ l di inserto NESTED *Fgcp10212* (100 ng/ μ L);
- 1 μ l di DNA ligasi;
- 1.5 μ l di Ligation Buffer 10X;
- 6 μ l H₂O sterile.

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

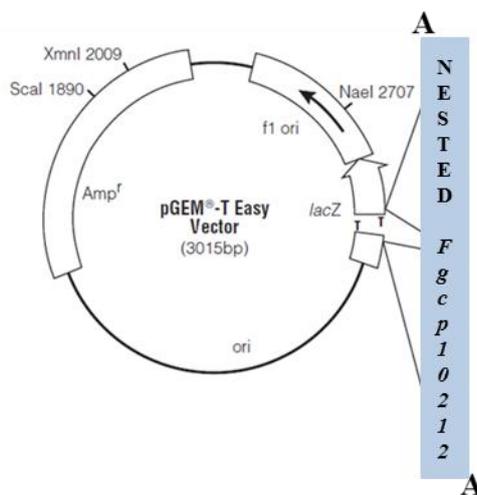


Figura 5. Integrazione dell'inserto NESTED *Fgcp10212* nel vettore pGEM[®]-T Easy mediata dall'appaiamento delle timine al 3' del vettore con le adenine al 3' dell'inserto.

3.3.7 Trasformazione batterica di cellule competenti di *Escherichia coli*

Cellule competenti di *E. coli* (DH5 α), conservate a -80 °C, sono state trasformate con la miscela di ligasi seguendo il procedimento dello shock termico (42 °C per 50 sec), per favorire l'integrazione del plasmide nelle cellule. Le cellule sono poi state coltivate in 900 μ l di LB-Broth liquido (Sigma-Aldrich) privo di antibiotico per 1.5 h a 37 °C e in agitazione a 150-180 rpm. In seguito si è centrifugato a 10,000 rpm per 3 minuti per far precipitare i batteri, risospesi poi in 500 μ l di LB; aliquote da 100 μ l di batteri sono stati quindi distribuiti su piastre Petri di LB-Broth solido (LB Broth liquido + 1,5% Bacto-Agar [Difco Laboratories]) contenenti 100 μ l/ml di ampicillina e 40 μ l di X-Gal (stock 25 ng/ μ l). Le cellule piastrate sono state quindi incubate overnight a 37 °C e solo quelle contenenti il vettore *pGEM[®]-T Easy* hanno sviluppato colonie bianche o blu; tuttavia queste ultime verranno escluse perché prive di inserto. Infatti, il costrutto si inserisce nel vettore interrompendo il gene *lacZ* che codifica per la β -galattosidasi, enzima che utilizzando il substrato X-Gal produce una colorazione blu delle colonie.

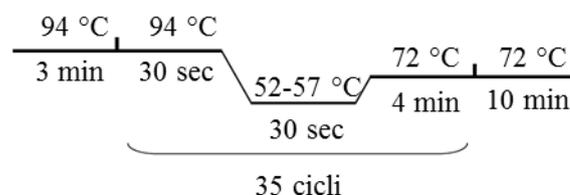
3.3.8 Screening delle colonie batteriche trasformate mediante PCR (“Colony-PCR”)

Una decina di colonie batteriche bianche trasformate con il costrutto sono state testate con PCR per verificare l'avvenuta trasformazione utilizzando la coppia di primers NESTED utilizzata precedentemente per ottenere il costrutto (Tabella 3).

Le miscele da 20 μ l contenevano:

- 10 μ l di REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂ (Sigma-Aldrich);
- 1 μ l di primer NESTED forward₅ (100 ng) (Tabella 3);
- 1 μ l di primer NESTED reverse₆ (100 ng) (Tabella 3);
- 8 μ l di H₂O sterile.

Le colonie d'interesse sono state inoculate nelle miscele di PCR mediante un puntale sterile. La reazione di PCR è avvenuta alle seguenti condizioni:



Mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (w/v) è stato possibile individuare alcune colonie trasformate, poiché per ognuna era visibile una banda della dimensione dell'inserto integrato nel vettore.

Una colonia NESTED *Fgcp10212* selezionata è stata allevata overnight a 37 °C in agitazione in 50 ml di LB-Broth liquido contenente 50 µl ampicillina [stock 100 mg/ml].

3.3.9 Estrazione del DNA plasmidico e purificazione

Dopo crescita o/n, dalla colonia trasformata con il costrutto NESTED *Fgcp10212* è stato estratto il DNA plasmidico secondo il protocollo di estrazione riportato nel kit *GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit* (Sigma-Aldrich). Il DNA plasmidico è stato infine risospeso in 1 ml di Elution Solution e quantificato con una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (w/v).

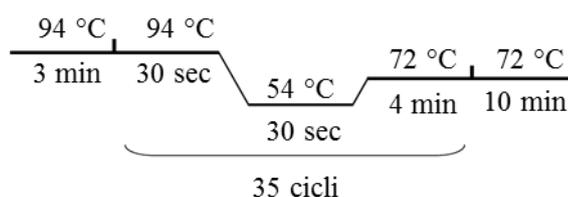
3.3.10 Amplificazione del costrutto NESTED *Fgcp10212*

Mediante il programma *DNAMAN* è stata costruita la mappa di restrizione del costrutto NESTED *Fgcp10212* (3460 bp) per poter selezionare gli enzimi di restrizione al fine di excidere il costrutto dal vettore *pGEM®-T Easy*; questo si rende necessario perché l'evento di integrazione nel genoma del fungo è facilitato se si utilizzano costrutti linearizzati. L'assenza di possibili enzimi di restrizione da impiegare per il costrutto NESTED *Fgcp10212* ha visto la necessità di isolarlo dal vettore mediante una reazione di PCR.

L'amplificazione del costrutto NESTED *Fgcp10212* è avvenuta alle condizioni successivamente riportate. Sono state eseguite 10 reazioni di PCR da 50 µl ciascuna contenenti:

- 25 µl di REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂ (Sigma-Aldrich);
- 0.5 µl di DNA plasmidico NESTED *Fgcp10212* + pGEM®-T Easy diluito 1:10 (circa 5 ng);
- 1 µl primer NESTED *Fgcp10212* for₅ (100 ng) (Tabella 3);
- 1 µl primer NESTED *Fgcp10212* rev₆ (100 ng) (Tabella 3);
- 22.5 µl di acqua sterile.

La reazione di PCR è avvenuta alle seguenti condizioni:



Il prodotto di amplificazione è stato purificato seguendo le istruzioni riportate kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Sigma-Aldrich) ed eluito in 30 μ l di acqua sterile. Sono state eseguite complessivamente tre eluizioni ottenendo un volume finale di amplificato pari a 85 μ l.

Una corsa elettroforetica su gel agarosio 1% (w/v) ha permesso di quantificare il prodotto amplificato che è stato successivamente precipitato con l'aggiunta di 2.5 volumi di EtOH e 1/10 di volume di sodio acetato 3M pH 5.2. Il campione è stato successivamente centrifugato per 15-20 minuti a 13,200 rpm e, scartato il surnatante, il pellet è stato lavato con EtOH 70%. Dopo centrifugazione finale di 15 minuti a 13,200 rpm, il pellet è stato asciugato e risospeso in 20 μ L di H₂O sterile.

3.3.11 Protoplasting del fungo *F. graminearum*

Il costrutto NESTED *Fgcp10212* è stato utilizzato per la trasformazione dei protoplasti di *F. graminearum* WT (ceppo 8/1) ottenuti da micelio fungino cresciuto da 1×10^6 conidi inoculati in 100 ml di terreno di coltura YEPD (Tabella 6) e incubati overnight a 28 °C in agitazione a 150 rpm.

Tabella 6. *Composizione del terreno colturale YEPD.*

Terreno	Composizione
YEPD	1% (w/v) estratto di lievito; 2% (w/v) bacto peptone; 2% (w/v) D-glucosio

Tabella 7. *Composizione della soluzione enzimatica di lisi della parete cellulare e di STC-Co.*

Soluzione	Composizione
soluzione enzimatica	12.5% (w/v) driselasi; 2.5% (w/v) enzima di lisi; 1.2 M KCl
STC-Co	20% saccarosio; 10 mM Tris-HCl pH 8.0; 50 mM CaCl ₂

Il micelio è stato inizialmente filtrato con un filtro Wilson da 100 μ m; circa 0.5 g sono stati lavati con acqua sterile, asciugati e poi aggiunti a 20 ml di una soluzione enzimatica (Tabella 7) per degradare la parete cellulare fungina. La sospensione è stata incubata per circa 3 h a 30 °C in agitazione a 80 rpm. I protoplasti ottenuti sono stati filtrati con filtri Wilson da 100 μ m e successivamente da 40 μ m e centrifugati per 10 min a 2.200 rpm a temperatura ambiente, quindi lavati con 10 ml di STC-Co (Tabella 7). Dopo essere stati contati con una camera di Thoma, i protoplasti sono stati centrifugati nuovamente e risospesi in STC-Co ad una concentrazione di 1×10^8 /ml.

3.3.12 Trasformazione dei protoplasti con il costrutto NESTED Fgcp10212

A 200 μ l di protoplasti (2×10^7 protoplasti) sono stati aggiunti 10 μ g del costrutto NESTED ottenuto precedentemente mediante PCR. Dopo essere stata mescolata dolcemente, la miscela è stata incubata per 20 min a temperatura ambiente.

Tabella 8. Composizione delle soluzioni PEG-Co e TB3.

Soluzione	Composizione
PEG-Co	60% STC-Co; 40% PEG 4000 (Sigma-Aldrich)
TB3	200 g/l saccarosio; 3.0 g/l estratto di lievito; 3.0 g/l caseina da idrolisi acida

Alla soluzione è stato poi aggiunto 1 ml di PEG-Co e, dopo aver ben mescolato, si è incubato nuovamente per 20 min (Tabella 8) per favorire l'entrata del DNA nelle cellule. In seguito si sono aggiunti 5 ml di TB3 (Tabella 8) e la miscela è stata incubata per 30 min in agitazione a 100 rpm a temperatura ambiente. Infine sono stati aggiunti 50 ml di TB3 agarizzato [TB3 + 1.5% (w/v) agar granulato] privo di antibiotico e si è proceduto con la piastratura in 5 piastre Petri per garantire la rigenerazione delle pareti cellulari. Dopo crescita overnight, le cellule con parete cellulare riformata sono state ricoperte con un ugual volume di acqua agarizzata con 1.5% (w/v) di agar granulato contenente una doppia quantità di antibiotico igromicina B [400 μ g/ml] (Duchefa Biochemie) per selezionare i mutanti con integrazione del costrutto.

3.3.13 Selezione dei mutanti

I mutanti cresciuti nelle piastre con antibiotico sono stati trasferiti in piastri contenenti "CM_{complete} medium" solido (Tabella 9).

Tabella 9. Composizione del terreno di coltura "CM_{complete} medium" solido utilizzato per la crescita dei mutanti.

Terreno CM _{complete} medium	Composizione
Yeast Casein-Mix	1 g/l estratto di lievito; 0.5 g/l caseina idrolizzata enzimaticamente; 0.5 g/l caseina da idrolisi acida
Soluzione A	100 g/l Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O
Soluzione B	20 g/l KH ₂ PO ₄ ; 25 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 15 g/l NaCl pH 5.3
Glucosio	0.1% (w/v)
MNS	60 mg/l H ₃ BO ₃ ; 320 mg/l CuSO ₄ x 5 H ₂ O; 13 mg/l KI; 51 mg/l (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O; 60 mg/l MgSO ₄ x H ₂ O; 5.48 g/l ZnSO ₄ x 7 H ₂ O; 932 mg/l FeCl ₃ x 6 H ₂ O
Cloroformio	2 ml
Agar granulato	1.5% (w/v)
Igromicina B	150 μ g/ml

Le piastre sono state mantenute a 28 °C overnight per controllare l'effettiva resistenza dei mutanti.

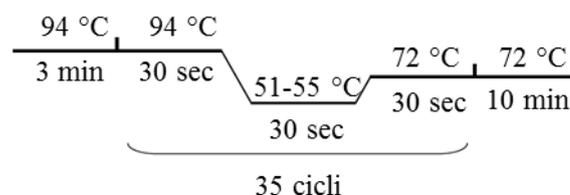
I mutanti Δ FgCP10212 resistenti sono stati testati con PCR impiegando come stampo il DNA genomico estratto da questi e le coppie specifiche di primers disegnate per amplificare le regioni interne del gene *Fgcp10212* (per verificarne la presenza o l'assenza), del gene *Hyg* (che dovrebbe sostituirsi al gene *Fgcp10212*) e del gene *Fgcp11205* (utilizzato come controllo positivo) (Tabella 4). Per l'estrazione del DNA dalle colonie fungine mutanti è stato utilizzato un metodo di estrazione rapida; in dettaglio, una piccola quantità di micelio in attiva crescita è stato recuperato dalle piastre Petri con ansa sterile e immerso in 50 μ l di TE buffer (Tris HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 0.1 mM pH 7.5). Il micelio è stato trattato 2 volte per 50 secondi a massima potenza in microonde. Dopo 5 minuti a temperatura ambiente i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 13,200 rpm ottenendo un surnatante con 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. Un'aliquota di 1 μ l della soluzione è stata impiegata come stampo nella reazione di PCR da 20 μ l contenente:

- 10 μ l di 2X REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl₂ (Sigma-Aldrich);
- 1 μ l di primer for (10 pmol) (Tabella 4);
- 1 μ l di primer rev (10 pmol) (Tabella 4);
- 1 μ l DNA genomico;
- 7 μ l di H₂O sterile.

Per ogni campione si sono utilizzate tre diverse coppie di primers e diverse temperature di appaiamento per amplificare i geni *Fgcp10212*, *Hyg* e *Fgcp11205*.

La reazione è avvenuta ripetendo per 35 cicli le seguenti condizioni:



Una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (w/v) ha consentito di verificare il risultato dell'amplificazione.

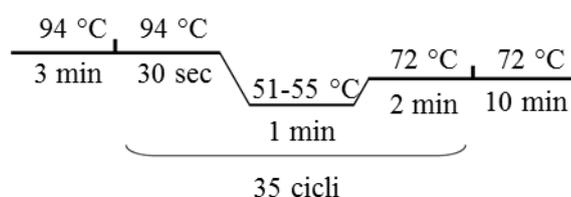
3.3.14 Preparazione e marcatura delle sonde per analisi Southern Blot

Per l'analisi Southern Blot è stato necessario preparare sonde marcate con digossigenina omologhe ai geni *Fgcp10212* e *Hyg*, la cui sintesi e marcatura sono avvenute tramite reazione di amplificazione utilizzando gli stessi primers dello screening dei mutanti (Tabella 4) e come stampo il DNA plasmidico contenente il gene *Hyg* o il DNA genomico del fungo WT (per amplificare il gene *Fgcp10212*).

La miscela di reazione da 100 µl conteneva:

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

Il ciclo adottato per tale reazione di amplificazione è il seguente, ripetuto per 35 cicli:



La DNA polimerasi incorporerà nell'amplicone anche residui di uracile coniugato con digossigenina (dUTP-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) seguendo le istruzioni del produttore. Il DNA è stato eluito in 40 µL di acqua sterile.

3.3.15 Digestione del DNA genomico dei ceppi mutanti e WT e analisi Southern blot

Dieci mutanti di interesse e il ceppo 8/1 di *F. graminearum* sono stati allevati in coltura in terreno liquido CM [1% glucosio, 0.05% estratto di lievito, 0.5% “Yeast Nitrogen Base w/o amino acids”, Difco Laboratories]; dopo tre giorni di crescita il DNA genomico dei ceppi è stato estratto dal micelio come riportato nel paragrafo 3.3.2. Il DNA genomico estratto è stato quindi digerito con l'enzima di restrizione *VspI* che ha siti di taglio solo all'esterno delle sequenze fiancheggianti il gene *Fgcp10212*, di cui si vuole verificare l'assenza nei mutanti, 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, calcolati in base alla visualizzazione su gel dei DNA separati mediante corsa elettroforetica.

La digestione overnight a 37 °C è stata eseguita in un volume di 500 µl contenenti:

- 65 - 200 µl di DNA genomico (circa 2 µg);
- 50 µl di Buffer D 10x (Promega);
- 5 µl di BSA (10 mg/ml);
- 3.5 µl di *VspI* (12 U/µl);
- 1 µl di RNasi (10 mg/ml);
- 240.5 – 375.5 µl di acqua sterile.

Dopo aver saggiato l'avvenuta digestione mediante corsa elettroforetica, i campioni di DNA sono stati precipitati tramite aggiunta di un ugual 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.

Il DNA digerito è stato incubato a 65 °C per 5 minuti e poi caricato su gel d'agarosio 1.2% (w/v) senza etidio bromuro. La corsa elettroforetica a 80 V è avvenuta in tampone TAE per 4 ore (Tabella 10). Una volta ultimata la corsa si è proceduto con la colorazione tramite immersione del gel per circa 15 minuti in una soluzione di 150 ml di acqua contenente 7.5 µl di etidio bromuro (10 µg/µl). A questo punto è stato possibile fotografare il DNA digerito.

Per denaturare il DNA il gel è stato posto in agitazione per 45 minuti in soluzione denaturante (Tabella 10) e poi per 45 minuti in soluzione neutralizzante (Tabella 10).

Successivamente il DNA è stato trasferito dal gel ad una 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 (Tabella 10).

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.

Dopo il fissaggio si è passati alla fase di ibridazione con sonde specifiche per il gene *Hyg* e per il gene *Fgcp10212*, precedentemente bollite per 5 minuti e raffreddate in ghiaccio per un minuto. Il filtro, precedentemente incubato per tre ore a 65 °C con soluzione di pre-ibridazione (Tabella 10), è stato ibridato con la sonda (5 ng/cm² di membrana) diluita direttamente nella soluzione di pre-ibridazione, con successiva incubazione overnight in agitazione a 65 °C. Successivamente sono stati eseguiti quattro lavaggi stringenti delle membrane a 65 °C con due soluzioni contenenti SSC 1X e SDS 0.1% (due lavaggi da 15 minuti) e SSC 0.1X e SDS 0.1% (due lavaggi da 30 minuti).

La membrana è stata quindi immersa in Washing Buffer (Tabella 10) per cinque minuti e poi incubata a temperatura ambiente in Blocking Solution (Tabella 10) 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 della membrana per 30 minuti a temperatura ambiente si sono effettuati due lavaggi di 15 minuti con Washing Buffer per rimuovere l'anticorpo non legato. Infine la membrana è stata incubata per 3 minuti in Detection Buffer (Tabella 10) in cui è stato diluito 1:100 il CDP-Star (25mM [Roche Applied Science]) che funge da substrato chemiluminescente per la fosfatasi alcalina. La membrana è stata poi avvolta in una pellicola trasparente ed esposta per 3 ore 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.

Tabella 10. Composizione del tampone TAE e delle soluzioni utilizzate per l'analisi Southern Blot.

Soluzione	Composizione
Tampone TAE	0.8 mM Tris HCl, 0.4 mM Acido acetico, 0.04 mM EDTA, pH 8
Soluzione denaturante	NaOH 0.5M; NaCl 1.5M
Soluzione neutralizzante	NaCl 1.5 M; Tris-HCl 1M pH 8
Tampone salino SSC 10X	175.3 g/l di NaCl e 88.2 g/l di Na citrato, pH 7
Soluzione di pre ibridazione	N-lauril sarcosina 0.1% (w/v), SDS 0.02% (w/v), SSC5X, blocking reagent 0.5% (w/v) (Roche Applied Science)
Washing Buffer	Acido maleico 1X, Tween-20 0.3% (v/v)
Blocking Solution	Maleic Acid Buffer 1X, blocking reagent 1% (w/v) (Roche Applied Science)
Detection Buffer	Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM

3.4 Test di patogenicità dei mutanti di *F. graminearum*

3.4.1 Test di patogenicità in soia

Il test di patogenicità in soia è stato eseguito secondo il protocollo “*Rolled Towel*” messo a punto da Ellis et al. (2011) con alcune modificazioni. L'inoculo è stato allestito mettendo 20 semi (*cv Demetra*, Singenta) in fila al centro di 2 salviette precedentemente sterilizzate e bagnate con 25 ml di acqua sterile e inoculando ogni seme con 200 µl di sospensione conidiale fresca (prodotta come riportato nel paragrafo 3.2.1) contenente 80.000 conidi precedentemente pregerminati per 16 h. Altre 2 salviette sono state sovrapposte alle prime e bagnate con 30 ml di acqua sterile. Il tutto è stato arrotolato in modo da realizzare un cilindro che è stato posto in verticale per consentire germinazione e crescita delle plantule, realizzando un “*Rolled Towel*”. Per l'inoculo sono stati utilizzati i mutanti fungini ΔFgCP 1.14, ΔFgCP 1.16, ΔFgCP 1.44, il fungo *F. graminearum* WT (ceppo 8/1) e come controllo la sospensione conidiale è stata sostituita con acqua. L'incubazione è avvenuta al buio a 25 °C per 6 giorni. Al sesto giorno sono state misurate la lunghezza della lesione e la lunghezza totale della plantula. La virulenza dei mutanti di *F. graminearum* è stata determinata misurando il *Disease Index*, cioè il rapporto tra la lunghezza della lesione e la lunghezza totale della plantula, moltiplicato per 100.

3.4.2 Test di patogenicità in frumento

Le piante di frumento (*cv Bobwhite*) sono state allevate in condizioni di temperatura e fotoperiodo controllate fino al momento della fioritura. Dopo una vernalizzazione di 7 giorni le piante sono state fatte crescere per 1 mese a 17/19 °C (notte/giorno) con un fotoperiodo di 14 ore; poi a 19/22 °C (notte/giorno) sempre con un fotoperiodo di 14 ore fino alla fine dell'infezione.

Per ogni spiga di frumento, 2 fiori di 2 spighette opposte sono stati inoculati con 10 µl di una sospensione conidiale (2×10^5 conidi/ml) di *F. graminearum* WT (ceppo 8/1) o del mutante ΔFgCP 1.14 ottenuta come riportato nel paragrafo 3.2.1. Ciascuna spiga di frumento, dopo l'inoculo, è stata ricoperta per 3 giorni con un sacchetto di plastica trasparente inumidito per creare una condizione di umidità favorevole allo sviluppo del fungo. Le piante sono state mantenute per 21 giorni in condizioni controllate e i sintomi sono stati monitorati riportando il numero di spighette sintomatiche sul totale di spighette presenti sulla spiga (% di spighette infette) a 7, 10, 14, 17 e 21 giorni.

3.5 Espressione eterologa delle cerato-platanine FgCP10212 e FgCP11205 di *F. graminearum* nel lievito *Pichia pastoris*

3.5.1 Disegno dei primers da utilizzare per il clonaggio delle ORF dei geni Fgcp10212 e Fgcp11205 nel vettore pGEM-T Easy

I primers utilizzati per il clonaggio delle *open reading frame* (ORF) dei geni *Fgcp10212* e *Fgcp11205* nel vettore *pGEM[®]-T Easy* sono stati disegnati manualmente per ottenere un primer ORF forward coincidente con la sequenza d'inizio del gene a partire dal codone d'inizio ATG e un primer ORF reverse complementare alle ultime basi fino alla tripletta codificante il codone di stop (Tabella 11).

Tabella 11. Primers per il clonaggio in *pGEM[®]-T Easy* delle intere ORF dei geni *Fgcp10212* e *Fgcp11205*, compresa la sequenza codificante il peptide segnale.

Nome primer	Sequenza 5'- 3'	Ta (°C)	Dimensione (bp)
ORF for 10212	ATGAAGTTCACTGGTATCCT	50	477 bp
ORF rev 10212	TTACTTCTTGAGGCCACA	50	
ORF for 11205	ATGCAGCTGACCAACCTC	52	479 bp
ORF rev 11205	CTATTTCTTCAATCCACAGTTGC	52	

3.5.2 Estrazione, quantificazione e retrotrascrizione dell'RNA da spighette di frumento infette

Per il clonaggio delle intere sequenze codificanti (ORF) dei geni *Fgcp10212* e *Fgcp11205* si è estratto l'RNA da spighette di frumento recuperate 5 giorni dopo l'inoculo con spore di *F. graminearum* WT (ceppo 8/1). L'RNA è stato estratto, quantificato, trattato con DNasi e retrotrascritto come riportato nei paragrafi 3.2.2, 3.2.3 e 3.2.4.

La miscela di reazione di RT da 20 µl conteneva:

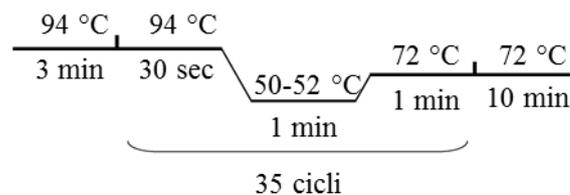
- 1.5 µl di RNA trattato con DNasi (500 ng);
- 1 µl primer Oligo dT (500 ng/µl);
- 4 µl buffer 5X ImPromII (Promega);
- 1.6 µl MgCl₂ (stock 25 mM);
- 1 µl dNTPs (stock 10 mM);
- 1 µl RT ImPromII (Promega)
- acqua sterile fino a volume finale di 20 µl.

Successivamente l'amplificazione delle intere sequenze codificanti *Fgcp10212* e *Fgcp11205* è stata ottenuta utilizzando come stampo il cDNA ottenuto dalla RT e specifiche coppie di primers ORF forward e ORF reverse (Tabella 11).

Le miscele separate di reazione da 50 µl contenevano:

- 25 µl REDTaq ReadyMix PCR Reation Mix (Sigma-Aldrich);
- 3 µl cDNA;
- 1 µl di primer ORF for (100 ng) (Tabella 11);
- 1 µl di primer ORF rev (100 ng) (Tabella 11);
- 20 µl acqua Nuclease-free.

È stata eseguita una "Gradient PCR" per amplificare contemporaneamente i due geni (Ta=50 °C per il gene *Fgcp10212* ORF e Ta=52 °C per il gene *Fgcp11205* ORF) con le seguenti condizioni ripetute per 35 cicli:



I prodotti di amplificazione sono stati caricati su gel di agarosio 1% (w/v) per verificare la corretta dimensione degli ampliconi (*Fgcp10212* ORF: 477 bp; *Fgcp11205* ORF: 479 bp).

Ciascun prodotto di PCR è stato purificato secondo il protocollo di purificazione del kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" (Sigma-Aldrich), eluito con 35 µL di acqua sterile e controllato su gel di agarosio 1% (w/v) per poter stimare la quantità di amplificato presente nei campioni.

3.5.3 Clonaggio delle intere sequenze codificanti *Fgcp10212* ORF e *Fgcp11205* ORF nel vettore pGEM-T Easy

L'intera sequenza codificante (ORF) le cerato platanine *Fgcp10212* e *Fgcp11205* è stata inserita nel vettore plasmidico *pGEM-T[®] Easy* (Figura 6) mediante reazione di ligasi da 10 µl contenente:

- 1 µl Ligation Buffer 10X;
- 0.5 µl vettore *pGEM-T[®] Easy* (25 ng);
- 1.5 µl inserto *Fgcp10212* ORF / *Fgcp11205* ORF (15 ng circa);

- 1 µl T4 DNA ligasi (1 U);
- H₂O a volume.

Le reazioni di ligasi sono avvenute overnight a 4 °C.

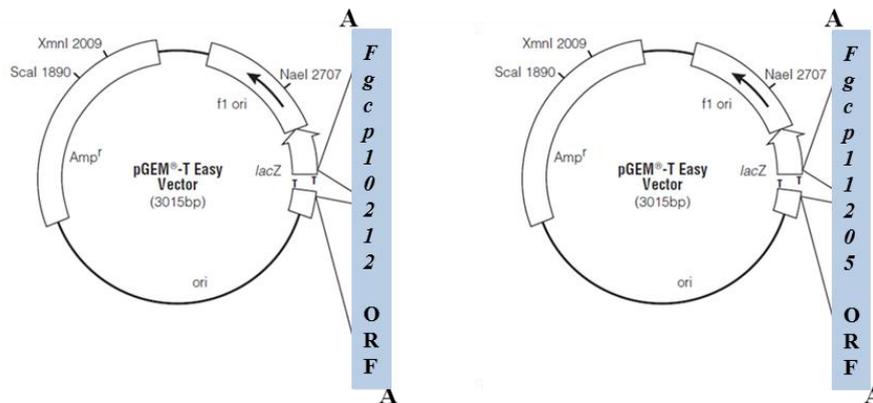


Figura 6. Integrazione degli inserti Fgcp10212 ORF e Fgcp11205 ORF nel vettore pGEM-T[®] Easy mediata dall'appaiamento delle timine al 3' del vettore con le adenine al 3' dell'inserto.

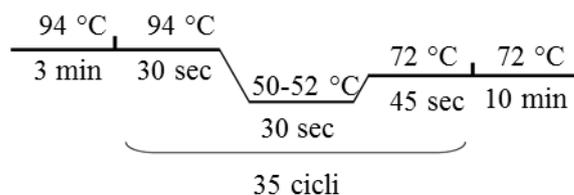
La trasformazione di cellule competenti di *E. coli* con i plasmidi ricombinanti ottenuti (Figura 6) è avvenuta seguendo la procedura riportata nel paragrafo 3.3.7.

3.5.4 Screening mediante “Colony PCR” delle colonie trasformate e purificazione dei DNA plasmidici ricombinanti

Alcune colonie bianche cresciute o/n a 37 °C sono state selezionate e testate mediante PCR con le coppie di primers ORF (Tabella 11) per verificare la presenza dei due geni di interesse. Sono state selezionate 10 colonie ricombinanti pGEM-T[®] Easy + ORF fgs_g_10212 (pGEM 10212 ORF) e 10 colonie ricombinanti pGEM-T[®] Easy + ORF fgs_g_11205 (pGEM 11205 ORF) e per ciascuna è stata preparata una mix di reazione contenente:

- 10 µl di REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl₂ (Sigma-Aldrich);
- 1 µl primer forward (100 ng) (Tabella 11);
- 1 µl primer reverse (100 ng) (Tabella 11);
- 8 µl di acqua.

Le colonie di interesse sono state inoculate nelle miscele di PCR mediante un puntale sterile e sottoposte alle seguenti condizioni di amplificazione per 35 cicli:



I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati su gel di agarosio 1% (w/v) per confermare l'avvenuta trasformazione delle colonie di *E. coli* con i vettori ricombinanti osservando la presenza di una banda a circa 500 bp. Le colonie trasformate *pGEM 10212 ORF N.1* e *N.10* e *pGEM 11205 ORF N.9* e *N.10* sono state selezionate per indurne la crescita in 1.5 ml LB liquido addizionato con 1.5 µl di ampicillina (stock 100 mg/mL) mediante incubazione o/n a 37 °C a 180 rpm. Il DNA plasmidico è stato quindi purificato mediante il kit commerciale *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) seguendo il protocollo del produttore. Ciascun campione di DNA plasmidico è stato eluito in 30 µl di Elution Buffer e quantificato su gel d'agarosio 1% (w/v).

3.5.5 Sequenziamento dei DNA plasmidici ricombinanti

Per accertarsi che le sequenze clonate non abbiano subito mutazioni dovute ad errori da parte degli enzimi polimerasici utilizzati, è stato necessario sequenziare i DNA plasmidici purificati *pGEM 10212 ORF N.10* e *pGEM 11205 ORF N. 10* utilizzando la coppia di primers *M13 forward* e *M13 reverse* che si appaiano al vettore *pGEM-T[®] Easy*.

Quattrocento ng di DNA plasmidico sono stati portati a secco a 65 °C per un'ora e inviati per il sequenziamento alla *BMR Genomics*, Padova (<http://www.bmr-genomics.it/>) dove è stato utilizzato il metodo *Sanger*.

3.5.6 Disegno dei primers da utilizzare per il clonaggio delle sequenze codificanti le proteine *FgCP10212* e *FgCP11205* senza peptide segnale nel vettore *pPICZαA*

Per il clonaggio nel vettore di espressione di *P. pastoris pPICZαA* sono stati disegnati primers che amplificano i geni *Fgcp10212* e *Fgcp11205* senza la sequenza codificante il peptide segnale (*WSP*), predetta dal programma *SignalP* (<http://expasy.org/tools>) (Tabella 12), poiché il vettore *pPICZαA* è dotato di fattore di secrezione proprio. I primers inoltre possiedono degli adattatori alle estremità 5' che contengono il sito di restrizione per *EcoRI* e *XbaI* in modo da creare le estremità coesive per l'inserzione delle sequenze codificanti cerato platanine nel vettore *pPICZαA* (Tabella 13).

Tabella 12. Predizione con il programma SignalP (<http://expasy.org/tools>) del peptide segnale (in giallo) nelle sequenze amminoacidiche delle cerato platanine di *F. graminearum* e identificazione delle corrispondenti sequenze nucleotidiche codificanti (in grigio).

Fgcp10212	
<p>ATGAAGTTCACCTGGTATCCTCTCTGCTCTCGCTCTCACCTCCGCCGCTCGGCCACCACTGTCTCCTACGACACTGGCT ACGATGACAAGTCTCGCCCCATGACCGCGTCTCTTGCTCTGATGGCTCCAACGGTCTCATCCAAGTACGGCTGGAA GACCCAGGGCAACATCCCCACCAAGTACATCGGTGGTCAACATCATCGCTGGCTGGAACCTCCCCAAGTACGGTGGT TGCTACCGCCTCGAGTACAAGGGCCGCAAGATCAACGTCCTTGCCATCGACCACGCCGCTCTGGCTTCAACATTGGCC TCGATGCCATGAACGCCCTCACTGGTGGCCAGGCTACCGCGCTCGGCCGTGCAACGCCAGGTCTACCACGCTGACCC TTCTGCTTGTGGCCTCAAGAAGTAA</p>	420 nt
<p>MKFTGLLSALALTSVSATTVSYDTGYDDKSRPMTAVSCSDGNSGLITKYGWKTQGNIPTKYIGGVNIIAGWNSPNCGG CYRLEYKGRKINVLAI DHAASGFNIGLDAMNALTGGQATALGRVNAQVYHADPSACGLKK</p>	
Sito di taglio tra le posizioni 18 e 19: VSA-TT	
Fgcp11205	
<p>ATGCAGCTGACCAACCTCTTCTGTCTCGCCAGTGTCTGACCTCCGTGTGTCAGCAATCACCGTATCCTACGACCCAGGCT ATGGCGAAGCTGGCCGCGCCATGACAGCGTCTCTGCTCCGATGGCACAACGGCTCATCACGCGTACGGCTGGAA GACTCAAGGCCAGATCCCCAAGTTTCCCTACATTGGCGCGCGCAGGCCATCGCTGGCTGGAACCTCCCGAGCTGCGGC ACGTGTGGAAGCTTACCTACAAGGGCAAGAGCATCAACGTCCTTGCCATCGACCACACTGCTGCGGGCTTCAACATTT CTCCCGCGCGATGAACGCTCTTACCAACAACCAGGCTGTTTACGCTTGGTGGGTTGATGCGACTGCTACTCAGGTCGC TGTTAGCAACTGTGGATTGAAGAAATAG</p>	423 nt
<p>MQLTNLFCLASVLTSVSAITVSYPGYEAGRAMTAVSCSDGTNGLITRYGWKTQGGI PKFFYIGGAQAIAGWNSPSCG TCWKLTYKGSINVLAI DHTAAGFNISPAAMNALTNNQAVQLGRVDTATQVAVSNCGLKK</p>	
Sito di taglio tra le posizioni 18 e 19: VSA-IT	

Tabella 13. Primers per il clonaggio in pPICZαA dei geni Fgcp10212 e Fgcp11205 senza sequenza codificante il peptide segnale (WSP). In verde: sito di restrizione per EcoRI. In rosso: sito di restrizione per XbaI. Ta (°C) indica la temperatura di appaiamento utilizzata.

Nome primer	Sequenza 5' - 3'	Ta (°C)	Dimensione (bp)
<i>pPICZαA</i> for 10212	ATGCA GAATTC ACCACTGTCTCCTACGA	50	366 bp
<i>pPICZαA</i> rev 10212	ATGCA TCTAGA TTACTTCTTGAGGCCACA	50	
<i>pPICZαA</i> for 11205	ATGCA GAATTC GCAATCACCGTATCCTAC	50	372 bp
<i>pPICZαA</i> rev 11205	ATGCA TCTAGA CTATTTCTTCAATCCACAGTTG	50	

3.5.7 Amplificazione dai plasmidi ricombinanti delle sequenze codificanti le proteine FgCP10212 WSP e FgCP11205 WSP

Le sequenze codificanti senza la regione del peptide segnale sono state amplificate dai rispettivi DNA plasmidici sequenziati impiegando i primers specifici con adattatori (Tabella 13) per l'inserzione nel vettore *pPICZαA* (Figura 7).

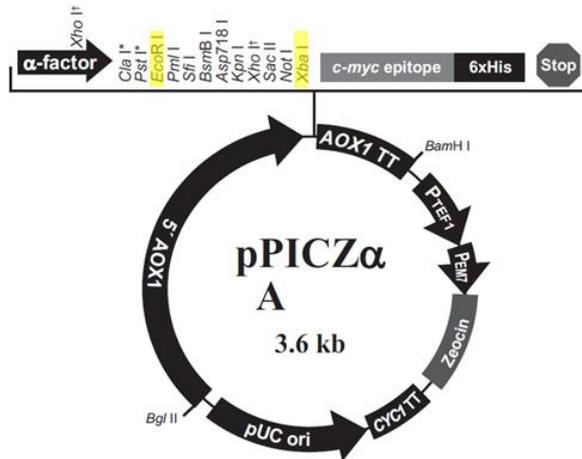
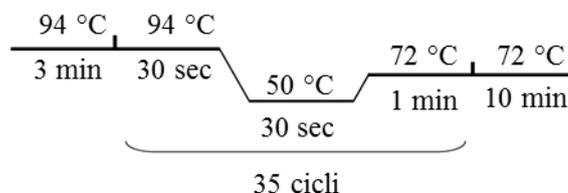


Figura 7. Vettore pPICZ α A (Invitrogen) per l'espressione eterologa in *Pichia pastoris*. Il vettore è dotato di un promotore *AOX1* al 5' metanolo inducibile per ottenere alti livelli di espressione in *P. pastoris*, un sito multiplo di clonaggio con 10 siti unici di restrizione, un α -factor di secrezione proprio e un fattore di selezione di resistenza all'antibiotico Zeocina. In giallo sono evidenziate le endonucleasi di restrizione EcoRI e XbaI utilizzate per l'inserzione dei geni nel vettore pPICZ α A.

Le sequenze *Fgcp10212 WSP* e *Fgcp11205 WSP* sono state amplificate mediante una reazione di PCR contenente:

- 37.5 μ l acqua sterile;
- 5 μ l Buffer 10X (Promega);
- 1 μ l dNTPs (stock 10 mM);
- 1 μ l DNA plasmidico ricombinante (\approx 20 ng);
- 1 μ l primer *pPICZ α A* for (100 ng) (Tabella 13);
- 1 μ l primer *pPICZ α A* rev (100 ng) (Tabella 13);
- 1 μ l Pfu DNA polimerasi (Promega) (1.5 U);
- 3 μ l MgSO₄ (stock 25 mM).

L'amplificazione è stata effettuata in un termociclatore in cui sono state impostate le seguenti fasi ripetute 35 volte:



Per questa amplificazione è stata utilizzata la Pfu DNA polimerasi in quanto dotata di attività *proof-reading* (correzione di bozze), quindi più precisa nel processo di sintesi del nuovo filamento di DNA. Dopo aver purificato il prodotto di amplificazione con il kit

Wizard SV gel and PCR Clean-up System (Promega), il DNA amplificato è stato controllato su gel di agarosio 1% (w/v) per poter stimarne la concentrazione.

3.5.8 Digestione degli ampliconi *Fgcp10212 WSP* e *Fgcp11205 WSP*

I prodotti di amplificazione sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *XbaI* per ottenere *sticky ends* in un volume totale di 100 µl contenenti:

- 300 ng di DNA;
- 20 µl Buffer Tango 2X (Fermentas);
- 1 µl *EcoRI* (Promega) (10 U);
- 1.5 µl *XbaI* (Promega) (15 U);
- acqua sterile a volume;

Le digestioni sono durate 4 ore a 37 °C. I prodotti di amplificazione digeriti sono stati purificati con il kit *Wizard SV gel and PCR Clean-up System* (Promega) e successivamente controllati su gel di agarosio 1% (w/v) per poter stimarne la concentrazione.

3.5.9 Ligasi degli inserti *Fgcp10212 WSP* e *Fgcp11205 WSP* nel vettore *pPICZαA*

Due distinte reazioni di ligasi hanno consentito di legare gli inserti *Fgcp10212 WSP* e *Fgcp11205 WSP* nel vettore di espressione *pPICZαA* (già digerito con i medesimi enzimi di restrizione *EcoRI* e *XbaI*). Gli inserti *Fgcp10212 WSP* e *Fgcp11205 WSP* andranno così ad inserirsi nel sito di policlonaggio del vettore *pPICZαA* sotto il controllo del promotore dell'alcol ossidasi (AOX1) (Figura 8).

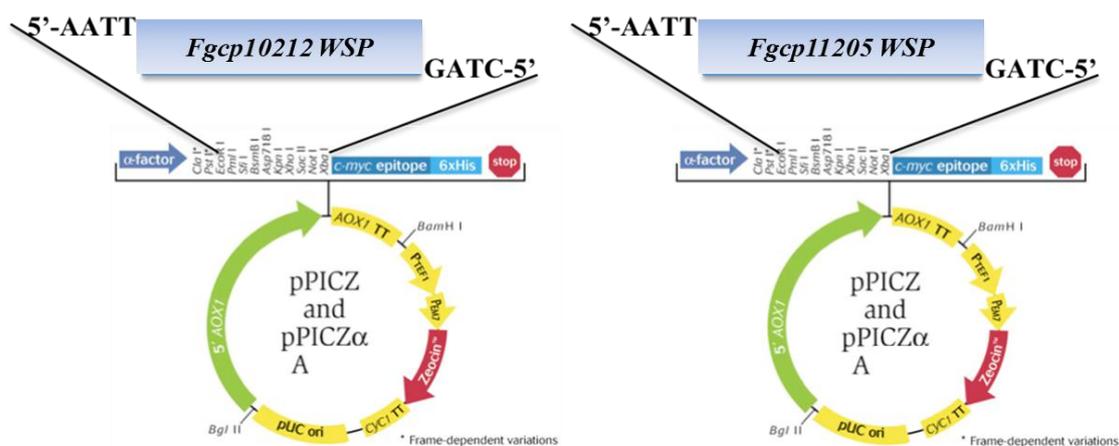


Figura 8. Integrazione degli inserti *Fgcp10212 WSP* e *Fgcp11205 WSP* nel vettore *pPICZαA* grazie alle estremità coesive generate dalla digestione con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *XbaI*.

Le reazioni di ligasi sono avvenute overnight a 4 °C e contenevano:

- 6 µl acqua sterile;
- 1 µl Ligation Buffer 10X (Promega);
- 1 µl vettore *pPICZαA* (35 ng);
- 1.5 µl inserto (15 ng);
- 0.5 µl T4 DNA ligasi (Promega) (1 U).

3.5.10 Trasformazione di cellule competenti di *E. coli* con i vettori *pPICZαA* ricombinanti

I prodotti di ligasi sono stati utilizzati per trasformare cellule competenti di *E. coli* ceppo DH5α come riportato nel paragrafo 3.3.7.

In questo caso, le cellule trasformate sono state selezionate nel terreno Low Salt LB (LBLS) (Invitrogen) (Tabella 14).

Tabella 14. Composizione del terreno colturale liquido LBLS.

Terreno	Composizione
Low Salt Luria Bertani (LBLS)	1% (w/v) triptone (Difco Laboratories); 0.5% (w/v) estratto di lievito (Fluka); 0.5% NaCl; 1.5% (w/v) Bacto-Agar (Difco Laboratories); pH 7.0

Al terreno sterilizzato in autoclave è stato successivamente aggiunto l'antibiotico zeocina (concentrazione finale 25 µg/ml) e il terreno è stato versato in piastre Petri. Una volta solidificato, 100 µl di cellule batteriche trasformate con i costrutti *pPICZαA + Fgcp10212 WSP* (*pPIC10212 WSP*) e *pPICZαA + Fgcp11205 WSP* (*pPIC11205 WSP*) sono stati piastrati e lasciati crescere a 37 °C per 16-18 ore.

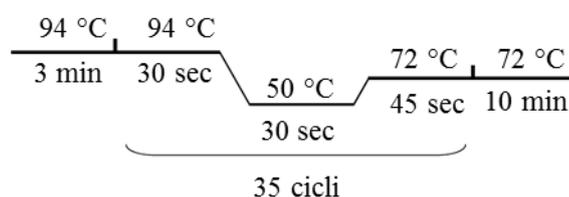
3.5.11 Screening mediante "Colony PCR" delle colonie di *E. coli* trasformate contenenti i vettori *pPICZαA* ricombinanti

Alcune colonie visibili su piastra, formatesi durante l'incubazione overnight a 37 °C, sono state testate mediante PCR per verificare la presenza dell'inserto. Per ogni colonia selezionata (10 colonie per *pPIC10212 WSP* e 10 per *pPIC11205 WSP*) è stata preparata una miscela di reazione contenente:

- 10 µl di REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl₂ (Sigma Aldrich);
- 1 µl di primer *pPICZαA* for (100 ng) (Tabella 13);
- 1 µl di primer *pPICZαA* rev (100 ng) (Tabella 13);

- 8 µl di acqua.

Le colonie di interesse sono state poi inoculate nelle miscele di PCR mediante un puntale sterile e sottoposte alle sottostanti condizioni di amplificazione per 35 cicli:



I prodotti PCR ottenuti sono stati separati su gel di agarosio 1% (w/v) per verificare la presenza di una banda di circa 400 bp nelle colonie correttamente trasformate con *pPIC10212 WSP* o *pPIC11205 WSP*. Da due colonie risultate positive dopo PCR è stato estratto il DNA plasmidico contenente i costrutti di interesse.

3.5.12 Estrazione e purificazione dei DNA plasmidici pPICZαA ricombinanti dai batteri trasformati

Per ottenere elevate quantità di DNA plasmidico le colonie trasformate di *E. coli* (*pPIC10212 WSP* N.3 / *pPIC11205 WSP* N.9) sono state fatte crescere overnight a 37 °C a circa 180 rpm in una beuta contenente 50 mL di LB liquido (Luria-Bertani) (Tabella 15).

Tabella 15. Composizione del terreno colturale liquido LB.

Terreno	Composizione
Luria-Bertani (LB)	1% (w/v) NaCl; 1% (w/v) Bacto triptone; 0.5% (w/v) estratto di lievito batterico

Dopo crescita o/n, il contenuto delle beute è stato trasferito in falcon separate e centrifugato per 10 minuti a 15.000 rpm. Dai pellet delle colonie batteriche sono stati quindi estratti i DNA plasmidici con il *GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit* (Sigma-Aldrich).

3.5.13 Linearizzazione, precipitazione e risospensione dei plasmidi pPICZαA ricombinanti

Per linearizzare i plasmidi ricombinanti e facilitare la trasformazione di *P. pastoris* si è analizzata la mappa di restrizione dei costrutti *pPIC10212 WSP* e *pPIC11205 WSP* con il programma DNAMAN (Lynnon Byosoft); l'enzima selezionato *SacI* è stato utilizzato in reazioni di digestione da 500 µl contenenti:

- 50 µl Buffer B 10x (Fermentas);
- 85-100 µl DNA plasmidico (5 µg);
- 3 µl *SacI* (Fermentas) (30 U);
- acqua sterile a volume.

Le digestioni sono state eseguite overnight alla temperatura di 37 °C.

Verificata tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (w/v) la corretta dimensione dei plasmidi digeriti, i DNA sono stati precipitati con un ugual volume di isopropanolo freddo. Dopo centrifugazione alla massima velocità (13,200 rpm) per 15 minuti i pellet sono stati risospesi in 10 µl di acqua sterile.

3.5.14 Preparazione di cellule competenti di *P. pastoris*

Per la preparazione delle cellule competenti di *P. pastoris* (ceppo wild-type), da utilizzare nella trasformazione, è stato utilizzato il protocollo *Pichia EasyComp* (Invitrogen). Cinquanta µl di cellule di *P. pastoris* sono state risospese in 10 ml di YPD liquido (Tabella 16) e incubate a 30 °C overnight a 150 rpm per indurne la crescita.

Tabella 16. Composizione del terreno colturale liquido YPD liquido.

Terreno	Composizione
Yeast Peptone Dextrose Medium (YPD)	1% (w/v) estratto di lievito; 2% (w/v) peptone; 2% (w/v) destrosio

Il giorno seguente la coltura è stata diluita in 100 ml di YPD per ottenere una densità ottica (OD₆₀₀) pari a 0.01 e fatta crescere overnight fino al raggiungimento di una densità ottica compresa tra 1.2 e 1.6. Al raggiungimento di questa OD, le cellule di lievito sono state centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti a 4 °C e il pellet risospeso in 100 ml di acqua sterile a 0 °C. Dopo tre successivi lavaggi con acqua a 0 °C, il pellet è stato risospeso in 4 ml di sorbitolo 1 M, ricentrifugato e risospeso i 1 ml di sorbitolo 1 M per un volume finale di circa 1.5 ml. Aliquote da 100 µl sono state conservate a -80 °C.

3.5.15 Trasformazione di *P. pastoris* per elettroporazione

La trasformazione delle cellule competenti di *P. pastoris* con il costrutto linearizzato è stata effettuata mediante elettroporazione, una tecnica che permette l'ingresso del DNA nelle cellule sottoponendo la miscela di DNA e cellule, contenuta in una cuvetta di plastica con due elettrodi di alluminio, ad una repentina scarica elettrica che aprendo i pori della membrana plasmatica favorisce l'entrata del DNA ricombinante.

Cinque µg di DNA linearizzato (*pPIC10212 WSP* e *pPIC11205 WSP*) sono stati aggiunti rispettivamente a due aliquote da 100 µl di cellule competenti scongelate in ghiaccio. Tali miscele sono state incubate in ghiaccio per 5 minuti e successivamente trasferite in una apposita cuvetta sterile pre-raffreddata (BTX Electroporation Cuvettes Plus™). Le cuvette sono state inserite nell'elettroporatore (BTX ECM® 630 Electroporation System) e si sono impostati i parametri dell'impulso elettrico a 1500 V e 400 Ω; dopo l'impulso elettrico (8,9 ms per *pPIC10212 WSP* e 8,3 per *pPIC11205 WSP*), alle cellule è stato immediatamente aggiunto 1 ml di sorbitolo 1 M freddo. Il contenuto delle cuvette è stato trasferito in falcon sterile da 15 ml e incubato a 30 °C per due ore (senza agitazione) per permettere alle cellule di sviluppare la resistenza alla zeocina.

Terminata l'incubazione si è centrifugato a 1500 rpm per 5 minuti e il pellet ottenuto è stato risospeso in 400 µl.

La selezione dei trasformati è avvenuta nel terreno YPDS (Yeast Peptone Dextrose) + Zeocina (Tabella 17).

Tabella 17. Composizione del terreno colturale solido YPDS (Yeast Peptone Dextrose) + Zeocina

Terreno	Composizione
Yeast Peptone Dextrose (YPDS) + Zeocina	1% (w/v) estratto di lievito (Fluka Analytical); 2% (w/v) peptone (Sigma); 2% (w/v) destrosio; 1M sorbitolo; 2% (w/v) Bacto-Agar (Difco Laboratories); Zeocina [100 µg/ml]

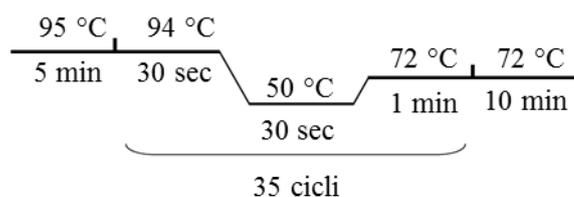
Il mezzo è stato versato in piastre Petri e lasciato solidificare. In ogni piastra sono stati piastrati 100 µl di cellule e si è incubato a 30 °C per 4-5 giorni.

3.5.16 Analisi mediante "Colony PCR" delle colonie trasformate di *P. pastoris*

Alcune colonie di *P. pastoris* cresciute in terreno contenente zeocina sono state testate per PCR con specifiche coppie di primers (Tabella 13), inoculando parte della colonia interessata nella miscela contenente:

- 10 µl REDTaq ReadyMix PCR Reation Mix 2X (Sigma-Aldrich);
- 8 µl acqua sterile;
- 1 µl primer *pPICZαA* for (100 ng) (Tabella 13);
- 1 µl primer *pPICZαA* rev (100 ng) (Tabella 13).

L'amplificazione degli inserti è stata eseguita ripetendo per 35 volte il seguente ciclo:



I prodotti PCR sono stati separati su gel di agarosio 1% (w/v) per valutare la dimensione degli amplificati.

3.5.17 Induzione dell'espressione in *P. pastoris*

Alcune colonie positive (*pPIC10212 WSP* N. 1, 2, 6 e *pPIC11205 WSP* N. 9, 10, 14) che mostravano la banda delle dimensioni attese (*Fgcp10212*: 366 bp; *Fgcp11205*: 372 bp) sono state cresciute e indotte secondo quanto riportato nel manuale *Pichia EasySelect™ Pichia Expression Kit* (Invitrogen Life Technologies).

Inizialmente le cellule trasformate sono state allevate in 5 ml di terreno BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*) (Invitrogen) (Tabella 18) a 28 °C in agitazione a 250 rpm.

Tabella 18. Composizione del terreno liquido colturale BMGY.

Terreno	Composizione
BMGY (<i>Buffered Glycerol-complex Medium</i>)	1% (w/v) estratto di lievito; 2% (w/v) peptone; 100 mM fosfato di potassio pH 6.0; 1.34% (w/v) "Yeast Nitrogen Base" con ammonio solfato e senza amminoacidi (YNB); 4 x 10 ⁻⁵ % biotina; 1% (v/v) glicerolo

Dopo 48 ore le cellule sono state centrifugate a 3000 rpm per 5 minuti ed il pellet risospeso in 20 ml di mezzo BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*) (Invitrogen) (Tabella 19).

Tabella 19. Composizione del terreno liquido colturale BMMY per l'induzione dell'espressione delle proteine espresse eterologamente in *P. pastoris*. Il vettore *pPICZαA* è dotato di un promotore metanolo inducibile *AOX1* al 5' (Figura 7).

Terreno	Composizione
BMMY (<i>Buffered Methanol-complex Medium</i>)	1% (w/v) estratto di lievito; 2% (w/v) peptone; 100 mM fosfato di potassio pH 6.0; 1.34% (w/v) "Yeast Nitrogen Base" con ammonio solfato e senza amminoacidi (YNB); 4 x 10 ⁻⁵ % biotina; 1% (v/v) metanolo

La coltura di lievito è stata incubata in agitazione a 200 rpm per 72 ore a 28 °C prestando attenzione a non superare i 30 °C, condizione che potrebbe inibire l'espressione della proteina ricombinante. Ogni 24 ore sono state aggiunte aliquote di metanolo in modo da mantenere nelle colture una concentrazione finale di 0.5% (v/v).

Dopo 72 ore le colture liquide sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente e i filtrati colturali sono stati recuperati.

3.5.18 Precipitazione delle cerato-platanine ricombinanti FgCP10212 e FgCP11205 (salting out)

I filtrati colturali delle colture di *P. pastoris* sono stati sottoposti a precipitazione con solfato ammonico 20% (w/v) sciolto in agitazione incubando per 1 h a 4 °C. Dopo centrifugazione a 8000 rpm per 20 minuti a 4 °C, i surnatanti recuperati sono stati nuovamente precipitati con solfato ammonico 80% (w/v), sciolto in agitazione, centrifugando alle stesse condizioni. I pellet sono stati risospesi in 20 ml di acqua mq e centrifugati a 5000 rpm per 10 minuti a 4 °C. I surnatanti recuperati sono stati sottoposti a dialisi in acqua (diluizione 1:100) overnight a 0 °C utilizzando membrane Nominal MWCO 3500 (Orange scientific). I surnatanti dializzati sono stati recuperati in falcon da 50 mL e conservati a -20 °C.

3.5.19 Analisi SDS-PAGE delle cerato-platanine ricombinanti FgCP10212 e FgCP11205

Per quantificare la concentrazione delle cerato-platanine ricombinanti, i surnatanti sono stati analizzati tramite gel di poliacrilamide (T=12%) utilizzando 3 concentrazioni di BSA come standard [200 ng, 600 ng, 1µg].

Aliquote di 1 µl, 5 µl e 10 µl di entrambi i campioni dializzati, portati a 10 µl con acqua, sono stati miscelati con un ugual volume di Sample Buffer 2X (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 10% (w/v), Blu di Bromofenolo 0.1% (w/v), glicerolo 10% (w/v), DTT 10 mg/ml), prima di essere incubati per 5 minuti a 95 °C e caricati su gel di poliacrilammide.

Dopo circa 50 minuti, al termine della corsa a 200 V costanti, il gel è stato sottoposto a colorazione con Coomassie Blu G250 (Sigma) come indicato nel protocollo del fornitore. Le bande ottenute sono state confrontate con 10 µl di marker Low Range (Biorad).

3.6 Elicitazione di risposte di difesa in foglie di *Arabidopsis thaliana* infiltrate con le CP ricombinanti di *F. graminearum*

3.6.1 Saggio per la rilevazione di perossido di idrogeno (H_2O_2) in foglie di *A. thaliana* infiltrate con le CP di *F. graminearum*

La generazione di perossido di idrogeno, una specie reattiva dell'ossigeno, è stata saggiata infiltrando ~100 ng/µl delle proteine FgCP10212 o FgCP11205 nella pagina

inferiore di foglie di piante di *A. thaliana* di quattro settimane di età. Le infiltrazioni sono state eseguite utilizzando siringhe da 1 ml senza ago. Come controllo le foglie di *A. thaliana* sono state infiltrate con H₂O o con tampone PBS 0.01X utilizzato per diluire le CP (PBS 1X: 8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.44 g/l Na₂HPO₄, 0.24 g/l KH₂PO₄, pH 7.4). La rilevazione del perossido di idrogeno è stata eseguita seguendo il protocollo di Frías et al. (2011) con alcune modifiche; in breve, dopo 24 h di incubazione, le foglie sono state tagliate e trattate con una soluzione contenente 1 mg/ml di DAB (3,3'-diaminobenzidina) (Sigma) pH 3.8 a 22 °C al buio overnight. Per la visualizzazione del DAB precipitato a causa della sua ossidazione da parte delle perossidasi di pianta prodotte per detossificare H₂O₂, i tessuti trattati sono stati incubati separatamente in una soluzione contenente acido acetico/glicerolo/etanolo (1:1:1 v/v/v) e bolliti per 5 minuti per eliminare la clorofilla. Successivamente, rimosse le soluzioni per la decolorazione, le foglie sono state fotografate e mantenute in glicerolo 60% (v/v).

3.6.2 Saggio per la rilevazione di sintomi di necrosi in foglie di A. thaliana infiltrate con le CP di F. graminearum

Le CP ricombinanti (~100 ng/μl) sono state infiltrate nella pagina inferiore di foglie di piante di *A. thaliana* mediante l'utilizzo di siringhe da 1 ml senza ago. Dopo infiltrazione le piante sono state riposte in cella a temperatura controllata (22-20 °C) con un fotoperiodo di 14 ore di luce. Lo sviluppo dei sintomi macroscopici di necrosi è stato monitorato da 4 a 10 giorni dopo infiltrazione. Come controllo alcune foglie di *Arabidopsis* sono state infiltrate con acqua o PBS 0.01X.

3.6.3 Estrazione di RNA da foglie di A. thaliana infiltrate con le CP ricombinanti e retrotrascrizione

Foglie di *A. thaliana* sono state infiltrate nella lamina inferiore mediante l'ausilio di siringhe senza ago con FgCP10212 o FgCP11205 (alla concentrazione di 50 ng/μl) e con H₂O o PBS 0.01X come controllo negativo. Le piante sono state incubate in cella a temperatura controllata (22-20 °C) con un fotoperiodo di 14 ore di luce e le foglie infiltrate sono state recuperate dopo 0, 24 e 48 ore dall'infiltrazione. Circa 200 mg di tessuto recuperati a tempi diversi sono stati utilizzati per estrarre l'RNA come riportato nel paragrafo 3.2.2. L'RNA estratto è stato quantificato e trattato con DNasi come riportato nei paragrafi 3.2.3 e 3.2.4.

La retrotrascrizione (RT) è stata eseguita in 40 µl totali utilizzando 750 ng di RNA e seguendo la procedura riportata nel paragrafo 3.2.4. I volumi dei reagenti aggiunti nei campioni è riportato di seguito.

Reagenti	0 h PBS	0 h CP10	0 h CP11	24 h PBS	24 h CP10	24 h CP11	48 h PBS	48 h CP10	48 h CP11
RNA trattato con DNasi	2.9 µl	2.3 µl	3.3 µl	6.6 µl	1.9 µl	2.8 µl	7.4 µl	3.02 µl	3.02 µl
Oligo dT (500 ng/µl)	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl
H ₂ O sterile	10.1µl	10.7µl	9.7µl	6.4µl	11.1µl	10.2µl	5.6µl	9.98µl	9.98µl

Reagenti	0 h PBS	0 h CP10	0 h CP11	24 h PBS	24 h CP10	24 h CP11	48 h PBS	48 h CP10	48 h CP11
Buffer 5X ImPromII (Promega)	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl
MgCl ₂ (da stock 25mM)	3.64 µl	3.9 µl	3.5 µl	2.16 µl	4.04 µl	3.68 µl	1.84 µl	3.6 µl	3.6 µl
dNTPs (da stock 10mM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
RT ImPromII (Promega)	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
H ₂ O sterile	9.86 µl	9.6 µl	10 µl	11.34 µl	9.46 µl	9.82 µl	11.66 µl	9.9 µl	9.9 µl

3.6.4 Analisi di espressione mediante qPCR dei geni PR1, PDF1.2 e UBQ di *A. thaliana* infiltrata con le CP ricombinanti

Il cDNA ottenuto è stato usato come stampo per la reazione di qPCR, eseguita come riportato nel paragrafo 3.2.5. Nella qPCR si sono utilizzati primers per l'amplificazione dei geni *PR1*, *PDF1.2* e *UBQ* (gene codificante ubiquitina, utilizzato come housekeeping in quanto espresso costitutivamente nei tessuti a prescindere dal trattamento) (Tabella 20).

Il ciclo qPCR è avvenuto alle seguenti condizioni:

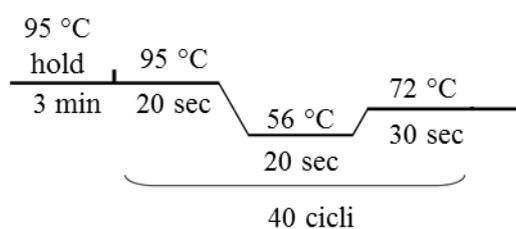


Tabella 20. Primers Forward e Reverse impiegati nella reazione qPCR per la quantificazione relativa dell'espressione dei geni PR1 e PDF1.2 di *A. thaliana* a seguito dell'infiltrazione di foglie con le cerato platanine ricombinanti FgCP10212 e FgCP11025 di *F. graminearum* e PBS 0.01X utilizzato come controllo negativo. Il gene costitutivo UBQ (codificante ubiquitina) è stato impiegato come gene di riferimento. I primers sono stati disegnati con il programma PRIMER 3 (<http://primer3.ut.ee/>). Ta (°C) indica la Temperatura di annealing utilizzata.

Nome gene	Sequenza 5'- 3'	Ta (°C)
PR1	ACTAAGAGGCAACTGCAGACTCAT	56
	ATGGCTTCTCGTTCACATAATTCC	
PDF1.2	GGGTTTGCGGAAACAGTAATG	56
	TGTAACAACAACGGGAAAATAAAG	
UBQ	GTGGTGCTAAGAAGAGGAAGA	56
	TCAAGCTTCAACTCCTTCTTT	

La quantificazione comparativa per la misura dell'espressione relativa è stata eseguita con il software Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH) fissando a 1 l'espressione relativa del gene housekeeping UBQ. La specificità dei prodotti di amplificazione è stata verificata tramite *Melting Analysis*.

4. RISULTATI

4.1 Le CP di *F. graminearum* appartengono a due gruppi distinti di sequenze “CP-like” fungine

4.1.1 Selezione dei geni di *F. graminearum* codificanti cerato-platanine (CP)

Consultando il “MIPS DATABASE” di *F. graminearum* sono stati individuati due putativi geni codificanti CP (*Fgcp10212* e *Fgcp11205*) (Tabella 21).

Tabella 21. Informazioni relative ai geni *Fgcp10212* e *Fgcp11205* di *F. graminearum* codificanti per putative cerato-platanine ricavati dal “MIPS DATABASE”. Entrambe le proteine presentano un’alta probabilità di secrezione (RC=1).

Cerato-platanina <i>Fgcp10212</i>	SnodProt1-like
Lunghezza gene	477 nt
Lunghezza proteina	139 aa
Punto isoelettrico	9.34
Peso molecolare	14.5 kDa
Sequenza nucleotidica	
ATGAAGTTCACTGGTATCCTCTCTGCTCTCGCTCTCACCTCCGCCGTCTCGGCCACCACTGGTAAGTTTCATCTGGATC TCTGATATCTCCTTCACTCAACTAACACACTATCTTCACTCTCCTACGACACTGGCTACGATGACAAGTCTCGCCCCAT GACCGCCGTCTCTTGCTCTGATGGCTCCAACGGTCTCATCACCAAGTACGGCTGGAAGACCCAGGGCAACATCCCCACC AAGTACATCGGTGGTGTCAACATCATCGCTGGCTGGAAGTCCCAACTGCGGTGGTTGCTACCGCCTCGAGTACAAGG GCCGCAAGATCAACGTCTTGGCCATCGACCACGCCGCTCTGGCTTCAACATTGGCCTCGATGCCATGAACGCCCTCAC TGGTGGCCAGGCTACCGCGCTCGGCCGTGTCAACGCCAGGTCTACCACGCTGACCCTTCTGCTTGTGGCTCAAGAAG TAA	
*introne	
Sequenza proteica	
MKFTGILSALALTSAVSATTVSYDTGYDDKSRPMTAVSCSDGSNGLITKYGWKTQGNIPTKYIGGVNI IAGWNSPNCGG CYRLEYKGRKINVLAI DHAASGFNIGLDAMNALTGGQATALGRVNAQVYHADPSACGLKK	
Cerato-platanina <i>Fgcp11205</i>	SnodProt1-like
Lunghezza gene	479 nt
Lunghezza proteina	140 aa
Punto isoelettrico	8.97
Peso molecolare	14.6 kDa
Sequenza nucleotidica	
ATGCAGCTGACCAACCTCTTCTGTCTCGCCAGTGTCTGACCTCCGTGTCAGCAATCACCGGTAATAACCAACCCCTCT CTCAATACAACCCCAACCCCGCTAACACTTGACCTCAGTATCCTACGACCCAGGCTATGGCGAAGCTGGCCGCGCCATG ACAGCCGTCTCCTGCTCCGATGGCACAACGGCCTCATCACGCGCTACGGCTGGAAGACTCAAGGCCAGATCCCCAAGT TTCCCTACATTGGCGGCGCGCAGGCCATCGCTGGCTGGAAGTCCCGGAGCTGCGGCACGTGCTGGAAGCTTACCTACAA GGGCAAGAGCATCAACGTCTTGGCCATCGACCACACTGCTGCGGGCTTCAACATTTCTCCCGCGCGATGAACGCTCTT ACCAACAACCCAGGCTTTCAGCTTGGTTCGGGTTGATGCGACTGCTACTCAGGTCGCTGTAGCAACTGTGGATTGAAGA AATAG	
*introne	
Sequenza proteica	
MQLTNLFCLASVLTSVSAITVSYDPGYGEAGRAMTAVSCSDGTNGLITRYGWKTQGQIPKFPYIGGAQAIAGWNSPSCG TCWKLTYKGSINVLAI DHTAAGFNI SPAAMNALTNNQAVQLGRVDATATQVAVSNCGLKK	

Le due sequenze hanno il 62.1% di identità nucleotidica (Figura 9) e il 61.4% di identità amminoacidica (Figura 10).

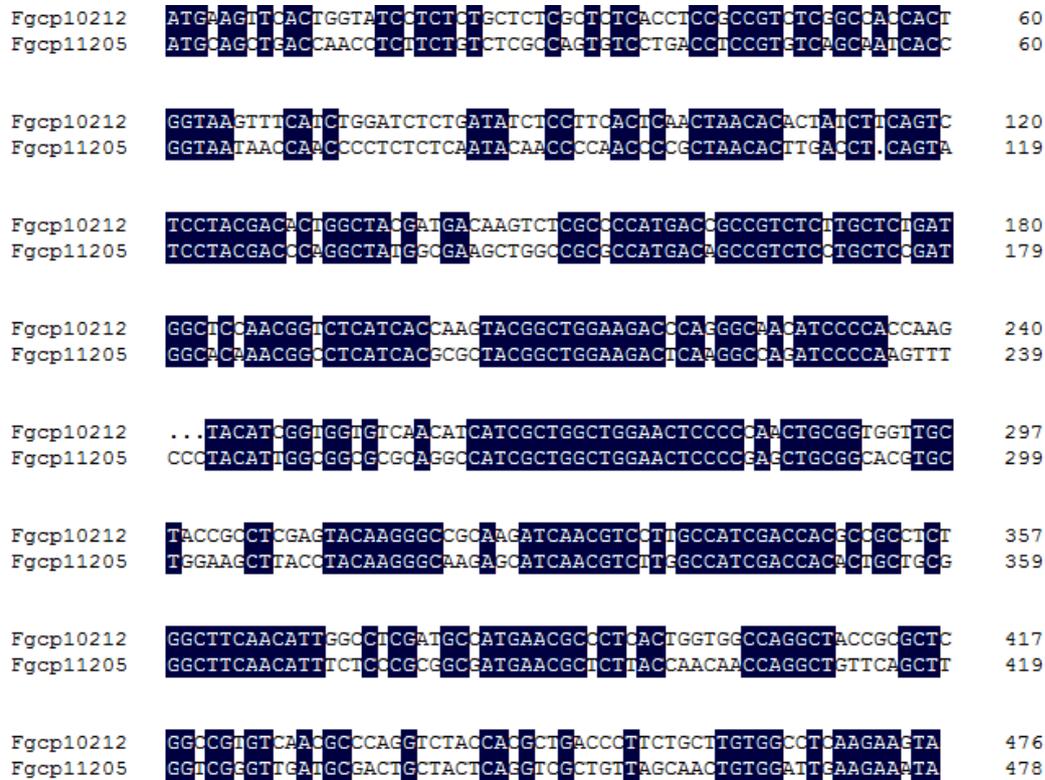


Figura 9. Allineamento delle sequenze nucleotidiche dei geni Fgcp10212 e Fgcp11205 di *F. graminearum*. L'identità tra le sequenze è del 62.1%. Le regioni evidenziate in blu indicano un'identità del 100% tra i nucleotidi allineati. Le due sequenze nucleotidiche sono state allineate con l'utilizzo del programma DNAMAN.

Le proteine mature FgCP10212 e FgCP11205 contengono 4 residui di cisteina conservati (Cys39-77 e Cys80-135) verosimilmente coinvolte nella formazione di due ponti disolfuro (Figura 10) e sono costituite dal 50% circa di residui idrofobici.

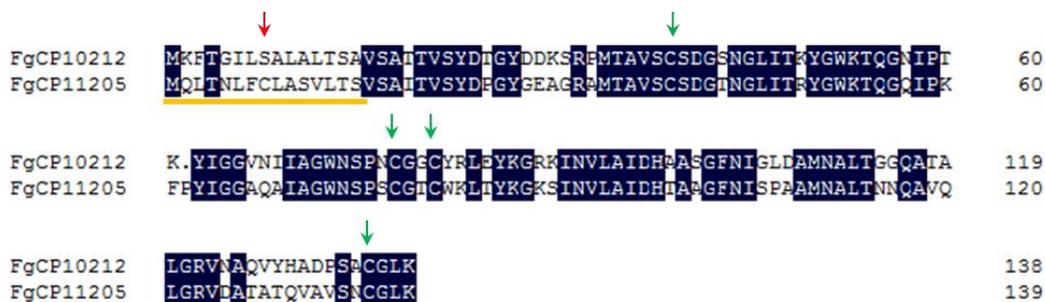


Figura 10. Allineamento delle sequenze amminoacidiche dedotte dai geni Fgcp10212 e Fgcp11205 di *F. graminearum*. L'omologia tra le sequenze è del 61.4%. Le regioni evidenziate in blu indicano un'omologia del 100% tra gli amminoacidi allineati. I putativi peptidi segnali all'N-termini, predetti con il programma SignalP (<http://expasy.org/tools>) (Tabella 10), sono indicati da una linea gialla sotto le sequenze. La

cerato-platanina FgCP10212 contiene 4 cisteine, mentre la cerato-platanina FgCP11205 contiene 5 cisteine, una delle quali nel peptide segnale. La posizione delle 4 cisteine conservate tra le due sequenze amminoacidiche sono indicate con frecce verdi, mentre la cisteina non conservata è indicata con una freccia rossa. Le due sequenze amminoacidiche sono state allineate con l'utilizzo del programma DNAMAN.

4.1.2 Creazione di un albero filogenetico di proteine "CP-like" fungine

Le sequenze amminoacidiche codificanti proteine "CP-like" di diverse specie fungine, incluse le due putative CP di *F. graminearum*, sono state utilizzate per costruire un albero filogenetico. Dall'analisi filogenetica è stato possibile ricavare che le due CP di *F. graminearum* (*Gibberella zeae* Snodprot-FG fgsg_10212, *Gibberella zeae* fgsg_11205) appartengono a due gruppi distinti e ristretti di sequenze (Figura 11). L'analisi filogenetica ha rivelato inoltre che la putativa FgCP10212 mostra un elevato livello di similarità con le "CP-like" di *Gibberella pulicaris*, *Neurospora crassa* e *Magnaporthe oryzae*. La putativa FgCP11205 mostra invece un elevato livello di similarità con le "CP-like" di *Trichoderma virens*, *Trichoderma asperellum*, *Hypocrea atroviridis* e *Trichoderma atroviride* (Figura 11).

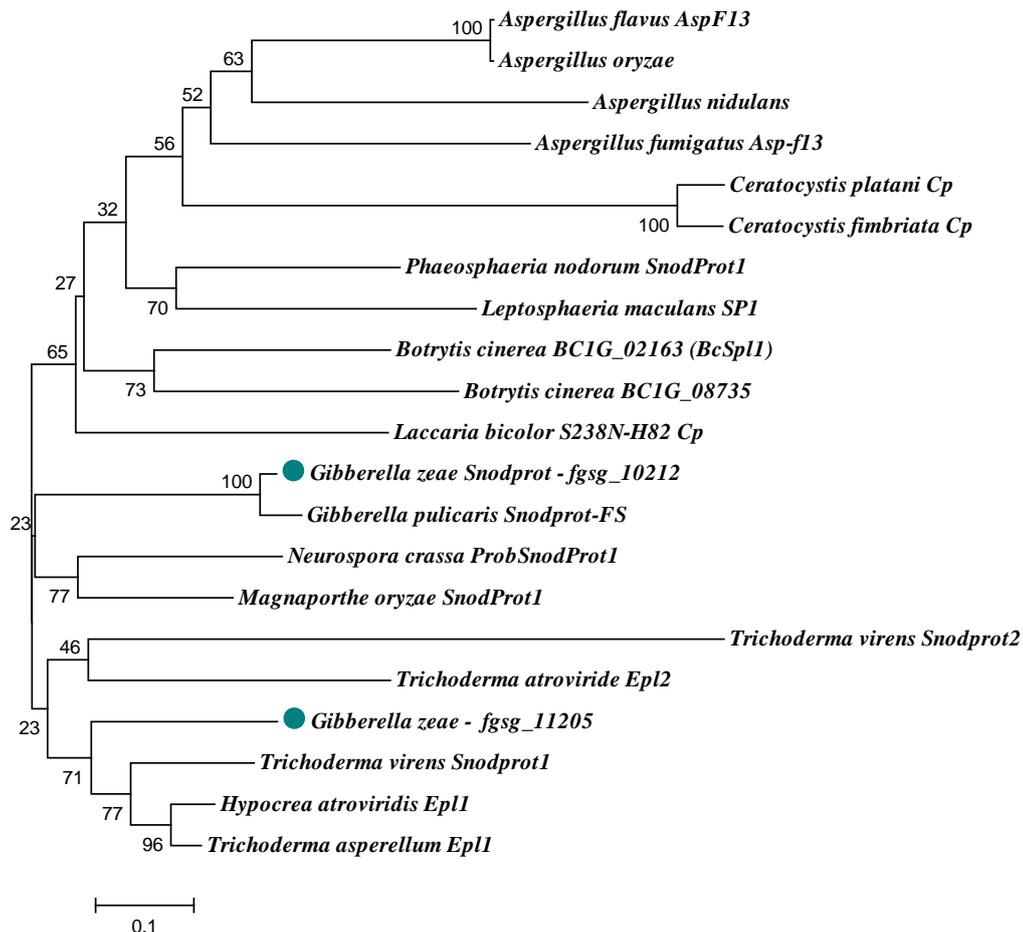


Figura 11. Albero filogenetico delle proteine "CP-like" di diverse specie fungine, incluse quelle (FgCP10212 e FgCP11205) di *F. graminearum*. L'albero filogenetico di Neighbor Joining è stato costruito

usando il programma CLASTALW nel software MEGA 5. Le proteine fungine utilizzate sono: *Gibberella zeae* Snodprot-FG fgsg_10212 (Q5PSV7), *Gibberella zeae* fgsg_11205 (Q4HV03), *Gibberella pulicaris* Snodprot-FS (Q5PSV6), *Ceratocystis fimbriata* Cp (AGQ22231.1), *Ceratocystis platani* Cp (Q8NJ53), *Neurospora crassa* ProbSnodProt1 (Q9C2Q5), *Phaeosphaeria nodorum* SnodProt1 (O74238), *Leptosphaeria maculans* SP1 (Q8J0U4), *Laccaria bicolor* S238N-H82 Cp (XP_001878469.1), *Magnaporthe oryzae* SnodProt1 (XP_003710181.1), *Aspergillus fumigatus* Af293 allergene Asp-f13 (O60022), *Aspergillus flavus* NRRL3357 allergenic Cp AspF13 (XP_002379583.1), *Aspergillus oryzae* (Q2UF42), *Aspergillus nidulans* (Q5AZK7), *Trichoderma virens* Snodprot1(Q1KHY4), *Trichoderma virens* Snodprot2 (Q1KHY3), *Hypocrea atroviridis* Epl1 (ABE73692.1), *Trichoderma atroviride* Epl2 (CAL80752.1), *Trichoderma asperellum* Epl1 (CAL80753.1), *Botrytis cinerea* BC1G_02163 BcSpl1(XP_001559499.1), *Botrytis cinerea* BC1G_08735 (XP_001552257.1). Tra parentesi sono riportati i rispettivi "accession number" ricavati dal database NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.2 Il gene *Fgcp10212* è l'unico espresso durante le prime fasi del processo infettivo

L'analisi di espressione dei geni *Fgcp10212* e *Fgcp11205* di *F. graminearum* è stata condotta mediante *Real-Time* PCR (qPCR) partendo da RNA estratto da spigchette di frumento raccolte a diversi tempi (24, 48 e 72 ore) dall'infezione con il fungo.

La quantificazione relativa dei livelli di espressione dei due geni durante l'infezione è stata ottenuta usando come gene costitutivo la β -tubulina (*Fgsg_06611*) del fungo. Mentre il trascritto del gene *Fgcp11205* non è stato rilevato nelle prime fasi del processo infettivo, il gene *Fgcp10212* è risultato trascritto già a 24 ore dall'infezione (hpi), con una induzione dell'espressione a 72 hpi (~0.6 volte il livello di espressione della tubulina, la cui espressione è stata fissata uguale a 1) (Figura 12).

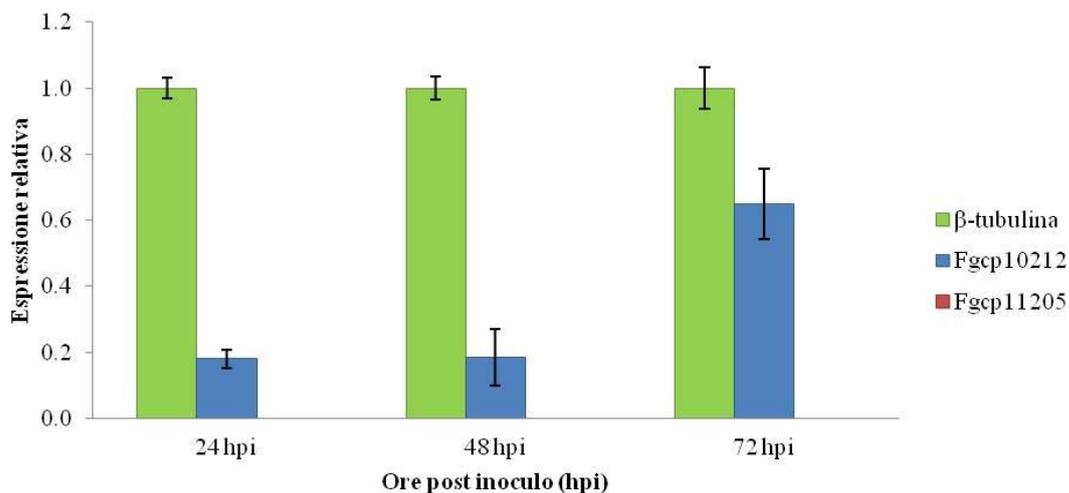


Figura 12. Quantificazione relativa tramite qPCR del livello di espressione dei geni *Fgcp10212* e *Fgcp11205* di *F. graminearum* in spigchette di frumento a 24, 48 e 72 ore dall'inoculo (hpi). Ogni trascritto è stato normalizzato con l'espressione del gene (*Fgsg_06611*) codificante la β -tubulina del fungo utilizzato come standard interno, la cui espressione è fissata =1. La misura dell'espressione relativa è stata eseguita con il software Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH). Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard di tre repliche.

4.3 Knock-out sito specifico del gene *Fgcp10212* di *F. graminearum*

4.3.1 Ottenimento del costrutto NESTED da utilizzare per il knock-out genico

Per favorire la ricombinazione omologa e quindi la delezione del gene *Fgcp10212*, le regioni a monte (UP) e a valle (DOWN) del gene di interesse sono state amplificate mediante PCR, utilizzando come stampo il DNA genomico di *F. graminearum* WT (ceppo 8/1) e specifiche coppie di primers (Tabella 2.1). La corretta dimensione dei due ampliconi, di lunghezza 890 e 1000 bp circa, è stata confermata con una corsa elettroforetica su gel di agarosio (Figura 13).

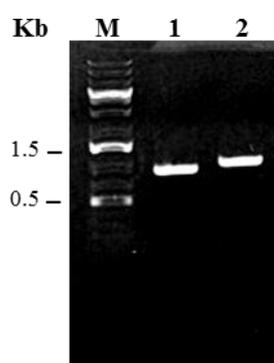


Figura 13. Corsa elettroforetica su gel agarosio 1% (w/v) degli ampliconi UP e DOWN del gene *Fgcp10212* amplificati con specifiche coppie di primers. **Corsia M:** 3 μ l marker *GeneRuler™* 1kb plus DNA Ladder (Fermentas); **corsia 1:** 10 μ L del prodotto di amplificazione *Fgcp10212* UP (890 bp); **corsia 2:** 10 μ L del prodotto di amplificazione *Fgcp10212* DOWN (985 bp).

Gli ampliconi UP e DOWN, la cui concentrazione è stata stimata (~30 ng/ μ l) mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio (dato non mostrato), sono stati fusi mediante PCR “fusion” con il gene marker Igromicina (*Hyg*), utilizzando come primers le code di 29 basi delle regioni UP e DOWN aggiunte impiegando per la loro amplificazione oligonucleotidi con adattatori. I prodotti “fusion” sono stati poi utilizzati come stampo in una reazione “NESTED-PCR”, impiegando specifiche coppie di primers (Tabella 2.2) ed eseguendo una “gradient PCR” con una temperatura di annealing variabile dai 52 ai 57 °C. La dimensione attesa dell’amplicone (NESTED *Fgcp10212*: 3460 bp) è stata confermata con una corsa elettroforetica su gel agarosio (Figura 14).

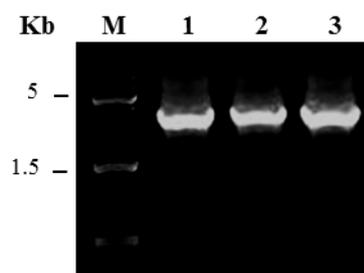


Figura 14. Corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (w/v) del prodotto di amplificazione NESTED *Fgcp10212* (~100 ng/ μ l). **Corsia M:** 3 μ l marker GeneRuler™1kb plus DNA Ladder (Fermentas); **corsia 1:** 7 μ l del prodotto NESTED *Fgcp10212* (Ta 56 °C); **corsia 2:** 7 μ l dell'amplicone NESTED *Fgcp10212* (Ta 54 °C); **corsia 3:** 7 μ l dell'amplicone NESTED *Fgcp10212* (Ta 52 °C).

Attraverso una reazione di ligasi il costrutto NESTED *Fgcp10212* è stato clonato nel vettore plasmidico *pGEM-T Easy* e il prodotto di ligazione è stato utilizzato per trasformare cellule competenti di *E. coli*. Sette colonie trasformate con il costrutto NESTED *Fgcp10212* sono state selezionate e testate mediante “COLONY PCR” per confermare l'avvenuta trasformazione. Due colonie su sette sono risultate correttamente trasformate (Figura 15).

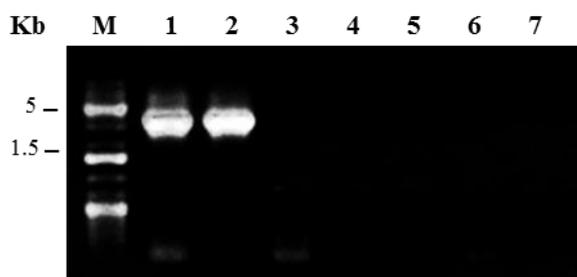


Figura 15. Visualizzazione su gel d'agarosio 1% (w/v) dei prodotti di amplificazione ottenuti mediante “COLONY PCR” utilizzando come stampo le colonie di *E. coli* trasformate, cresciute in mezzo selettivo contenente ampicillina. Per ogni reazione di PCR sono stati caricati 10 μ l. **Corsia M:** 3 μ l marker GeneRuler™1kb plus DNA Ladder (Fermentas); **corsie 1-7:** prodotti di amplificazione delle colonie 1-7 trasformate con il costrutto NESTED *Fgcp10212*.

Il DNA plasmidico contenente il costrutto NESTED *Fgcp10212* è stato estratto da una delle due colonie positivamente trasformate allevate in LB liquido contenente ampicillina. Vista l'assenza di enzimi di restrizione impiegabili per una corretta excisione, il costrutto NESTED *Fgcp10212* è stato ottenuto in quantità elevata mediante PCR utilizzando come stampo il DNA plasmidico contenente il costrutto. Una corsa elettroforetica su gel di agarosio ha permesso stimare la concentrazione del prodotto amplificato pari a ~100 ng/ μ l (Figura 16). Circa 10 μ g di costrutto NESTED

Fgcp10212 amplificato sono stati quindi precipitati, risospesi in 20 μ l di acqua sterile e utilizzati per trasformare i protoplasti del fungo *F. graminearum*.

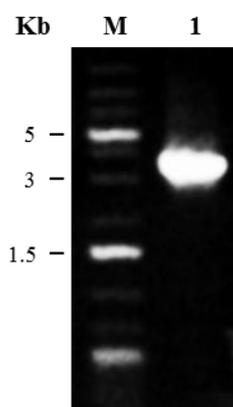


Figura 16. Corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (w/v) del prodotto di amplificazione corrispondente al costrutto NESTED *Fgcp10212*. **Corsia M:** 3 μ l marker *GeneRuler™1kb plus DNA Ladder* (Fermentas); **corsia 1:** 2 μ l di costrutto NESTED *Fgcp10212* amplificato dal vettore pGEM®-T Easy.

4.3.2 Selezione dei mutanti knock-out Δ FgCP10212 mediante PCR e Southern Blot

La trasformazione dei protoplasti di *F. graminearum* (ceppo 8/1) con il costrutto per la delezione del gene *Fgcp10212* ha consentito di ottenere 47 colonie fungine (denominate Δ 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 *Fgcp10212* e il gene *Fgcp11205*.

La visualizzazione degli amplificati su gel d'agarosio ha consentito di identificare dieci mutanti knock-out privi del gene *Fgcp10212* (Figure 17 e 18).

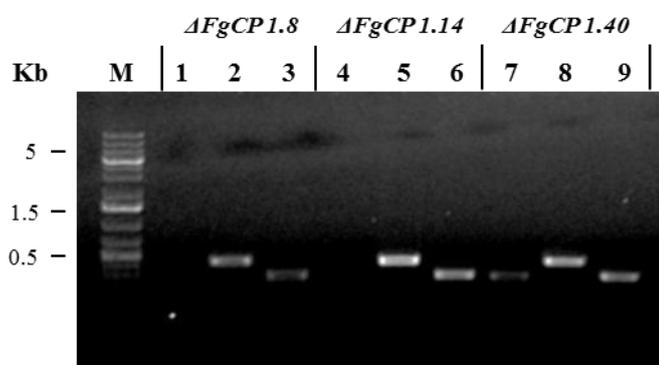


Figura 17. Corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (w/v) degli ampliconi ottenuti dalla PCR di screening di tre colonie fungine putativamente mutanti. **Corsia M:** marker *GeneRuler™1kb plus DNA ladder* (Fermentas); **corsie 1 – 3:** mutante Δ FgCP 1.8; **corsie 4 – 6:** Δ FgCP 1.14; **corsie 7 – 9:** Δ FgCP 1.40. Per ogni mutante sono stati analizzati nell'ordine i seguenti geni: *Fgcp10212*, *Hyg*, *Fgcp11205* e si sono caricati 10 μ l per ogni amplicone. Si nota l'assenza della banda del gene *Fgcp10212* nei mutanti Δ FgCP 1.8 e Δ FgCP 1.14.

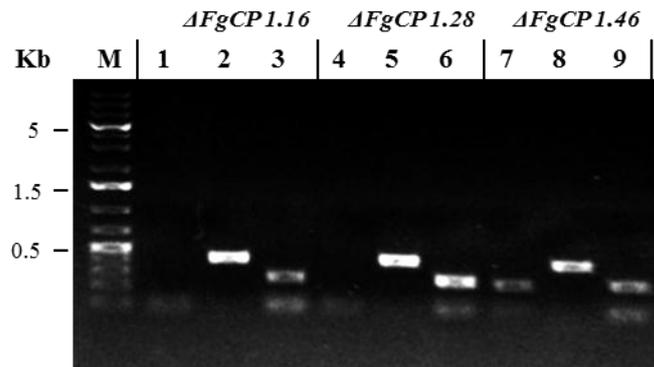


Figura 18. Corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (w/v) degli ampliconi ottenuti dalla PCR di screening di tre colonie fungine putativamente mutanti. **Corsia M:** marker GeneRuler™ 1kb plus DNA ladder (Fermentas); **corsie 1 – 3:** mutante $\Delta FgCP$ 1.16; **corsie 4 – 6:** mutante $\Delta FgCP$ 1.28; **corsie 7 – 9:** mutante $\Delta FgCP$ 1.46. Per ogni mutante sono stati analizzati nell'ordine i seguenti geni: Fgcp10212, Hyg e Fgcp11205 e si sono caricati 10 μ l per ogni amplicone. Si nota l'assenza della banda del gene Fgcp10212 nei mutanti $\Delta FgCP$ 1.16 e $\Delta FgCP$ 1.28.

L'assenza del gene *Fgcp10212* è stata inoltre verificata mediante analisi Southern Blot, che ha consentito inoltre di rilevare il numero di integrazioni del gene *Hyg* nel genoma delle colonie fungine mutanti. Il DNA genomico del ceppo WT e dei dieci mutanti identificati per PCR ($\Delta FgCP$ 1.8, $\Delta FgCP$ 1.14, $\Delta FgCP$ 1.16, $\Delta FgCP$ 1.19, $\Delta FgCP$ 1.20, $\Delta FgCP$ 1.28, $\Delta FgCP$ 1.30, $\Delta FgCP$ 1.43, $\Delta FgCP$ 1.44, $\Delta FgCP$ 1.47) sono stati quindi estratti e digeriti con l'enzima *VspI*. Una corsa elettroforetica su gel d'agarosio ha permesso di verificare la buona riuscita della reazione di digestione (Figura 19).

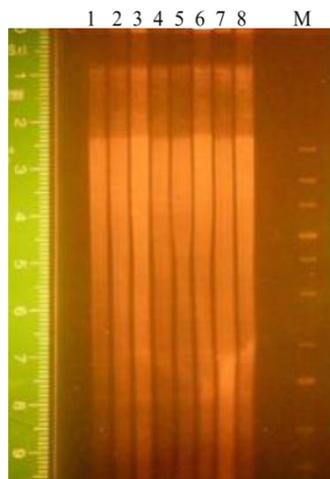


Figura 19. Elettroforesi su gel d'agarosio 1% (w/v) del DNA genomico estratto dai mutanti knock-out per il gene Fgcp10212 e digerito con *Vsp I*. **Corsia M:** marker GeneRuler™ 1kb plus DNA ladder (Fermentas); **corsia 1:** ceppo wild type di *F. graminearum*; **corsia 2:** mutante $\Delta FgCP$ 1.8; **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; **corsia 8:** mutante $\Delta FgCP$ 1.43.

Per l'analisi Southern Blot sono state utilizzate sonde specifiche per i geni *Fgcp10212* e *Hyg*. Utilizzando la sonda specifica per il gene *Fgcp10212* è stata confermata l'assenza del gene in tutti i 10 mutanti analizzati, in quanto solo il ceppo WT mostrava la banda di ibridazione nella posizione attesa di circa 5 Kb (Figura 20).

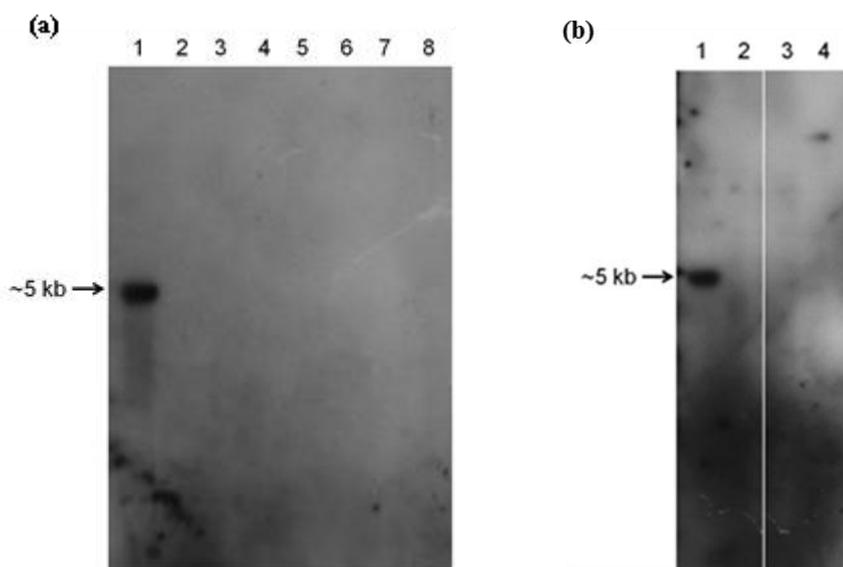


Figura 20. Lastre autoradiografiche ottenute dopo 30 minuti di esposizione ibridando il filtro con la sonda specifica per il gene *Fgcp10212*. In tutti i mutanti analizzati si può notare l'assenza della banda di ibridazione nella posizione attesa di circa 5 Kb, presente invece nel ceppo WT (corsia 1).

(a) **Corsia 1:** ceppo wild type; **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; **corsia 8:** mutante $\Delta FgCP$ 1.43.

(b) **Corsia 1:** ceppo wild type; **corsia 2:** mutante $\Delta FgCP$ 1.14; **corsia 3:** mutante $\Delta FgCP$ 1.44; **corsia 4:** mutante $\Delta FgCP$ 1.47.

Utilizzando la sonda specifica per il gene *Hyg* si è verificato che solo 5 dei 10 mutanti analizzati mostravano una banda di ibridazione nella posizione attesa di circa 6 Kb ($\Delta FgCP$ 1.8, $\Delta FgCP$ 1.14 e $\Delta FgCP$ 1.16, $\Delta FgCP$ 1.43 e $\Delta FgCP$ 1.44). Questi mutanti presentano tuttavia nel loro genoma almeno un'altra integrazione ectopica del costrutto (Figura 21).

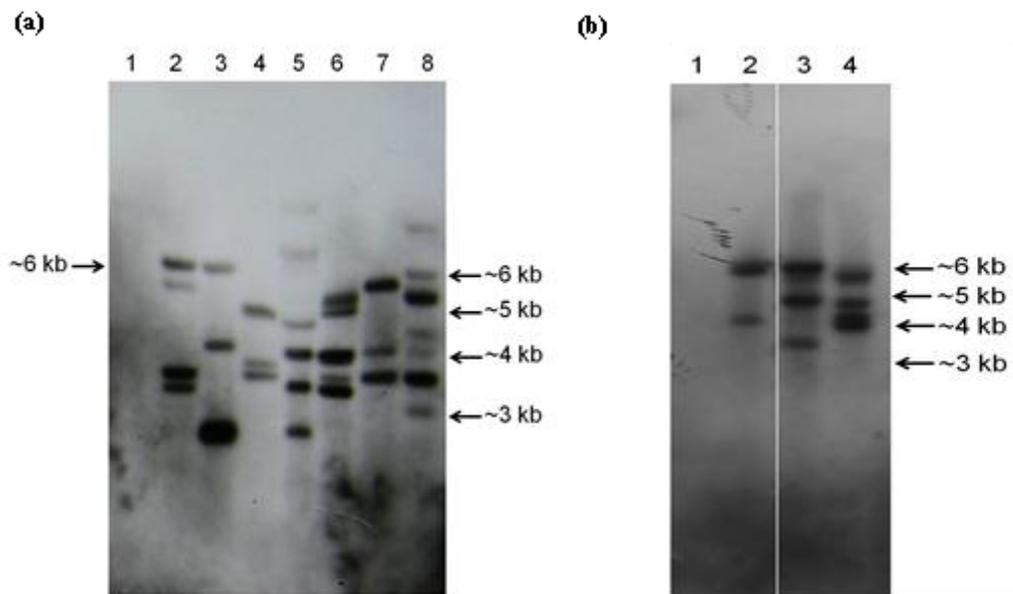


Figura 21. Lastre autoradiografiche ottenute dopo 30 minuti di esposizione ibridando il filtro con la sonda specifica per il gene Hyg.

(a) 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; **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 circa 6 Kb; 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.

(b) Corsia 1: ceppo wild type; **corsia 2:** mutante Δ FgCP 1.14; **corsia 3:** mutante Δ FgCP 1.44; **corsia 4:** mutante Δ FgCP 1.47. Nei mutanti Δ FgCP 1.14, Δ FgCP 1.44 (corsie 2- 3) 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. Nel mutante Δ FgCP 1.47 (corsia 4) si riscontrano varie integrazioni ectopiche, ma nessuna integrazione nella posizione attesa.

4.4 Virulenza dei mutanti Δ FgCP10212 su soia e frumento

4.4.1 Test di patogenicità su soia

Alcuni mutanti selezionati (Δ FgCP 1.14, Δ FgCP 1.16, Δ FgCP 1.44) sono stati inoculati su semi di soia per valutarne la virulenza (Figura 22). L'elaborazione dei dati di infezione mediante calcolo del "Disease index" a 6 dpi non ha messo in evidenza alcuna riduzione di virulenza dei mutanti rispetto al ceppo WT (Figura 23).

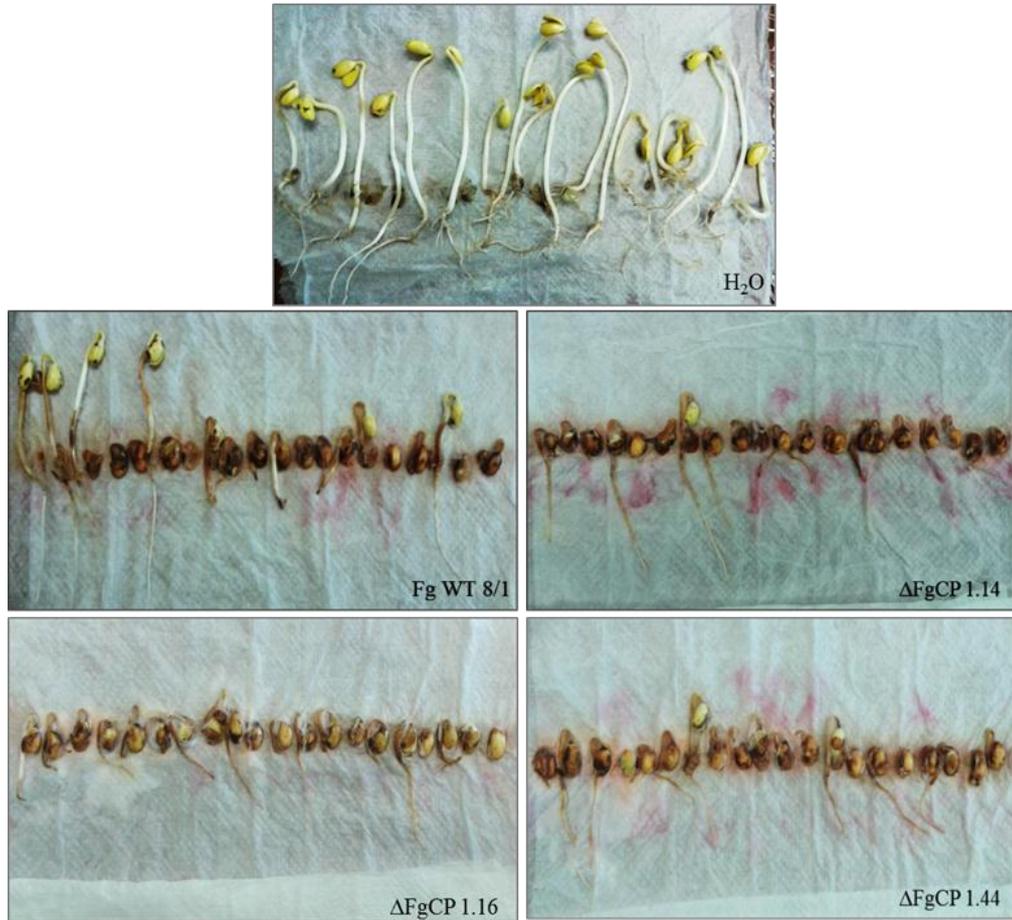


Figura 22. Test di patogenicità in soia eseguito con i mutanti fungini $\Delta FgCP$ 1.14, $\Delta FgCP$ 1.16, $\Delta FgCP$ 1.44 e col ceppo WT 8/1 di *F. graminearum* seguendo il protocollo “Rolled Towel” e utilizzando sospensioni conidiali pregerminate alla concentrazione di 4×10^5 conidi/ml. Il testimone è stato realizzato sostituendo la sospensione conidiale con acqua. La virulenza dei mutanti di *F. graminearum* è stata valutata dopo un’incubazione di 6 giorni al buio a 25°C.

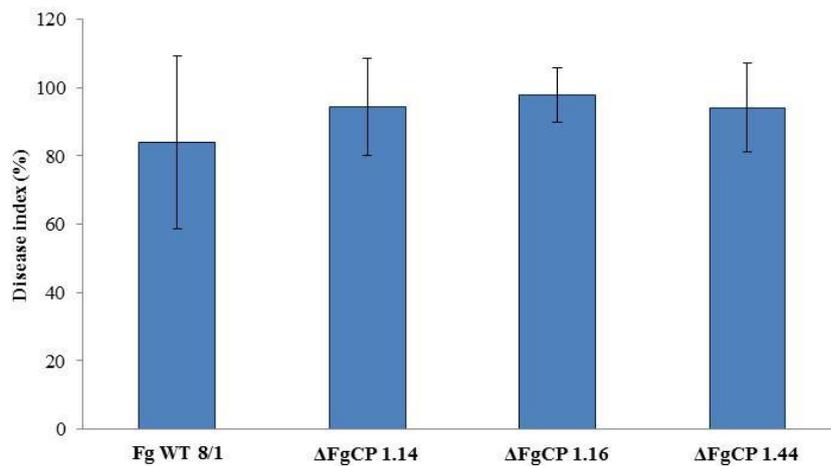


Figura 23. Risultati di un esperimento di inoculo di 20 semi di soia con 40000 conidi/semi. In ascissa la percentuale di “Disease index”. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard. L’esperimento è stato ripetuto 2 volte ottenendo gli stessi risultati.

4.4.2 Test di patogenicità su frumento

Le infezioni di spighe di frumento (*Triticum aestivum* cv. Bobwhite) sono state eseguite al momento dell'antesi con una sospensione conidiale del ceppo mutante Δ FgCP 1.14 e del ceppo WT e i sintomi sono stati valutati fino a 21 dpi. Il mutante Δ FgCP 1.14 ha mantenuto la capacità di infettare le spighe di frumento e non si è osservata alcuna riduzione di virulenza rispetto al WT (Figura 24).

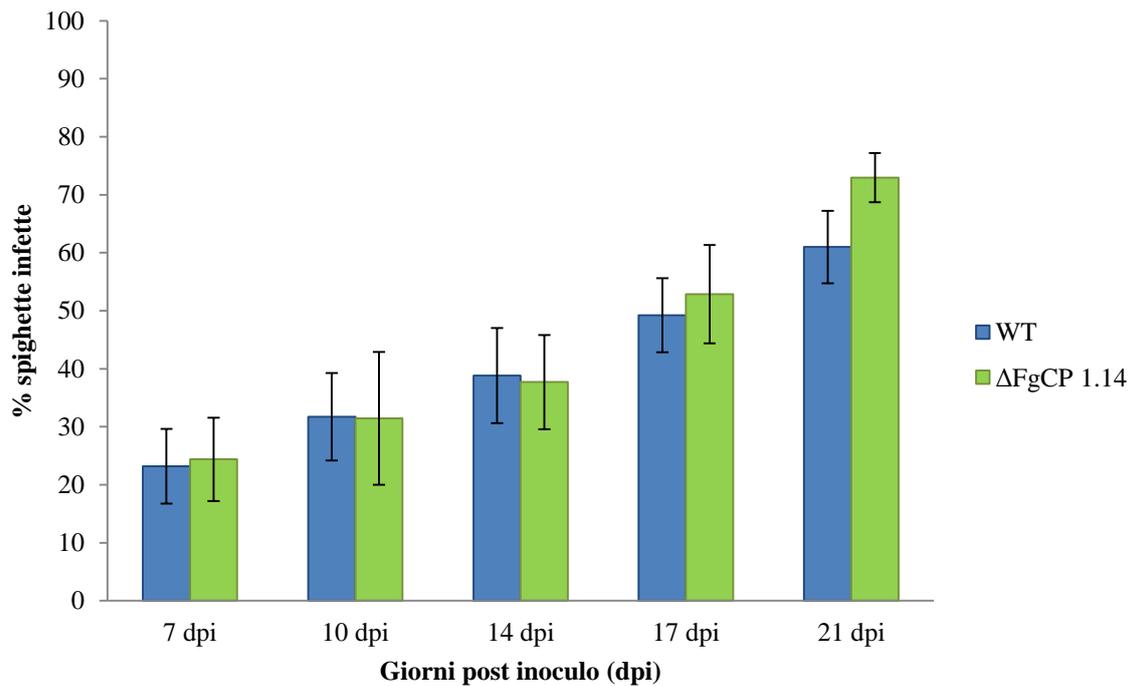


Figura 24. Inoculo di spighe di frumento (*Triticum aestivum* cv. Bobwhite) con *F. graminearum* WT (ceppo 8/1) e mutante Δ FgCP1.14. I sintomi di malattia sono stati valutati fino a 21 dpi contando il numero di spighe visibilmente sintomatiche. Le spighe infette sono state espresse come percentuale di spighe sintomatiche sul totale di spighe componenti la spiga. I dati rappresentano la media \pm errore standard (indicata dalle barre) di due esperimenti di infezione indipendenti eseguiti inoculando almeno 10 piante con 2000 conidi/ml in ciascun esperimento indipendente. In ordinata è riportata la % di spighe infette a vari giorni dall'inoculo(dpi).

4.5 Espressione eterologa delle cerato-platanine FgCP10212 e FgCP11205 di *F. graminearum*

4.5.1 Clonazione delle intere sequenze codificanti Fgcp10212 e Fgcp11205 nel vettore pGEM-T Easy

Le intere sequenze codificanti (ORF) le FgCP10212 e FgCP11205 sono state ottenute attraverso una reazione di RT-PCR utilizzando come stampo l'RNA estratto da spighe di frumento infette dopo 5 giorni dall'inoculo con *F. graminearum* WT. Mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio è stata confermata la corretta dimensione degli ampliconi (477 bp per il gene *Fgcp10212* e 479 bp per il gene *Fgcp11205*) (Figura 25).

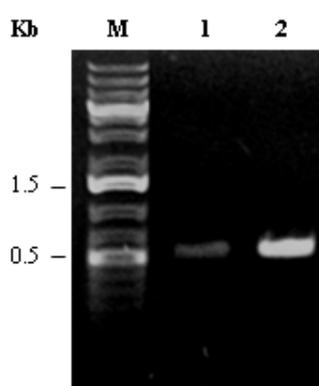


Figura 25. Analisi su gel d'agarosio (1%) dei prodotti di amplificazione corrispondenti alle intere ORF dei geni codificanti le CP prodotte da *F. graminearum* durante il processo infettivo. **Corsia M:** 3 μ l marker GeneRuler™1kb plus DNA Ladder (Fermentas); **corsia 1:** 10 μ l di prodotto di amplificazione ottenuto con la coppia di primers ORF fgsg_10212 forward/reverse (Tabella 9); **corsia 2:** 10 μ l di prodotto di amplificazione ottenuto con la coppia di primers ORF fgsg_11205 forward/reverse (Tabella 9).

Gli ampliconi corrispondenti alle intere ORF dei geni sono stati quantificati (Fgcp10212=10 ng/ μ l; Fgcp11205=25 ng/ μ l) mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio (dato non mostrato).

Per la reazione di ligasi nel vettore *pGEM-T Easy* sono stati utilizzati ~15 ng degli ampliconi purificati. I plasmidi ricombinanti ottenuti sono stati utilizzati per la trasformazione di cellule competenti di *E. coli*; 10 colonie trasformate con *Fgcp10212* ORF e 10 colonie trasformate con *Fgcp11205* ORF sono state selezionate e utilizzate in reazioni di "Colony PCR" per confermare l'avvenuta trasformazione. La presenza degli amplificati attesi in tutte le colonie selezionate è stata confermata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio (Figure 26a e 26b).

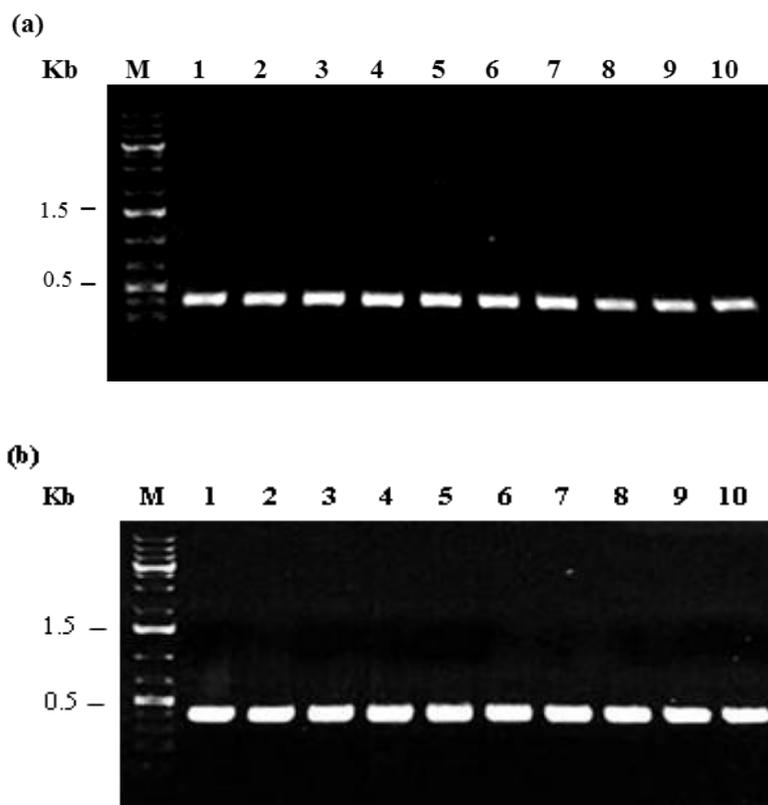


Figura 26. Visualizzazione su gel d'agarosio (1%) dei prodotti di amplificazione ottenuti mediante "COLONY PCR" dalle colonie di *E. coli* trasformate con i frammenti *Fgcp10212 ORF* e *Fgcp11205 ORF* e cresciute nel mezzo selettivo contenente ampicillina. Per ogni reazione di PCR sono stati caricati 10 μ l.
(a) Corsia M: 3 μ l marker *GeneRuler™1kb plus DNA Ladder* (Fermentas); **corsie 1-10:** prodotti di amplificazione delle colonie 1-10 trasformate con *Fgcp10212 ORF*.
(b) Corsia M: 3 μ l marker *GeneRuler™1kb plus DNA Ladder* (Fermentas); **corsie 1-10:** prodotti di amplificazione delle colonie 1-10 trasformate con *Fgcp11205 ORF*.

I DNA plasmidici di due colonie trasformate selezionate contenenti rispettivamente il gene *Fgcp10212 ORF* e *Fgcp11205 ORF* sono stati purificati e la loro concentrazione è stata stimata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio (*pGEM 10212 ORF* = 15 ng/ μ l; *pGEM 11205 ORF* = 25 ng/ μ l) (dato non mostrato).

Prima di eseguire il clonaggio nel vettore *pPICZ α A*, necessario per l'espressione eterologa in *P. pastoris* delle proteine di interesse, si è verificato che gli inserti non contenessero mutazioni non senso che potessero impedire l'ottenimento di proteine funzionali. La correttezza delle sequenze nucleotidiche clonate è stata ottenuta mediante sequenziamento dei DNA plasmidici ricombinanti (Figura 27). L'allineamento dei prodotti sequenziati con le rispettive sequenze nucleotidiche dei geni *Fgcp10212* e *Fgcp11205* ricavate dal "*F. graminearum MIPS DATABASE*" ha confermato la presenza di un singolo evento di *mismatch* nucleotidico in entrambe le sequenze.

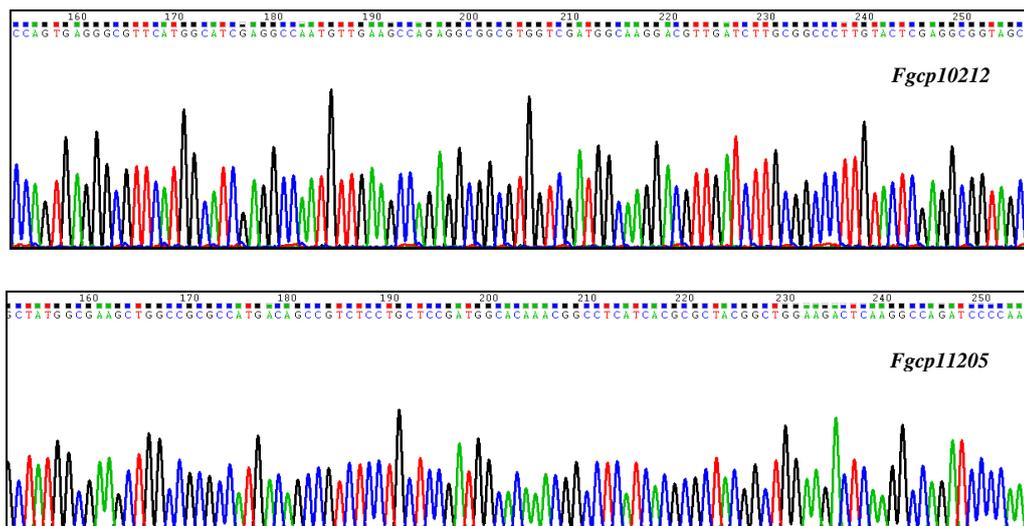


Figura 27. Porzione degli elettroferogrammi ottenuti dal sequenziamento nucleotidico dei DNA plasmidici pGEM[®]-T Easy contenenti le sequenze Fgcp10212 ORF e Fgcp11205 ORF.

In particolare, l'allineamento tra la sequenza nucleotidica del gene *Fgcp10212* ricavata dal database e quella sequenziata ha evidenziato un *mismatch* nucleotidico in posizione numero 160 (Figura 28).

Fgcp10212 database	ATGAAGTTCACTGGTATGCTCTCTGCTCTCGCTCTCACCTCCGCCGCTCTCGGCCACCACT	60
Fgcp10212 sequenziata	ATGAAGTTCACTGGTATGCTCTCTGCTCTCGCTCTCACCTCCGCCGCTCTCGGCCACCACT	60
Fgcp10212 database	GTCTCCTACGACACTGGCTACGATGACAAGTCTCGCCCCATGACCCGCCGCTCTTGTCTCT	120
Fgcp10212 sequenziata	GTCTCCTACGACACTGGCTACGATGACAAGTCTCGCCCCATGACCCGCCGCTCTTGTCTCT	120
Fgcp10212 database	GATGGCTCCAACGGTCTCATACCAAGTACGGCTGGAAG CCCAGGGCAACATCCCCACC	180
Fgcp10212 sequenziata	GATGGCTCCAACGGTCTCATACCAAGTACGGCTGGAAG CCCAGGGCAACATCCCCACC	180
Fgcp10212 database	AAGTACATCGGTGGTGTCAACATCATCGCTGGCTGGAAC TCCCCAACTGCGGTGGETTGC	240
Fgcp10212 sequenziata	AAGTACATCGGTGGTGTCAACATCATCGCTGGCTGGAAC TCCCCAACTGCGGTGGETTGC	240
Fgcp10212 database	TACCGCCTCGAGTACAAGGGCCGCAAGATCAACGTCCTTGCCATCGACCACGCCGCCTCT	300
Fgcp10212 sequenziata	TACCGCCTCGAGTACAAGGGCCGCAAGATCAACGTCCTTGCCATCGACCACGCCGCCTCT	300
Fgcp10212 database	GGCTTCAACATTGGCCTCGATGCCATGAACGCCCTCACTGGTGGCCAGGCTACCGCGCTC	360
Fgcp10212 sequenziata	GGCTTCAACATTGGCCTCGATGCCATGAACGCCCTCACTGGTGGCCAGGCTACCGCGCTC	360
Fgcp10212 database	GGCCGTGTCAACGCCAGGTCTACCACGCTGACCCITCTGCTTGTGGCCTCAAGAAGTA	419
Fgcp10212 sequenziata	GGCCGTGTCAACGCCAGGTCTACCACGCTGACCCITCTGCTTGTGGCCTCAAGAAGTA	419

Figura 28. Allineamento nucleotidico tra la sequenza del gene *Fgcp10212* ricavata dal MIPS DATABASE e la sequenza dedotta dopo sequenziamento Sanger.

Il successivo allineamento amminoacidico ha confermato un *mismatch* in posizione 54 (Figura 29).

FgCP10212 database	MRFTGILSALALTSAVSATTVSYDTGYDDKSREMTAVSCSDGSNGLITKYGWKIQGNIPT	60
FgCP10212 sequenziata	MRFTGILSALALTSAVSATTVSYDTGYDDKSREMTAVSCSDGSNGLITKYGWKIQGNIPT	60
FgCP10212 database	KYIGGVNIIAGWNSPNCGGCYRLEYKGRKINVLAIDHAASGFNIGLDAMNALTGGQATAL	120
FgCP10212 sequenziata	KYIGGVNIIAGWNSPNCGGCYRLEYKGRKINVLAIDHAASGFNIGLDAMNALTGGQATAL	120
FgCP10212 database	GRVNAQVYHADPSACGLK	138
FgCP10212 sequenziata	GRVNAQVYHADPSACGLK	138

Figura 29. Allineamento amminoacidico tra la sequenza del gene *Fgcp10212* ricavata da MIPS DATABASE e la sequenza dedotta dopo sequenziamento Sanger.

L'allineamento della sequenza nucleotidica del gene *Fgcp11205* ricavata dal database con quella sequenziata ha evidenziato un *mismatch* nucleotidico in posizione 412 (Figura 30), che ha prodotto un *mismatch* amminoacidico in posizione numero 138 (Figura 31).

Fgcp11205 database	ATGCAGCTGACCAACCTCTTCTGTCTCGCCAGTGTCTGACCTCCGTGTCAGCAATCACC	60
Fgcp11205 sequenziata	ATGCAGCTGACCAACCTCTTCTGTCTCGCCAGTGTCTGACCTCCGTGTCAGCAATCACC	60
Fgcp11205 database	GTATCCTACGACCCAGGCTATGGCGAAGCTGGCCGCGCCATGACAGCCGCTCCTCTGCTCC	120
Fgcp11205 sequenziata	GTATCCTACGACCCAGGCTATGGCGAAGCTGGCCGCGCCATGACAGCCGCTCCTCTGCTCC	120
Fgcp11205 database	GATGGCACAACGGCCCTCATCAGCGCTACGGCTGGAAGACTCAAGGCCAGATCCCCAAG	180
Fgcp11205 sequenziata	GATGGCACAACGGCCCTCATCAGCGCTACGGCTGGAAGACTCAAGGCCAGATCCCCAAG	180
Fgcp11205 database	TTTCCCTACATTGGCGGCGCGCAGGCCATCGCTGGCTGGAACTCCCCGAGCTGCGGCACG	240
Fgcp11205 sequenziata	TTTCCCTACATTGGCGGCGCGCAGGCCATCGCTGGCTGGAACTCCCCGAGCTGCGGCACG	240
Fgcp11205 database	TGCTGGAAGCTTACCTACAAGGGCAAGAGCATCAACGCTTTGGCCATCGACCACACTGCT	300
Fgcp11205 sequenziata	TGCTGGAAGCTTACCTACAAGGGCAAGAGCATCAACGCTTTGGCCATCGACCACACTGCT	300
Fgcp11205 database	GCGGGCTTCAACATTTCTCCCGCGCGATGAACGCTTTACCAACAACCCAGGCTGTTTCAG	360
Fgcp11205 sequenziata	GCGGGCTTCAACATTTCTCCCGCGCGATGAACGCTTTACCAACAACCCAGGCTGTTTCAG	360
Fgcp11205 database	CTTGGTCGGGTTGATGCGACTGCTACTCAGGTCGCTGTTAGCAACTGTGGAAATGAAGAAA	420
Fgcp11205 sequenziata	CTTGGTCGGGTTGATGCGACTGCTACTCAGGTCGCTGTTAGCAACTGTGGAAATGAAGAAA	420
Fgcp11205 database	TA	422
Fgcp11205 sequenziata	TA	422

Figura 30. Allineamento nucleotidico tra la sequenza del gene *Fgcp11205* ricavata da MIPS DATABASE e la sequenza dedotta dopo sequenziamento Sanger.

FgCP11205 database	MQLTNLFCLASVLTSSVAITVSYDPGYGEAGRAMTAVSCSDGTNGLITRYGWKTQGQIPK	60
FgCP11205 sequenziata	MQLTNLFCLASVLTSSVAITVSYDPGYGEAGRAMTAVSCSDGTNGLITRYGWKTQGQIPK	60
FgCP11205 database	FPYIGGAQAIAGWNSPSCGTCWKLTYYKGSINVLAIIDHTAAGFNISPAAMNALTNNQAVQ	120
FgCP11205 sequenziata	FPYIGGAQAIAGWNSPSCGTCWKLTYYKGSINVLAIIDHTAAGFNISPAAMNALTNNQAVQ	120
FgCP11205 database	LGRVDATATQVAVSNCGLK	139
FgCP11205 sequenziata	LGRVDATATQVAVSNCGLK	139

Figura 31. Allineamento amminoacidico tra la sequenza del gene *Fgcp11205* ricavata da MIPS DATABASE e la sequenza dedotta dopo sequenziamento Sanger.

4.5.2 Clonazione delle sequenze codificanti le proteine *FgCP10212* e *FgCP11205* senza peptide segnale nel vettore di espressione *pPICZ α A*

Le sequenze nucleotidiche *Fgcp10212* e *Fgcp11205* codificanti la proteina matura senza peptide segnale (*WSP*) (Figura 32 e Tabella 10) sono state ottenute mediante PCR impiegando specifiche coppie di primers con adattatori per il clonaggio nel vettore *pPICZ α A* (Tabella 11) e utilizzando come stampo i DNA plasmidici precedentemente sequenziati.

FgCP10212 WSP sequenziata	ITVSYDIIQYDDKSRREMTAVSCSDGNSGLITRYGWKTQGQIPK.YIGGVNIAGWNSPNC	59
FgCP11205 WSP sequenziata	ITVSYDEFGYGEAGREMTAVSCSDGTNGLITRYGWKTQGQIPK.FPYIGGAQAIAGWNSPSC	60
FgCP10212 WSP sequenziata	GCYRLEIYKGRKINVLAIIDHTAAGFNISGLDAMNALTGCQATALGRVNAQVYHADEPSCGL	119
FgCP11205 WSP sequenziata	GCWKLTYYKGSINVLAIIDHTAAGFNISPAAMNALTNNQAVQLGRVDATATQVAVSNCGL	120
FgCP10212 WSP sequenziata	K	120
FgCP11205 WSP sequenziata	K	121

Figura 32. Allineamento delle sequenze amminoacidiche *FgCP10212 WSP* e *FgCP11205 WSP* prive di peptide segnale da esprimere eterologamente in *P. pastoris* (identità amminoacidica del 64.8%).

I prodotti di amplificazione sono stati purificati e analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio (Figura 33) per verificare la dimensione attesa degli ampliconi (366 bp per *Fgcp10212 WSP* e 372 bp per *Fgcp11205 WSP*) e stimare la quantità di amplificato presente (Figure 31a e 31b).

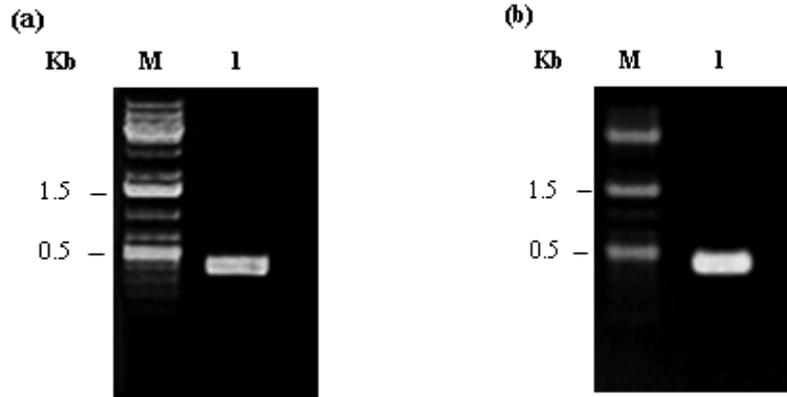


Figura 33. Corsa elettroforetica su gel d'agarosio (1%) per verificare la dimensione e stimare la concentrazione degli amplificati.

(a): corsia **M** = 3 μ l marker GeneRuler™1kb plus DNA Ladder (Fermentas); corsia **I** = 2 μ l di Fgcp10212 WSP amplificato con la coppia di primers pPICZ α A fgsg_10212 for/rev e purificato [30 ng/ μ l].

(b): corsia **M** = 3 μ l marker GeneRuler™1kb plus DNA Ladder (Fermentas); corsia **I** = 2 μ l di Fgcp11205 WSP amplificato con la coppia di primers pPICZ α A fgsg_11205 for/rev e purificato [40 ng/ μ l].

Cinquecento ng di ciascuno dei due inserti amplificati sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *XbaI* per ottenere estremità coesive ed effettuare il clonaggio nel vettore pPICZ α A, anch'esso linearizzato con gli stessi enzimi di restrizione. I prodotti digeriti e purificati sono stati quindi utilizzati in reazioni di ligasi con il vettore pPICZ α A linearizzato al fine di ottenere plasmidi ricombinanti (pPIC10212 WSP e pPIC11205 WSP). I plasmidi ricombinanti (Figura 34) sono stati utilizzati per trasformare cellule competenti di *E. coli*.

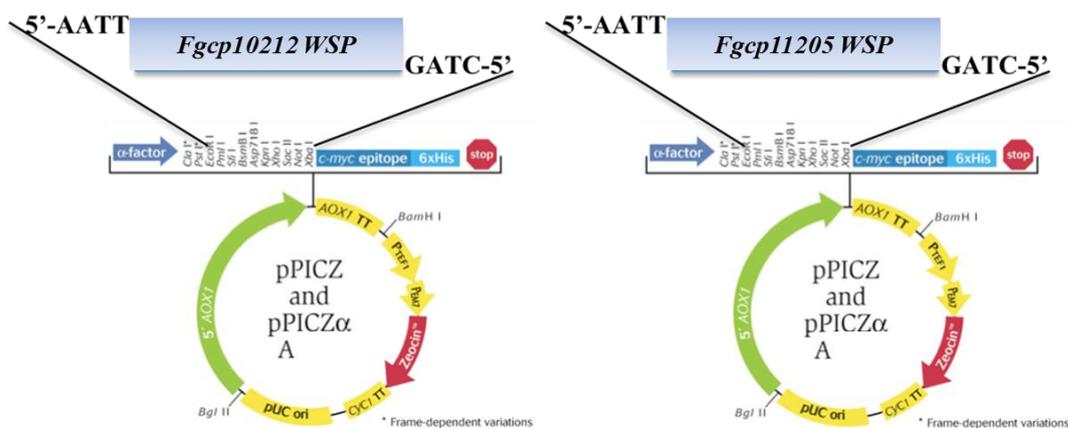


Figura 34. Vettori pPICZ α A (Invitrogen) con integrati i geni Fgcp10212 WSP e Fgcp11205 WSP, codificanti le cerato platanine di interesse, utilizzati per l'espressione eterologa in *P. pastoris*. Zeocina: fattore di selezione, AOX1: promotore alcool ossidasi, α -factor: fattore di secrezione.

Dalle piastre LB+Agar addizionate con l'antibiotico Zeocina sono state selezionate 10 colonie *pPIC10212 WSP* e 10 colonie *pPIC11205 WSP* successivamente testate mediante "Colony PCR" con l'utilizzo di coppie di primers specifici (Tabella 11). La corsa elettroforetica ha evidenziato la presenza degli amplificati dalla dimensione attesa (366 bp per *Fgcp10212 WSP* e 372 bp per *Fgcp11205 WSP*) in tutte le colonie selezionate (Figure 35a e 35b).

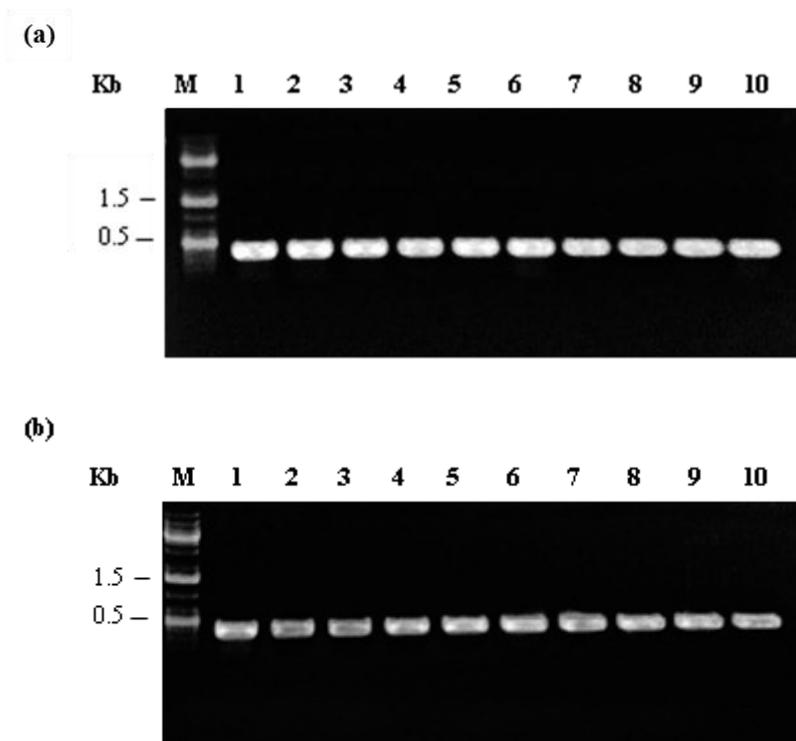


Figura 35. Visualizzazione su gel d'agarosio (1%) dei prodotti di amplificazione ottenuti mediante "COLONY PCR" utilizzando le coppie di primers *pPICZαA fgsg_10212 for/ rev* e *pPICZαA fgsg_11205 for/rev* (Tabella 11) e come stampo colonie di *E. coli* cresciute nel mezzo selettivo contenente zeocina. Per ogni reazione di PCR sono stati caricati 10 μ l.

(a) **Corsia M:** 3 μ l marker *GeneRuler™1kb plus DNA Ladder* (Fermentas); **corsie 1-10:** prodotti di amplificazione delle colonie 1-10 trasformate con il costrutto *pPIC10212 WSP*.

(b) **Corsia M:** 3 μ l marker *GeneRuler™1kb plus DNA Ladder* (Fermentas); **corsie 1-10:** prodotti di amplificazione delle colonie 1-10 trasformate con il costrutto *pPIC11205 WSP*.

Due colonie positive sono state selezionate per l'estrazione e la purificazione dei DNA plasmidici *pPIC10212 WSP* e *pPIC11205 WSP* da utilizzare per la trasformazione di *P. pastoris*. I DNA plasmidici sono stati quantificati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio (*pPIC10212 WSP*: 60 ng/ μ l; *pPIC11205 WSP*: 50 ng/ μ l, dati non mostrati). Cinque μ g dei due DNA plasmidici ricombinanti sono stati sottoposti a digestione con l'enzima di restrizione *SacI* per linearizzare i vettori *pPICZαA* ottenendo frammenti di

circa 4000 bp (Figura 36). La linearizzazione del costrutto è necessaria per facilitare la successiva integrazione nel genoma di *P. pastoris*.

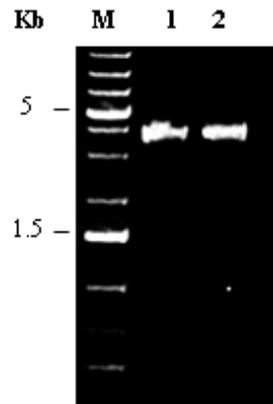


Figura 36. Corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1% per verificare le dimensioni dei vettori ricombinanti pPIC10212 WSP e pPIC11205 WSP linearizzati con *SacI*. **Corsia M:** 3 μ l marker GeneRuler™1kb plus DNA Ladder (Fermentas); **corsia 1:** 9 μ l di vettore pPIC10212 WSP digerito; **corsia 2:** 9 μ l di vettore pPIC11205 WSP digerito.

4.5.3 Trasformazione di *P. pastoris* e selezione delle colonie trasformate

La trasformazione di *P. pastoris* è stata ottenuta mediante elettroporazione. Le cellule di lievito sono state piastrate su piastre contenenti il terreno YPDS addizionato con l'antibiotico zeocina per selezionare cellule trasformate che hanno acquisito i vettori con i frammenti genici di interesse. Dopo 4 giorni di crescita a 30 °C, nelle piastre si sono sviluppate una trentina di colonie per entrambi i costrutti.

Per verificare l'integrazione dei costrutti nel genoma di *P. pastoris* è stata eseguita una "Colony PCR" di 5 colonie di lievito trasformate selezionate per entrambi i costrutti. Gli amplificati attesi di 366 bp per *Fgcp10212 WSP* e 372 bp per *Fgcp11205 WSP* sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio: tutti i dieci campioni hanno evidenziato una corretta amplificazione (Figure 37a e 37b).

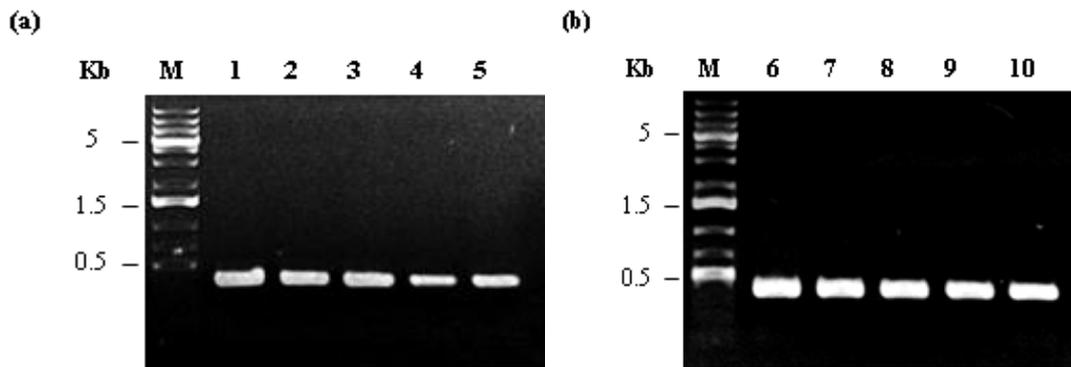


Figura 37. Ampliconi dei frammenti *Fgcp10212 WSP* e *Fgcp11205 WSP* ottenuti con le coppie di primers specifiche *pPICZαA fgsg_10212 for/rev* (Tabella 8) e *pPICZαA fgsg_11205 for/rev* (Tabella 8) dalle colonie di lievito trasformate e separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1%.

(a) in ogni pozzetto sono stati caricati 10 μ l di reazione PCR degli ampliconi del gene *Fgcp10212 WSP*. **Corsia M:** 3 μ l marker *GeneRuler™1kb plus DNA Ladder* (Fermentas); **corsie 1, 2, 3, 4, 5:** colonie *pPIC10212 WSP* n. 9, 14, 10, 1, 5.

(b) in ogni pozzetto sono stati caricati 10 μ l di reazione PCR degli ampliconi del gene *Fgcp11205 WSP*. **Corsia M:** 3 μ l marker *GeneRuler™1kb plus DNA Ladder* (Fermentas); **corsie 6, 7, 8, 9, 10:** colonie *pPIC11205 WSP* n. 6, 1, 2, 4, 7.

4.5.4 Produzione eterologa delle CP ricombinanti

La presenza delle proteine ricombinanti nel secretoma di *P. pastoris* è stata verificata sottoponendo ad analisi SDS-PAGE aliquote delle colture di alcune colonie ricombinanti (colonie n. 9, 10, 14 per il gene *Fgcp10212 WSP* e colonie n. 1, 2, 6 per il gene *Fgcp11205 WSP*) indotte con metanolo per 72 h.

In tutti i campioni analizzati si sono osservate bande corrispondenti a proteine con una massa molecolare compresa tra 14 e 22 kDa (Figure 38a e 38b). Poiché la massa molecolare attesa di FgCP10212 e FgCP11205 è di circa 14.5 kDa, probabilmente le proteine sono in forma glicosilata. Infatti entrambe le sequenze proteiche presentano un sito di O-glicosilazione, come predetto dai programmi NetNGlyc 1.0 e NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>). La concentrazione delle proteine ricombinanti è stata stabilita utilizzando, nella corsa elettroforetica, uno standard di BSA a concentrazione crescente [200 ng, 600 ng, 1 μ g]. In questo modo è stata stimata una concentrazione finale di circa 200 ng/ μ L per FgCP10212 e di circa 100 ng/ μ L per FgCP11205 (Figure 38a e 38b).

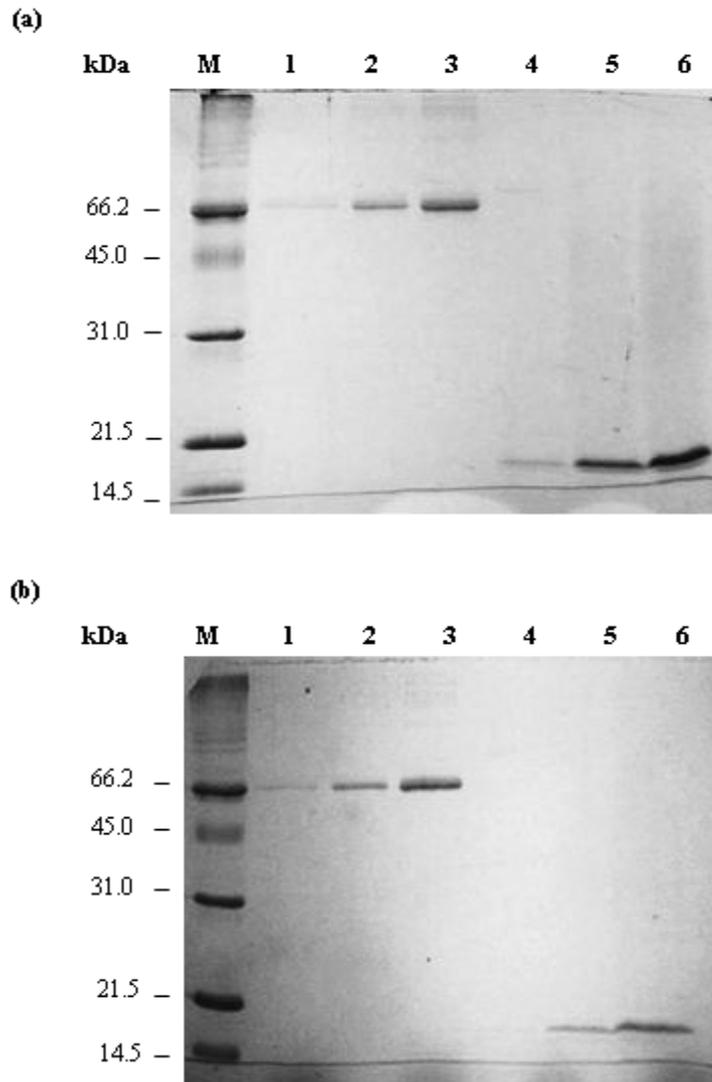


Figura 38. Profilo elettroforetico ottenuto mediante analisi SDS-PAGE dei filtrati colturali di due colonie positive di *P. pastoris* trasformate per esprimere FgCP10212 e FgCP11205 e allevate per 72 h in terreno contenente metanolo per indurre l'espressione proteica.

(a) **Corsia M:** 10 μ l di marker Low Range (Biorad); **corsia 1:** 200 ng di BSA; **corsia 2:** 600 ng di BSA; **corsia 3:** 1 μ g di BSA; **corsia 4:** 1 μ l di filtrato colturale; **corsia 5:** 5 μ l di filtrato colturale; **corsia 6:** 10 μ l di filtrato colturale.

(b) **Corsia M:** 10 μ l di marker Low Range (Biorad); **corsia 1:** 200 ng di BSA; **corsia 2:** 600 ng di BSA; **corsia 3:** 1 μ g di BSA; **corsia 4:** 1 μ l di filtrato colturale; **corsia 5:** 5 μ l di filtrato colturale; **corsie 6:** 10 μ l di filtrato colturale.

4.6 Le CP di *F. graminearum* inducono accumulo di acqua ossigenata, necrosi ed espressione di geni di difesa in *Arabidopsis thaliana*

4.6.1 Le CP ricombinanti inducono produzione di H_2O_2 in foglie di *A. thaliana*

Foglie di *A. thaliana* sono state infiltrate con FgCP10212 e FgCP11205 alla concentrazione di circa 100 ng/ μ l e con tampone PBS 0.01X e H_2O come controllo

negativo. Dopo 24 ore è stata saggiata la produzione di perossido di idrogeno (H_2O_2) con l'utilizzo di DAB. Nelle foglie infiltrate con entrambe le CP è stato osservato un incremento dell'area imbrunita in corrispondenza delle aree sottoposte all'infiltrazione (Figura 39), a dimostrazione dell'accumulo di H_2O_2 nei tessuti trattati. Viceversa non è stato osservato alcun precipitato nelle foglie infiltrate con tampone PBS e H_2O .

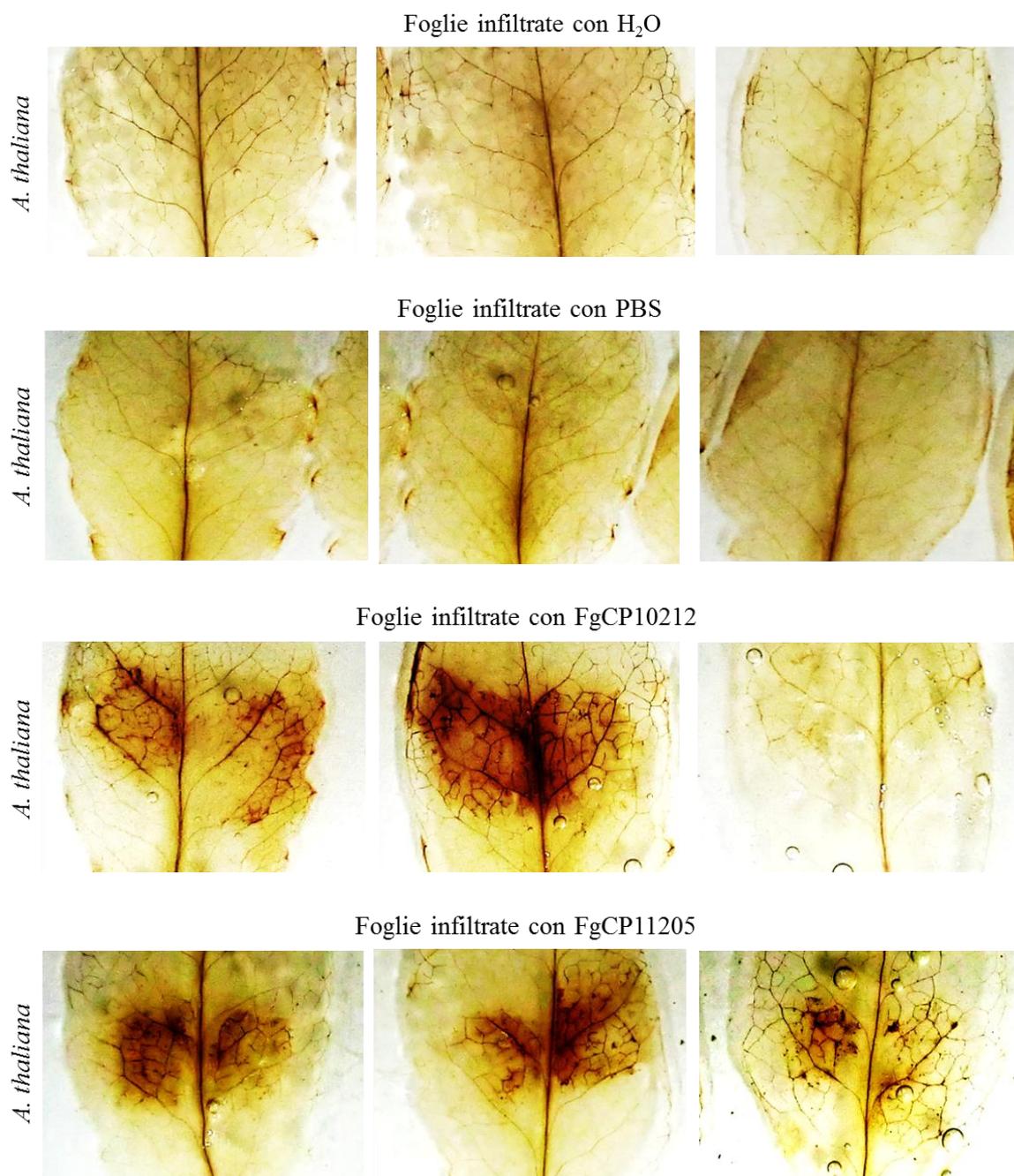


Figura 39. Induzione di perossido di idrogeno in foglie di *A. thaliana* infiltrate con le proteine FgCP10212 e FgCP11205 (~100 ng/ μ l) e con H_2O e tampone PBS 0.01X come controllo negativo. Dopo 24 h dall'infiltrazione le foglie sono state trattate con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) per rilevare la produzione di H_2O_2 nei tessuti trattati.

4.6.2 Le CP ricombinanti inducono sintomi di necrosi in foglie di *A. thaliana*

Alcune foglie di *A. thaliana* infiltrate con FgCP10212 e FgCP11205 (~100 ng/μl) e con tampone PBS 0.01X e H₂O come controllo sono state monitorate per 8-10 giorni: le foglie infiltrate con le CP mostravano sintomi necrotici macroscopici, mentre non si osservava alcun sintomo nelle foglie di controllo (Figura 40).

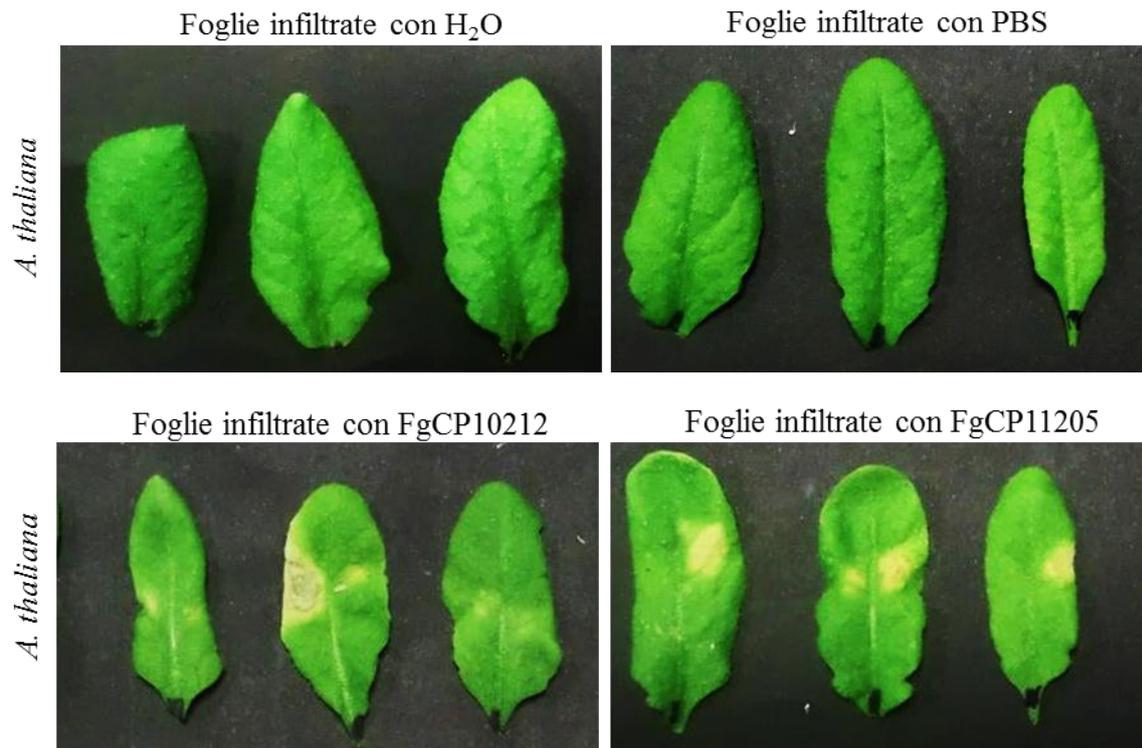


Figura 40. Induzione di necrosi in foglie di *A. thaliana* infiltrate con le CP ricombinanti di *F. graminearum*. Le foglie sono state infiltrate nella lamina inferiore con le proteine FgCP10212 e FgCP11205; H₂O e PBS 0.01X sono stati utilizzati per le infiltrazioni di controllo. Dopo circa 8-10 giorni dall'infiltrazione sono stati osservati sintomi macroscopici di necrosi e le foglie sono state fotografate.

4.6.3 Espressione dei geni *PR1* e *PDF1.2* in foglie di *A. thaliana* infiltrate con le CP ricombinanti

L'effetto del trattamento con le CP di *F. graminearum* su foglie di *A. thaliana* è stato caratterizzato inoltre misurando l'espressione relativa di geni di difesa *PR1*, una proteina di patogenesi considerata un marker della via difensiva mediata dall'acido salicilico, e *PDF1.2*, una difensina marker delle vie di difesa mediate da etilene e acido jasmonico.

A 24 h dall'infiltrazione con entrambe le CP ricombinanti si osserva una induzione dell'espressione di *PR1*, con valori di espressione relativa di 0.3-0.6 volte rispetto all'espressione del gene di riferimento ubiquitina (*UBQ*) fissata uguale a 1. Viceversa, l'infiltrazione con il tampone di controllo PBS non produce alcun effetto (Figura 41a). A 48 h dall'infiltrazione l'espressione di *PR1* aumenta fortemente nelle foglie trattate con le CP, con valori di espressione relativa pari a 2.6-4.3 volte rispetto a *UBQ*. A questo tempo il trattamento con il tampone di controllo PBS produce solo un lieve incremento dell'espressione di *PR1* (0.2 volte rispetto a *UBQ*) (Figura 41a).

In particolare, rispetto al controllo trattato con tampone PBS, l'espressione relativa di *PR1* nelle foglie trattate con le CP è ~6/11 volte maggiore dopo 24 h e ~14/22 volte dopo 48 h (Figura 42a).

Per quanto riguarda il gene *PDF1.2*, l'infiltrazione con il tampone di controllo PBS non modifica l'espressione del gene a tutti i tempi analizzati (Figura 41b). Al contrario, il trattamento con le CP ricombinanti determina una induzione dell'espressione di *PDF1.2* dopo 24 h (~0.025 volte rispetto al gene di riferimento *UBQ*); in particolare, a questo tempo l'espressione relativa di *PDF1.2* è ~10 volte maggiore nelle foglie trattate con le CP rispetto a quelle trattate con tampone PBS (Figura 42b). A differenza di *PR1*, l'espressione di *PDF1.2* cala drasticamente dopo 48 h tornando al valore basale misurato a 0 h (Figura 41b).

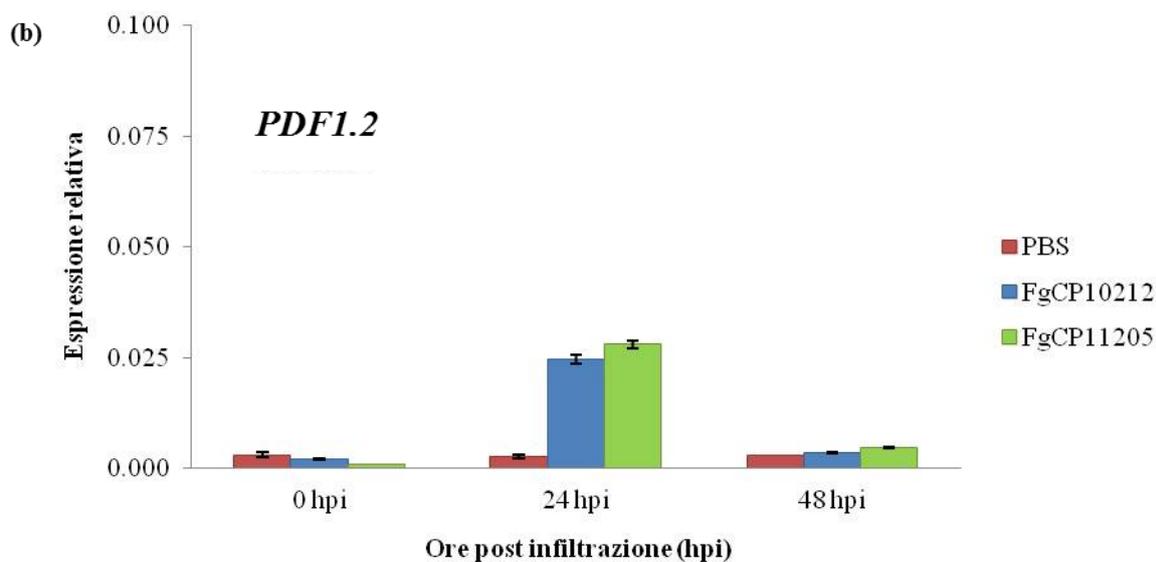
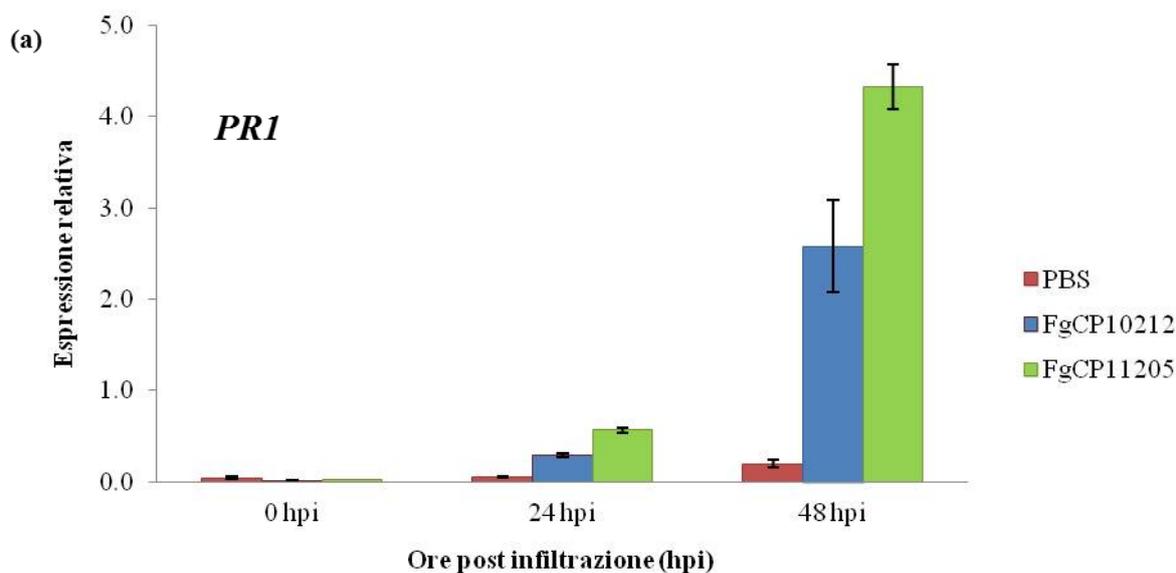


Figura 41. Quantificazione relativa tramite qPCR del livello di espressione dei geni PR1 e PDF1.2 in foglie di *A. thaliana* a 0, 24 e 48 ore dall'infiltrazione con FgCP10212, FgCP11205 e con il tampone PBS utilizzato come controllo negativo. Ogni trascritto è stato normalizzato con l'espressione del gene codificante l'ubiquitina (UBQ) utilizzato come standard interno, la cui espressione è fissata =1. La misura dell'espressione relativa è stata eseguita con il software Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH). Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard di tre repliche. (a) espressione relativa del gene PR1 a 0, 24 e 48 ore dal trattamento; (b) espressione relativa del gene PDF1.2 a 0, 24 e 48 ore dal trattamento.

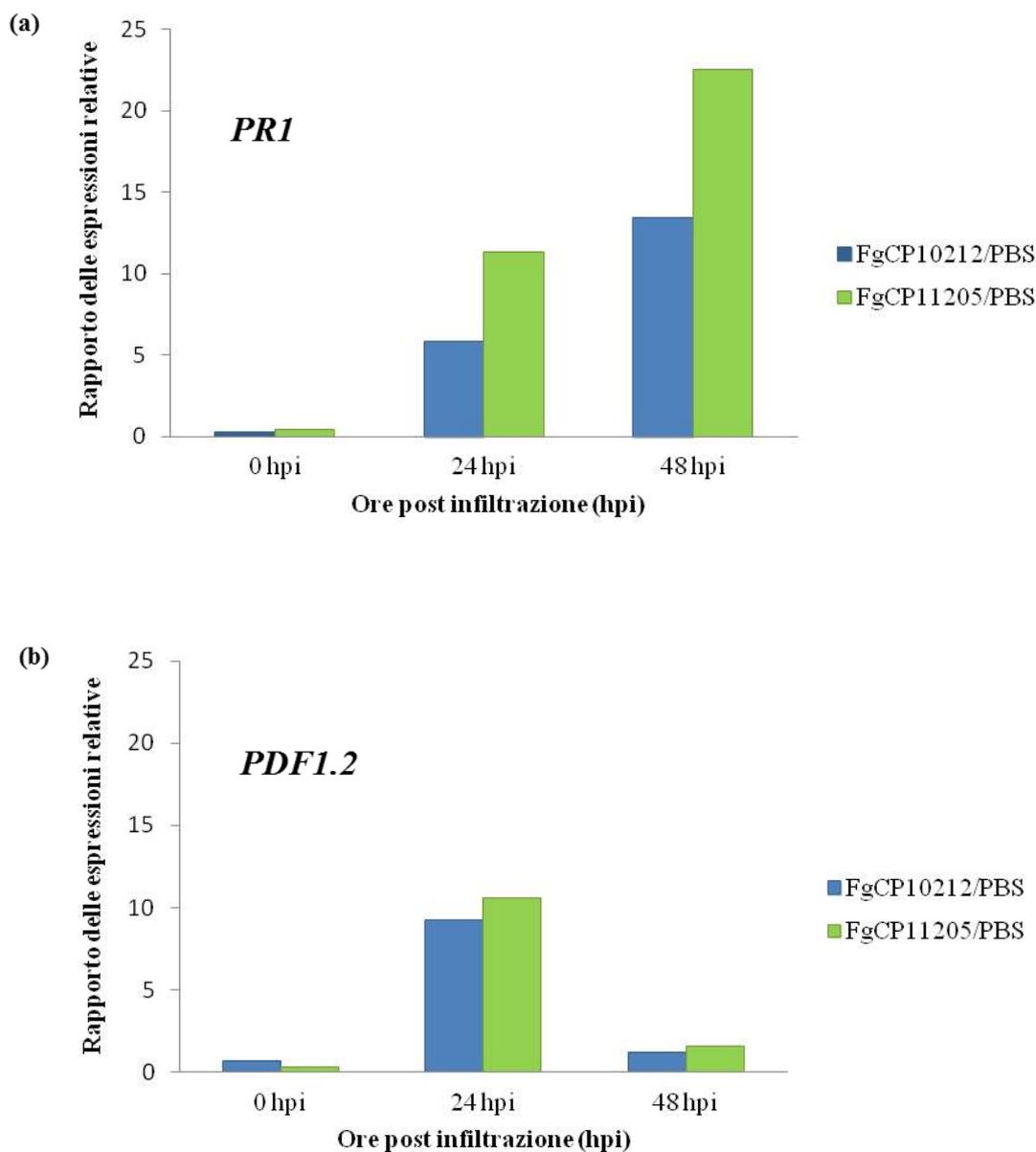


Figura 42. Rapporto delle espressioni relative dei geni PR1 e PDF1.2 in foglie di *A. thaliana* infiltrate con FgCP10212 e FgCP11205 rispetto alle espressioni relative dei due geni in foglie di *A. thaliana* infiltrate con il tampone PBS utilizzato come controllo negativo. La misura dell'espressione relativa a 0, 24 e 48 ore dai trattamenti è stata eseguita con il software Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH) normalizzando ogni trascritto con l'espressione dell'ubiquitina (UBQ) utilizzata come standard interno (espressione fissata =1). (a) rapporto delle espressioni relative del gene PR1 a 0, 24 e 48 ore dai trattamenti; (b) rapporto delle espressioni relative del gene PDF1.2 a 0, 24 e 48 ore dai trattamenti.

5. DISCUSSIONE

Nella presente tesi è stato caratterizzato il ruolo di due putative cerato-platanine (CP) di tipo SnodProt-like del fungo *F. graminearum* mediante due strategie parallele.

Una prima strategia è stata quella di produrre mutanti knock-out dell'unico gene codificante CP (*Fgcp10212*) risultato espresso durante le prime fasi dell'infezione (24-72 ore) di frumento al fine di verificarne la virulenza in piante ospiti.

Una seconda strategia è stata quella di esprimere eterologamente le CP del fungo con l'obiettivo di trattare tessuti di pianta e verificarne l'effetto.

I mutanti knock-out Δ FgCP10212 hanno mostrato un aspetto fenotipico e una virulenza comparabili al *wild-type* quando utilizzati in esperimenti di infezione di soia e spighe di frumento. La FgCP10212 non sembra quindi essere essenziale per la virulenza di *F. graminearum*, a differenza di quanto riscontrato con le CP di altri funghi fitopatogeni quali ad esempio *B. cinerea* (Frías et al., 2011) e *M. grisea* (Jeong et al., 2007). Tuttavia, l'assenza del gene *Fgcp10212* di *F. graminearum* potrebbe provocare nel mutante una sovra-espressione del secondo gene codificante CP (*Fgcp11205*), che compenserebbe l'assenza del gene deletato. Sarebbe quindi interessante in futuro creare un mutante knock-out deletato di entrambi i geni per confermare la dispensabilità delle due CP di *F. graminearum* per la virulenza del fungo.

Parallelamente si è voluto valutare se queste CP fossero in grado di indurre risposte difensive come osservato per le CP di altri funghi fitopatogeni quali ad esempio la proteina MgSM1 di *M. grisea* (Yang et al., 2009), la CP di *C. platani* (Lombardi et al., 2013) e la BcSPL1 di *B. cinerea* (Frías et al., 2011). Dopo essere state prodotte eterologamente nel lievito *P. pastoris*, le CP di *F. graminearum* sono state infiltrate nelle foglie della pianta modello *A. thaliana*. L'osservazione di sintomi di necrosi dopo alcuni giorni dal trattamento potrebbe indicare che queste CP inducono risposta ipersensibile nei tessuti vegetali contribuendo probabilmente alla fase necrotrofica del fungo e facilitandone il processo infettivo. Questa ipotesi è supportata dal fatto che il fungo necrotrofo *B. cinerea* utilizza questa strategia durante il processo infettivo (Frías et al., 2011) e *F. graminearum* è noto secernere altri fattori necrotizzanti quali la micotossina DON (Proctor et al., 1995; Bai et al., 2002; Desmond et al., 2008) e una endo-1,4- β -xilanasasi (Sella et al., 2013). Tuttavia mutanti del patogeno biotrofo *M. grisea* che non producono la CP MgSM1 sono stati dimostrati esibire una ridotta virulenza in riso (Jeong et al., 2007). La presenza quindi di geni codificanti cerato-platanine che svolgono un

ruolo nel processo infettivo anche in microorganismi fitopatogeni biotrofi mette in dubbio l'ipotesi precedente suggerendo l'esistenza di altri possibili ruoli delle CP.

L'infiltrazione delle CP ricombinanti di *F. graminearum* nelle foglie di *A. thaliana* ha inoltre indotto un accumulo di H₂O₂, una molecola chiave coinvolta nelle risposte di difesa, e l'espressione dei geni di difesa *PR1* e *PDF1.2*, legati rispettivamente alle vie difensive mediate da SA e JA/Et. Tuttavia, mentre l'espressione di *PR1* si induce a 24 hpi e aumenta a 48 hpi, l'espressione del gene *PDF1.2*, dopo un'iniziale induzione a 24 ore, cala drasticamente a 48 hpi riportandosi a livelli basali. Le CP sembrano quindi indurre principalmente la via di difesa mediata dal SA, in accordo con quanto osservato in tessuti di tabacco trattati con la BcSPL1 di *B. cinerea* (Frías et al., 2013) e in foglie di *A. thaliana* trattate con la CP di *C. platani* che determina una sovra-espressione delle vie di difesa mediate da SA ed Et e, una sotto-regolazione della via di difesa mediata da JA (Baccelli et al., 2014a). Una possibile spiegazione per l'iniziale induzione di *PDF1.2* a 24 ore e la sua successiva sotto-regolazione a 48 hpi potrebbe essere legata al noto antagonismo esistente tra le vie di difesa mediate da SA e JA (Penninckx et al., 1998; Zhang e Cai, 2005; Thaler et al., 2012).

Vista la capacità delle CP fungine di indurre l'accumulo di H₂O₂ e l'espressione di geni di difesa nei tessuti trattati, alcune CP sono state testate in esperimenti di induzione di resistenza contro funghi e altri agenti patogeni.

Ad esempio, la proteina SM1 di *T. virens*, oltre a elicitare risposte difensive quali produzione di H₂O₂ ed espressione di geni di difesa (Djonovic et al., 2006; Buensanteai et al., 2010), sembra indurre resistenza sistemica in cotone contro l'agente patogeno fogliare *Colletotrichum sp.* e attivare efficacemente protezione sistemica contro *C. graminicola* in mais (Djonovic et al., 2006; Djonovic et al., 2007; Vargas et al., 2008). La CP di *C. platani*, oltre a elicitare produzione di H₂O₂, induce rapida chiusura delle rime stomatiche, attivazione di una cascata MAP-chinasica, sovra-espressione di geni di difesa coinvolti nelle vie mediate da SA ed Et e biosintesi di fitoalessine (Baccelli et al., 2014a) ed è in grado di agire come induttore di resistenza in *A. thaliana* contro infezioni di *B. cinerea* e *Pseudomonas syringae pv. tomato* (Baccelli et al., 2014b). Inoltre, in un recente lavoro, la cerato-platanina MgSM1 di *M. grisea* è stata espressa in *A. thaliana thaliana* sotto controllo di un promotore inducibile; la sovra-espressione di geni di difesa (*PR1*, *PR5* e *PDF1.2*) e la conseguente attivazione della resistenza sistemica acquisita ha reso la pianta notevolmente più resistente a *M. grisea*. Questa resistenza si è rivelata essere efficace verso un ampio spettro di organismi patogeni quali *B. cinerea* e *P.*

syringae pv. *tomato* (Yang et al., 2009). Sebbene la resistenza di queste linee transgeniche sia aumentata, la salute generale della pianta è stata ridotta dalla produzione di ROS a seguito della risposta ipersensibile (Yang et al., 2009).

Poiché anche le CP di *F. graminearum* inducono H₂O₂ e attivazione della via di difesa mediata da SA, in futuro queste proteine ricombinanti potrebbero essere testate in piante modello e di interesse agrario quali *A. thaliana* e frumento per la loro capacità di agire come molecole induttrici di resistenza contro microrganismi patogeni.

6. BIBLIOGRAFIA

- **Bacelli I., Lombardi L., Luti S., Bernardi R., Picciarelli P., Scala A., Pazzagli L.** (2014a). Cerato-Platanin Induces Resistance in *Arabidopsis* Leaves through Stomatal Perception, Overexpression of Salicylic Acid- and Ethylene-Signalling Genes and Camalexin Biosynthesis. *PLOS ONE*, 9 (6): e100959. doi:10.1371/journal.pone.0100959.
- **Bacelli I., Luti S., Lombardi L., Comparini C., Bernardi R., Picciarelli P., Pazzagli L., Scala A.** (2014b). Investigation on the resistance-inducing ability of cerato-platanin on crops. Proceedings of the XX Annual Meeting of Italian Plant Pathology Society (SIPAV). Pisa, 22-24 september 2014.
- **Bai G.H., Desjardins A.E., Plattner R.D.** (2002). Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia*, 153: 91-98.
- **Bennici A., Calamassi R., Pazzagli L., Comparini C., Schiff S., Bovelli R., Mori B., Tani C., Scala A.** (2005). Cytological and ultrastructural responses of *Platanus acerifolia* (Ait.) Willd. leaves to ceratoplatanin, a protein from *Ceratocystis fimbriata f. sp. platani*. *Phytopathol Mediterr*, 44: 153–161.
- **Boddi S., Comparini C., Calamassi R., Pazzagli L., Cappugi G., Scala A.** (2004). Cerato-platanin protein is located in the cell walls of ascospores, conidia and hyphae of *Ceratocystis fimbriata f. sp. platani*. *FEMS Microbiology Letters*, 233: 341–346.
- **Boller T. e Felix G.** (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol*, 60: 379–406.
- **Boller T. e He S.Y.** (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, 324: 742–744.

- **Bouzarelou D., Billini M., Roumelioti K., Sophianopoulou V.** (2008). EglD, a putative endoglucanase, with an expansin like domain is localized in the conidial cell wall of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 45: 839–850.
- **Brotman Y., Briff E., Viterbo A., Chet I.** (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol*, 147: 779–789.
- **Buensanteai N., Mukherjee P.K., Horwitz B.A., Cheng C., Dangott L.J., Kenerley C.M.** (2010). Expression and purification of biologically active *Trichoderma virens* proteinaceous elicitor Sm1 in *Pichia pastoris*. *Protein Exp Purif*, 72: 131–138.
- **Cappellini G.A. e Peterson J.L.** (1965). Macroconidium formation in submerged cultures of a nonsporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia*, 57: 962-966.
- **Carresi L., Pantera B., Zoppi C., Cappugi G., Oliveira A.L., Pertinhez T.A., Spisni A., Scala A., Pazzagli L.** (2006). Cerato-platanin, a phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata*: expression in *Pichia pastoris*, purification and characterization. *Protein Exp Purif*, 49: 159–167.
- **Caselli A., Chiarugi P., Camici G., Manao G., Ramponi G.** (1995). *In vivo* inactivation of phosphotyrosine protein phosphatases by nitric oxide. *FEBS Lett*, 374: 249–252.
- **Desmond O.J., Manners J.M., Stephens A.E., Maclean D.J., Schenk P.M., Gardiner D.M., Munn A., Kazan K.** (2008). The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Mol Plant Pathol*, 9: 435–445.
- **Djonovic S., Pozo M.J., Dagott L., Howell C., Kenerley C.** (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces

plant defense responses and systemic resistance. *Mol Plant–Microbe Interact*, 19: 838–853.

- **Djonovic S., Vargas W.A., Kolomiets M.V., Horndeski M., Wiest A., Kenerley C.M.** (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiol*, 145: 875–889.
- **Dodds P.N. e Rathjen J.P.** (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat Rev Genet*, 11: 539–548.
- **Durrant W.E. e Dong X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*, 42: 185–209.
- **Ebbole D.J.** (1997). Hydrophobins and fungal infection of plant and animals. *Trends Microbiol*, 5: 405–408.
- **Ellis M.L., Broders K.D., Paul P.A., Dorrance A.E.** (2011). Infection of soybean seed by *Fusarium graminearum* and effect of seed treatments on disease under controlled conditions. *Plant Dis*, 95: 401–407.
- **Felix G., Duran J.D., Volko S., Boller T.** (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J*, 18: 265–276.
- **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. *J Plant Pathol*, 90: 295–306.
- **Frías 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 Phytol*, 192: 483–495.

- **Frías M., Brito N., Gonzalez C.** (2013). The *Botrytis cinerea* cerato-platanin BcSpl1 is a potent inducer of systemic acquired resistance (SAR) in tobacco and generates a wave of salicylic acid expanding from the site of application. *Mol Plant Pathol*, 14: 191–196.
- **Gaupels F., Kuruthukulangarakoola G.T., Durner J.** (2011). Upstream and downstream signals of nitric oxide in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol*, 14: 707–714.
- **Goswami R.S. e Kistler H.C.** (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol*, 5: 515–525.
- **Grant M. e Lamb C.** (2006). Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 9: 414–420.
- **Hamel L.P., Nicole M.C., Duplessis S., Ellis B.E.** (2012). Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. *Plant Cell*, 24: 1327–1351.
- **Hane J.K., Lowe R.G.T., Solomon P.S., Tan K.C., Schoch C.L.** (2007). Dothideomycete-plant interactions illuminated by genome sequencing and EST analysis of the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *Plant Cell*, 19: 3347–3368.
- **Jeong J.S., Mitchell T.K., Dean R.A.** (2007). The *Magnaporthe grisea* snodprot1 homolog, MSP1, is required for virulence. *FEMS Microbiol Lett*, 273: 157–165.
- **Jones J.D. e Dangl J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature*, 444: 323–329.
- **Kurup V.P., Banerjee B., Hemmann S., Greenberger P.A., Blaser K., Crateri R.** (2000). Selected recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens bind specifically to IgE in ABPA. *Clin Experim Allergy*, 30: 988–993.
- **Lombardi L., Faoro F., Luti S., Baccelli I., Martellini F., Bernardi R., Picciarelli P., Scala A., Pazzagli P.** (2013). Differential timing of defense-related responses

induced by cerato-platanin and cerato-populin, two non-catalytic fungal elicitors. *Plant Physiol*, 149: 408–421.

- **Martinelli J.A., Bocchese C.A.C., Xie W., O'Donnell K., Kistler H.C.** (2004). Soybean pod blight and root rot caused by lineages of the *Fusarium graminearum* and the production of mycotoxins. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 492-498.
- **McMullen M., Jones R., Gallemberg D.** (1997). Scab of wheat and barley: a remerging disease of devastating impact. *Plant Dis*, 81: 1340-1348.
- **Mur L.A., Kenton P., Lloyd A.J., Ougham H., Prats E.** (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot*, 59: 501–520.
- **O'Donnell K., Ward T.J., Geiser D.M., Kistler H.C., Aoki, T.** (2004). Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet Biol*, 41: 600–623.
- **Paper J.M., Scott-Craig J.S., Adhikari N.D., Cuomo C.A., Walton J.D.** (2007). Comparative proteomics of extracellular proteins *in vitro* and *in planta* from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Proteomics*, 7: 3171-3183.
- **Pan S. e Cole G.T.** (1995). Molecular and biochemical characterization of a *Coccidioides immitis*-speciWc antigen. *Infect Immun*, 63: 3994–4002.
- **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* f. sp. *platani*. *Biol Chem*, 274: 24959–24964.
- **Pazzagli L., Pantera B., Carresi L., Pertinhez T.A., Spisni A., Tegli S., Zoppi C., Scala A., Cappugi G.** (2006). Cerato-platanin, the Wrst member of a new fungal

protein family: cloning, expression and characterization. *Cell Biochem Biophys*, 44: 512–521.

- **Pazzagli L., Zoppi C., Carresi L., Tiribilli B., Sbrana F.** (2009). Characterization of ordered aggregates of cerato-platanin and their involvement in fungus–host interactions. *Biochim Biophys Acta*, 1790: 1334–1344.
- **Penninckx I.A., Thomma B.P., Buchala A., Métraux J.P., Broekaert W.F.** (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 2103–2113.
- **Pioli R.N., Mozzoni L., Morandi E.N.** (2004). First report of pathogenic association between *Fusarium graminearum* and soybean. *Plant Dis*, 88: 220.
- **Pitzschke A., Schikora A., Hirt H.** (2009). MAPK cascade signaling networks in plant defense. *Curr Opin Plant Biol*, 12: 421–426.
- **Proctor R.H., Hohn T.M., McCormick S.P.** (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol Plant-Microbe Interact*, 8: 593-601.
- **Ryals, J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.Y., Hunt M.D.** (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8: 1809–1819.
- **Sampedro J. e Cosgrove D.J.** (2005). The expansin superfamily. *Genome Biol*, 6: 242.
- **Scala A., Pazzagli L., Comparini 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. *J Plant Pathol*, 86: 23–29.
- **Sharen A.L. e Krupinski G.** (1970). Cultural and inoculation studies of *Septoria nodorum*, cause of Glume Blotch of wheat. *Phytopathol*, 60: 1480–1485.

- **Seidl V., Marchetti M., Schandl R., Allmaier G., Kubicek C.P.** (2006). Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *FEBS J.*, 273: 4346–4359.

- **Sella L., Gazzetti K., Faoro F., Odorizzi S., D'Ovidio R., Schäfer W., Favaron F.** (2013). A *Fusarium graminearum* xylanase expressed during wheat infection is a necrotizing factor but is not essential for virulence. *Plant Physiol Biochem*, 64: 1-10.

- **Stergiopoulos I. e De Wit P.J.** (2009). Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol*, 47: 233–263.

- **Templeton M.D., Rikkerink E.H.A., Beever R.E.** (1994). Cysteine-rich proteins and recognition in fungal plant interactions. *Mol Plant Microbe Interact*, 7: 320–325.

- **Thaler J.S., Humphrey P.T., Whiteman N.K.** (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci*, 17: 260–270.

- **Thomma B.P., Nürnberger T., Joosten M.H.** (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell*, 23: 4–15.

- **Torres M.A.** (2010). ROS in biotic interactions. *Physiol Plant*, 138: 414–429.

- **Van Breusegem F., Vranová E., Dat JF., Inzé D.** (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci*, 161: 405–414.

- **van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.** (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, 44: 135–162.

- **Van Wees S.C., Van der Ent S., Pieterse C.M.** (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 443–448.

- **Vargas W.A., Djonovic S., Sukno S.A., Kenerley C.M.** (2008). Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants. *J Biol Chem*, 283: 19804–19815.
- **Wanyoike W.M., Zhensheng K., Buchenauer H.** (2002). Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *EJPP*, 108: 803-810.
- **Wessels J.G.H.** (1997). Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv Microb Physiol*, 38: 1–45.
- **Wilson L.M., Idnurm A., Howlett B.J.** (2002). Characterization of a gene (sp1) encoding a secreted protein from *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of *Brassica napus*. *Mol Plant Pathol*, 3: 487–493.
- **Wösten H.A.B.** (2001). Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol*, 55: 625–646.
- **Wösten H.A.B. e de Vocht M.L.** (2000). Hydrophobins, The fungal coat unrevealed. *BBA*, 1469: 79–86.
- **Wösten H.A.B., de Vries O.M.H., Wessels J.G.H.** (1993). Interfacial selfassembly of a fungal hydrophobin into an hydrophobic rodlet layer. *Plant cell*, 5: 1567–1574.
- **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 Biotech J*, 7: 763–777.
- **Zaparoli G., Cabrera O.G., Medrano F.J., Tiburcio R., Lacerda G., Guimarães Pereira G.** (2009). Identification of a second family of genes in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches broom disease in cacao, encoding necrosisinducing proteins similar to cerato-platanins. *Mycol Res*, 113: 61–72.

- **Zhang H-Z. e Cai X-Z.** (2005). Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1 (NPR1): a key node of plant disease resistance signalling network. *Chin J Biotechnol*, 21: 511-515.
- **Zipfel C.** (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 12: 414–420.
- **Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E.J., Jones J.D., Felix G., Boller T.** (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428: 764–767.

RINGRAZIAMENTI

Arrivata alla fine del corso di studi magistrale, voglio dedicare quest'ultima pagina quale ringraziamento a tutti coloro che hanno contribuito alla mia formazione professionale, aiutata e sostenuta in questi anni di studio.

Innanzitutto un grazie sentito al Prof. Francesco Favaron, al Dott. Luca Sella, ai tecnici Carla e Silvana e ai dottorandi per la disponibilità, simpatia e per tutti gli insegnamenti preziosi che mi hanno saputo dare.

Un pensiero particolare va ai compagni di corso conosciuti e alle mie più strette compagne di Università Giulia, Elena, Alessia e Silvia. Con loro ho condiviso entusiasmi e fatiche ma anche momenti spensierati che rimarranno impressi nella mia memoria.

Vorrei ringraziare anche le mie più care amiche Paola, Chiara e Gioia che mi sono state vicine e spesso e volentieri hanno sopportato le mie assenze!!

Infine, un pensiero doveroso va alla mia famiglia, in modo speciale ai miei genitori per avermi sostenuta con serenità, dandomi la fiducia necessaria per giungere all'obiettivo che da sempre mi ero prefissata.

Resto convinta, ed è una cosa in cui spero, che tutte le persone che mi sono state accanto in questi anni possano condividere con me, non soltanto la gioia di questo momento, ma anche i traguardi futuri che mi aspettano.

Grazie a tutti di cuore.

