



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**FACOLTÀ DI AGRARIA**

**CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE**

**IDENTIFICAZIONE E ANALISI DI ESPRESSIONE DI  
GENI CODIFICANTI XILANASI DEL FUNGO *FUSARIUM*  
*VERTICILLIOIDES***

Relatore:

**dott. Luca Sella**

Correlatore:

**dott. Alessandro Raiola**

Laureando:

**Stefano Cherubin**

ANNO ACCADEMICO 2010–2011

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>pag. 3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>pag. 4</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>pag. 5</b>
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	<b>pag. 11</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>pag. 12</b>
<b>3.1 Analisi e selezione delle sequenze</b>	<b>pag. 12</b>
<b>3.2 Disegno dei primers</b>	<b>pag. 13</b>
<b>3.3 Analisi di espressione <i>in vitro</i></b>	<b>pag. 13</b>
3.3.1 Mezzi di coltura	pag. 15
3.3.2 Estrazione RNA	pag. 15
3.3.2 Quantificazione RNA	pag. 16
3.3.4 RT-PCR	pag. 16
<b>3.4 Analisi di espressione <i>in vivo</i></b>	<b>pag. 18</b>
3.4.1 Germinazione dei semi	pag. 18
3.4.2 Infezioni plantule	pag. 18
3.4.3 Estrazione RNA	pag. 19
3.4.4 RT-PCR	pag. 17
<b>4. RISULTATI</b>	<b>pag. 20</b>
<b>4.1 Analisi <i>in silico</i> delle endo-<math>\beta</math>-1,4-xilanasi di <i>F. verticillioides</i></b>	<b>pag. 20</b>
<b>4.2 Analisi di espressione <i>in vitro</i></b>	<b>pag. 21</b>
4.2.1 <i>F. verticillioides</i> ceppo PD (A) dopo 3 giorni di coltura	pag. 21
4.2.2 <i>F. verticillioides</i> ceppo PD (A) dopo 4 giorni di coltura	pag. 22
4.2.3 <i>F. verticillioides</i> ceppo 1376 (B) dopo 3 giorni di coltura	pag. 23
4.2.4 <i>F. verticillioides</i> ceppo 1376 (B) dopo 4 giorni di coltura	pag. 25
<b>4.3 Analisi di espressione <i>in vivo</i></b>	<b>pag. 27</b>
4.3.1 <i>F. verticillioides</i> ceppo PD (A) a 5 giorni dall'inoculo	pag. 27
4.3.2 <i>F. verticillioides</i> ceppo 1376 (B) a 4 giorni dall'inoculo	pag. 29
<b>4.4 Riassunto dei profili di espressione</b>	<b>pag. 31</b>
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>pag. 32</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>pag. 35</b>

## **RIASSUNTO**

*Fusarium verticillioides* è un fungo fitopatogeno in grado di colonizzare specie vegetali come mais, riso, sorgo, asparago, frumento e avena. Sebbene non venga considerato il principale patogeno del mais, durante l'interazione con l'ospite sintetizza metaboliti secondari tossici per l'uomo e gli animali, le tossine fumonisina B<sub>1</sub> e fumonisina B<sub>2</sub>.

*F. verticillioides* colonizza il mais attraverso il contributo di fattori abiotici e biotici. Tuttavia è possibile che il fungo sia in grado di colonizzare il tessuto ospite anche grazie alla produzione di enzimi degradativi della parete cellulare, una delle principali barriere dell'ospite. Poiché la parete cellulare del mais è ricca in xilano, è probabile che durante le prime fasi del processo infettivo *F. verticillioides* secerna enzimi in grado di degradarlo. Nel presente lavoro si sono identificati ed analizzati geni codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasi di *F. verticillioides* allo scopo di ottenere maggiori informazioni sul loro livello di espressione sia *in vitro* che *in vivo* in varie condizioni sperimentali. Sulla base dei dati raccolti *in vitro*, il gene FVEG\_08828.3 è risultato il più espresso, mentre la xilanasi FVEG\_13343.3 ha mostrato un profilo di espressione caratteristico, in quanto è risultata molto espressa dopo 3 giorni di coltura, ma il suo trascritto non è stato più rilevato il giorno successivo. L'espressione *in vivo* su plantule di mais, ha messo in evidenza che il gene codificante la xilanasi FVEG\_13343.3 è risultato il più espresso; di conseguenza si può ipotizzare un ruolo importante di questa xilanasi nella patogenicità di *F. verticillioides*. Il secondo trascritto più abbondante è risultato essere quello codificante la xilanasi FVEG\_08828.3, che possiede una sequenza molto simile alla xilanasi *Xyn11A* di *Botrytis cinerea*, dimostrata possedere attività necrotizzante. Resta da chiarire se FVEG\_08828.3 di *F. verticillioides* possa contribuire a indurre necrosi nei tessuti infetti.

## ***ABSTRACT***

*Fusarium verticillioides* is a phytopathogenic fungus able to colonize vegetable species such as corn, rice, sorghum, asparagus, wheat and oats. Although it is not considered as the main pathogen of corn, during the interaction with the host plant the fungus synthesizes secondary metabolites toxic to humans and animals such as the toxins fumonisin B1 and B2. *F. verticillioides* colonizes corn through the contribution of abiotic and biotic factors. However it is also possible that the fungus colonizes the host tissue by producing enzymes degrading the cell wall, one of the main host barriers. As the corn cell wall is rich in xylan, it is probable that in the earlier stages of the infection *F. verticillioides* secretes enzymes able to degrade it. In the present work, the genes encoding some endo- $\beta$ -1,4-xylanases of *F. verticillioides* have been identified and analyzed in order to provide more information on their expression level both *in vitro* and *in vivo* at various experimental conditions. According to the data obtained *in vitro*, the gene FVEG\_08828.3 appears to be the most expressed, while the xylanase FVEG\_13343.3 has shown a characteristic profile of expression, since it is very expressed after 3 days of culture, but its transcript has not been detected the following day. The expression analysis *in vivo* on maize seedling has evidenced that the gene encoding the xylanase FVEG\_13343.3 is the most expressed; as a consequence this xylanase could play an important role in *F. verticillioides* pathogenicity. The second most abundant gene is the one encoding the xylanase FVEG\_08828.3, which has a sequence very similar to the *Botrytis cinerea* xylanase *Xyn11A*, shown to have a necrotizing activity. However, it has to be clarified if *F. verticillioides* FVEG\_08828.3 can contribute to induce necrosis in the infected tissues.

# 1. INTRODUZIONE

*Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (Nirenberg e O'Donnell, 1998) (teleomorfo *Gibberella moniliformis*, sinonimo *F. moniliforme*, Sheldon) è un fungo fitopatogeno appartenente alla classe degli Ascomiceti, responsabile dell'infezione di una specie di considerevole interesse agrario come il mais (*Zea mays* L.) (Nelson *et al.*, 1993; Leslie, 1996). In letteratura si trovano più di 10000 citazioni dal 1996 al 2006 riguardanti l'interazione tra *F. verticillioides* e il mais (<http://www.agricola.nal.usda.gov>; July 18, 2006). *F. verticillioides* riesce inoltre a colonizzare anche altre specie vegetali come riso, sorgo, asparago, frumento e avena (Bacon *et al.*, 1996).

*F. verticillioides* risulta particolarmente studiato non tanto per la gravità dell'infezione della spiga di mais, ma per la sua capacità di produrre metaboliti secondari tossici, per l'uomo e gli animali (Munkvold 2003; Bacon *et al.*, 2008). In particolare, la tossina più dannosa di *F. verticillioides* è la fumonisin B<sub>1</sub> (Yates *et al.*, 1999), che si accumula nelle cariossidi infette e risulta responsabile di varie patologie, quali: cancro a fegato e reni, difetti al tubo neurale nei roditori (Howard *et al.*, 2001, Seefelder *et al.*, 2003), edema polmonare nei suini (PEM) (Kriek *et al.*, 1981), e leucoencefalomalacia (ELEM) negli equini (Wilson *et al.*, 1992). La fumonisin B<sub>1</sub> è inoltre un potente inibitore dell'attività della *ceramide sintetasi* (Desei *et al.*, 2002; Lonnie *et al.*, 2007), enzima responsabile della sintesi della componente lipidica di membrana.

Nell'uomo, l'ingestione di elevate concentrazioni di fumonisin B<sub>1</sub>, provoca cancro all'esofago (Marasas, 1995), oltre che disturbi al tubo neurale (Seefelder *et al.*, 2003), e alterazioni nello sviluppo del feto (Etzel, 2002). *F. verticillioides* e/o le micotossine prodotte da questo fungo sono state isolate da mais e da altre piante in diverse zone del mondo, ma anche da alimenti e da mangimi ottenuti da granella contaminata dal fungo (Burgess, 1981). Per queste ragioni ogni anno l'elevato quantitativo di fumonisin B<sub>1</sub>, determina un negativo impatto economico (Shephard *et al.*, 1996). A causa dei potenziali rischi per la salute umana, sono state emesse dalla *Food and Drug Administration (FDA)*, ente Statunitense che collabora anche con altre agenzie governative mondiali (*FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition*, 2001), rigide linee guida per i livelli massimi di fumonisin B<sub>1</sub> consentiti negli alimenti. Il tenore massimo permesso su mais

non trasformato è di 4000 ppb come somma delle fumonisine B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (Reg. Ce n. 1126/2007).

Per questi motivi la comprensione dei complessi meccanismi mediante i quali il fungo colonizza il suo ospite, potrebbe consentire di identificare possibili ed efficaci strategie per il controllo delle infezioni da *F. verticillioides*, strumento fondamentale per controllare la concentrazione di fumonisin B<sub>1</sub> nella granella. In questo senso, la proficua collaborazione tra numerosi istituti di ricerca ha portato al sequenziamento dell'intero genoma di *F. verticillioides*, stimato in 46 Mb e contenuto in 12 cromosomi, disponibile online al sito della Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org>). La disponibilità del genoma fornisce alla ricerca un punto cardine dal quale proseguire per la caratterizzazione molecolare e funzionale di enzimi prodotti dal fungo durante l'infezione. *F. verticillioides* è un fungo saprofito che si trova naturalmente nel terreno sotto forma di spore o di micelio, spesso associato alla matrice organica (residui colturali, fogliame, stoppie) del suolo, che consente al fungo il superamento delle condizioni ambientali più sfavorevoli. Le spore possono così venire a contatto con organi della pianta come radici, fusti, fiori oppure semi attraverso i quali può instaurare una relazione con l'ospite già al momento della semina. Inoltre le spore possono giungere sulle setole della spiga durante l'epoca di fioritura, per mezzo di fattori sia biotici (insetti), che abiotici (vento, pioggia) (Dowd, 2003). Sulle setole le spore germinano emettendo ife, probabilmente in associazione con il tubetto pollinico, e si accrescono fino alla base della struttura fiorale, dalla quale possono penetrare e infettare i tessuti più interni (Desjardins *et al.*, 2000, Munkvold *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 1992). Inoculando le setole di mais con spore di *F. verticillioides* l'84% della granella risultava contaminata contro un valore inferiore al 10%, ottenuto inoculando i semi (Munkvold *et al.*, 1997).

Quella attraverso le setole sembra essere una importante via di accesso ai tessuti dell'ospite (Vigier *et al.*, 1997; Dowd, 1998; Stewart *et al.*, 2002; Rossi e Scandolara, 2009).

La colonizzazione della pianta ospite risulta condizionata da svariati fattori, quali: il tipo di tessuto, lo stadio di maturazione, la composizione chimica del tessuto e la presenza di eventuali lesioni di origine sia biotica che abiotica (Headrick *et al.*, 1990; Hoenisch e Davis, 1994; Styer e Cantliffe, 1984; Yates e Jaworski, 2000). Infatti una delle principali vie di colonizzazione dell'ospite da parte del patogeno, consiste nello sfruttare le lesioni ai

tessuti della pianta causati dal lepidottero fitofago piralide (*Ostrinia nubilalis* Hb) (Maiorano *et al.*, 2009; Munkvold e Hellmich, 2000; Sobek e Munkvold, 1999; Warfield e Davis, 1996). Attualmente si pensa esistano due modalità di infezione da *F. verticillioides* in mais: una definita sistemica, quindi visibile, e una definita asintomatica o endofitica, non riscontrabile visivamente nei tessuti dell'ospite se non con l'ausilio di tecniche molecolari. L'infezione in mais può risultare endofitica (Bacon e Hinton, 1996) anche per l'intero ciclo vitale dell'ospite, quindi la malattia può non manifestarsi visivamente con sintomi conclamati sulla spiga. Con questa modalità di infezione il patogeno può diffondere tramite la granella infetta (Wilke *et al.*, 2007). In altre situazioni, soprattutto in presenza di stress idrico, in concomitanza con condizioni particolarmente favorevoli per il fungo (elevata umidità ed elevate temperature) l'infezione da *F. verticillioides* abbandona la sua forma endofitica divenendo visibile sottoforma di marciume della spiga (Bacon e Nelson, 1994; Abbas *et al.*, 2006). I segni diretti dell'infezione, sono distruttivi, con conseguente alterazione della qualità della granella: le spighe risultano colonizzate da un micelio bianco/rosato, e le cariossidi infette assumono a livello del pericarpo evidenti striature biancastre dovute allo sfaldamento delle cellule che lo compongono (Koehler, 1942). Fino ad oggi, una strategia diretta di invasione dei tessuti di mais da parte di *F. verticillioides* non è ancora stata identificata.

Tuttavia in generale, la maggior parte dei funghi fitopatogeni secernono durante l'infezione dell'ospite, numerosi enzimi in grado di degradare le componenti della parete ospite, noti come *CWDE* (*Cell Wall Degrading Enzyme*). Infatti la parete cellulare costituisce l'involucro esterno della cellula e funge da prima barriera fisica che i patogeni devono superare per colonizzare le cellule ospiti. I *CWDE* hanno quindi la funzione di consentire al fungo di giungere al *citoso*l, sorgente di carboidrati semplici, amminoacidi, acidi nucleici e altri nutrienti utilizzabili come fonte di energia per la crescita e riproduzione.

Questi enzimi degradativi possono essere classificati in base ai polimeri che degradano:

- Le *pectinasi* (EC:4.2.2.10) sono dotate di attività idrolasica e liasica che consente la rottura dei legami  $\alpha$ -1,4 della pectina, uno dei principali costituenti della parete cellulare e della lamella mediana.
- Le *cellulasi* (EC:3.2.1.4) sono una classe di enzimi che catalizzano l'idrolisi dei legami  $\beta$ -1,4-D-glicosidici delle fibre di cellulosa.

- Le *emicellulasi* sono una grande categoria di enzimi in grado di idrolizzare i legami glucosidici delle diverse strutture polisaccaridiche che compongono le emicellulose. Si dividono in *arabinasi* (EC:3.2.1.99.), capaci di degradare l'arabinano; *glucanasi* (EC:3.2.1.6), in grado idrolizzare i glucani e *xilanasi* (EC:3.2.1.8.) che degradano i polimeri di xilano costituiti da residui di xilosio legati mediante legami  $\beta$ -1,4.

Poiché la composizione chimica della parete primaria e secondaria dei tessuti lignificati delle specie monocotiledoni (mais, riso, frumento,) è ricca in emicellulose (Wong, *et al.*, 1988; Cooper *et al.*, 1988), di cui lo xilano è uno dei principali polisaccaridi costituenti, e dal momento che la parete si pone come primo ostacolo all'infezione del fungo, è presumibile che *F. verticillioides* secerna enzimi in grado di degradare lo xilano già nelle prime fasi del processo infettivo. La composizione chimica delle emicellulose varia con la crescita e lo stadio di maturazione della pianta e le proprietà che le caratterizzano variano con le condizioni ambientali. Anche la struttura dello xilano, secondo polimero più abbondante in natura, varia in funzione della specie, e l'associazione con gruppi funzionali, tipo acetili, arabino-furanosili, galattosili ne aumenta la varietà e ne modifica le proprietà intrinseche (Collins *et al.*, 2005).

La complessità e l'eterogeneità delle emicellulose ha specializzato i microrganismi nella produzione di xilanasi, enzimi idrolitici secreti nella stragrande maggioranza nell'ambiente extracellulare e implicati nella produzione di xilosio, una fonte primaria di carbonio per i microrganismi fitopatogeni durante l'infezione della cellula ospite. Infatti: lieviti, batteri, alghe, protozoi, alcuni molluschi e in particolare i funghi fitopatogeni (Prade, 1995), sono stati segnalati per la presenza nel genoma di numerosi geni codificanti xilanasi (Coughlan e Hazlewood, 1993; Haltrich *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1988). Non si tratta tuttavia solo di ridondanza genetica, bensì è stato dimostrato che molti di questi geni vengono tradotti, e gli enzimi corrispondenti vengono secreti nelle cellule ospiti infette (Wong *et al.*, 1988). Le xilanasi costituiscono un importante componente della famiglia dei CWDE di piante, ed è stato dimostrato il loro ruolo nella patogenicità dei funghi fitopatogeni (Walton, 1994).

Differenti tipi di xilanasi potrebbero consentire ai microrganismi di metabolizzare un'ampia gamma di substrati come suggeriscono Wong *et al.* (1988), o di diffondere attraverso la parete cellulare delle cellule vegetali (Prabhu e Maheswari, 1999). Per



meglio comprendere le caratteristiche, le modalità di induzione e d'azione di questi enzimi, sono stati condotti svariati studi. Per esempio, è stato isolato dal suolo un fungo appartenente al genere *Trichoderma* (*Trichoderma viride*, ceppo SY), da cui è stata purificata una delle 13 (Biely *et al.*, 1985) xilanasi prodotte da questo microrganismo (Min *et al.*, 2002). Il fungo non sintetizza endo- $\beta$ -1,4-xilanasi se fatto crescere in un mezzo contenente saccarosio; ciò sembra suggerire un meccanismo di repressione da catabolita, per il quale la presenza di zuccheri semplici, come appunto il saccarosio, inibisce l'espressione dei geni codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasi. Tale fenomeno è stato dimostrato nei funghi ma anche in alcuni batteri (Kim *et al.*, 2000; Ha *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2001). Per contro, la presenza di cellulosa o di xilano come unica fonte carboniosa, determina un'induzione dell'attività xilanasica.

Una componente importante della famiglia di enzimi con attività xilanasica è rappresentata dalle endo- $\beta$ -1,4-xilanasi (EC:3.2.1.8 *IUBMB*, 1961).

Esse catalizzano l'idrolisi dello xilano in xilo-oligosaccaridi e xilosio, attaccando i legami glicosidici interni della catena polisaccaridica. Assieme alle  $\beta$ -xilosidasi (EC: 3.2.1.37), che rilasciano residui di xilosio dall'estremità del polimero, le endo- $\beta$ -1,4-xilanasi, garantiscono la totale degradazione dello xilano (Wong *et al.*, 1988; Collins *et al.*, 2005). Secondo quanto stabilito nella più recente classificazione degli enzimi con proprietà xilanasica (Collins *et al.*, 2005), le endo- $\beta$ -1,4-xilanasi sono state assegnate alle famiglie 10 (*GH10*) e 11 (*GH11*) delle glicosil-idrolasi: xilanasi ad alto (>30 *KDa*) e basso (<30 *KDa*) peso molecolare rispettivamente.

Tuttavia circa il 30% delle endo- $\beta$ -1,4-xilanasi fino ad ora identificate non possono essere classificate in questo sistema (Sunna e Antranikian, 1997).

Recenti studi hanno cercato di dimostrare il ruolo biologico delle endo- $\beta$ -1,4-xilanasi di vari funghi fitopatogeni nel processo infettivo. Sebbene alcuni esperimenti di *knock-out* genico eseguiti in *Cochliobolus carbonum* (Apel *et al.*, 1993), *Magnaporthe grisea* (Wu *et al.*, 1997) e *Fusarium oxysporum* (Gomez-Gomez *et al.*, 2001) non abbiano evidenziato un ruolo essenziale delle endo- $\beta$ -1,4-xilanasi per la patogenicità, Brito *et al.* (2006) hanno dimostrato che la xilanasi *Xyn11A* del fungo necrotrofo *Botrytis cinerea* è un fattore di virulenza durante l'interazione con acini d'uva (*Vitis vinifera* L.) e foglie di pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.).

Inoltre, recentemente, Nguyen *et al.* (2011), hanno ottenuto una forte riduzione dei livelli di espressione di tutti i geni codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasi del fungo *Magnaporthe oryzae* (anamorfo, *Pyricularia oryzae* o *Pyricularia grisea*), mediante un approccio *RNAi*, ottenendo una significativa riduzione della virulenza del fungo su foglie di frumento (*Triticum aestivum* L.) e orzo (*Hordeum Vulgare* L.).

Tuttavia l'attività catalitica delle endo- $\beta$ -1,4-xilanasi potrebbe non essere l'unica funzione di questi enzimi. Infatti la mutazione a livello di due residui di acido glutammico del sito catalitico dell'enzima non influisce sulla capacità di *Xyn11A* di determinare necrosi nei tessuti infetti, sebbene l'enzima abbia perso l'attività catalitica (Noda *et al.*, 2010). Si è così potuto concludere che *Xyn11A* contribuisce alla virulenza del fungo con la sua attività necrotizzante e non grazie all'attività catalitica (Noda *et al.*, 2010).

## 2. SCOPO DELLA TESI

Non è chiaro il meccanismo mediante il quale *F. verticillioides* colonizza le cellule del tessuto ospite. Tuttavia gli enzimi degradativi della parete cellulare (CWDE) di *F. verticillioides*, prodotti durante il processo infettivo, potrebbero ricoprire un ruolo importante ai fini dell'infezione. Poiché la parete cellulare delle cellule del tessuto ospite è ricca in xilano, è probabile che il fungo secerna enzimi in grado di degradarlo.

Nella presente tesi si è dunque analizzato il genoma di *F. verticillioides*, per identificare e analizzare sequenze geniche codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasi, al fine di analizzarne i livelli di espressione sia *in vitro* su terreno minimale liquido (*Minimal Medium, MM*, Puhalla e Spieth, 1983) contenente xilano come unica fonte carboniosa, sia *in vivo* inoculando plantule di mais con spore di *F. verticillioides*. In particolare l'inoculo *in vivo* è stato eseguito su radichette ed mesocotili, tra i tessuti più facilmente colonizzabili dal fungo, in modo da ottenere informazioni sulle endo- $\beta$ -1,4-xilanasi più espresse dal fungo nelle condizioni sperimentali analizzate.

Lo studio dell'espressione genica delle sequenze selezionate è stato eseguito mediante RT-PCR. Come gene *housekeeping* si è selezionato il gene codificante la  $\beta$ -tubulina (FVEG\_04081.3) di *F. verticillioides*. Lo studio di espressione genica, sia *in vitro*, sia *in vivo* è stato condotto utilizzando due ceppi di *F. verticillioides*: ceppo PD e ceppo 1376.

Sebbene l'approccio RT-PCR sia semiquantitativo, in caso di elevate differenze tra le quantità iniziali di trascritto, è comunque possibile ottenere un profilo di espressione genica indicativo. In linea teorica, un gene con un elevato livello di espressione, in una determinata condizione, potrebbe codificare una proteina importante per l'organismo in quel determinato contesto. I risultati di questa ricerca potrebbero contribuire a chiarire i meccanismi di interazione *mais-F. verticillioides*, al fine di identificare nuove possibili strategie di lotta per il controllo del fungo fitopatogeno *F. verticillioides*.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Analisi e selezione delle sequenze

Per la ricerca delle sequenze geniche di *F. verticillioides* codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasasi ci si è serviti del database contenente l'intero genoma sequenziato del fungo, disponibile al sito web: [www.broadinstitute.org](http://www.broadinstitute.org). Inizialmente sono state individuate diciassette sequenze geniche: cinque di queste putativamente codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasasi; undici codificanti *conserved hypothetical proteins* (proteine ipotetiche conservate), ossia una famiglia di geni il cui prodotto della traduzione è una proteina simile sia per conformazione che per attività ai geni codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasasi, e una codificante un attivatore trascrizionale (*xlnR*). Dal database si sono inoltre ottenute informazioni sulle dimensioni in paia di basi (*bp*) dei geni, il numero di introni al loro interno, le dimensioni del trascritto maturo e il numero di amminoacidi che costituiscono la proteina.

Attraverso un'analisi *BLAST* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) si sono analizzati i livelli di omologia delle sequenze individuate nel database con sequenze di endo- $\beta$ -1,4-xilanasasi di altri funghi. Attraverso l'impiego del programma informatico *DNAMAN* (*Lynnon Biosoft*) si è infine costituito un albero filogenetico utile per definire meglio i livelli di omologia tra le sequenze nucleotidiche.

Tra i cinque geni codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasasi si è riscontrata un'omologia del 30% circa a livello nucleotidico, mentre il livello di omologia ricavato dall'allineamento di tutte le sequenze individuate nel database si riduceva al 18%. Per selezionare le sequenze di interesse si sono utilizzati altri *software*, quali *Signal P* (*cbs.dtu.dk*) e *WoLF PSORT* (*AIST-CBRC*). *Signal P* è stato adoperato per l'identificazione di eventuali *peptidi segnale*: porzioni di proteina all'*N-terminale*, costituite da un numero variabile di amminoacidi compreso tra 15 e 30, codificati dalla regione al 5' della sequenza, aventi la funzione di indirizzare il prodotto della traduzione verso precisi *target*: organelli citoplasmatici piuttosto che il *citosol* o l'ambiente extracellulare. *WoLF PSORT* stabilisce la percentuale di probabilità con la quale la proteina matura, grazie al suo *peptide segnale* viene secreta extracellularmente. Tenendo conto che le endo- $\beta$ -1,4-xilanasasi sono enzimi che per svolgere la loro funzione devono giungere al contatto con i tessuti dell'ospite, tutte le

sequenze geniche prese in considerazione dal database, non dotate di *peptide segnale* per l'ambiente extracellulare, sono state tralasciate.

Per l'analisi di espressione sono stati quindi selezionati i cinque geni codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasi;

- FVEG\_11849.3, endo- $\beta$ -1,4-xilanasi;
- FVEG\_08828.3, precursore endo- $\beta$ -1,4-xilanasi;
- FVEG\_13343.3, precursore endo- $\beta$ -1,4-xilanasi;
- FVEG\_07261.3, precursore endo- $\beta$ -1,4-xilanasi;
- FVEG\_13207.3, precursore endo- $\beta$ -1,4-xilanasi.

Come gene *housekeeping* per l'analisi di espressione si è selezionato il gene della  $\beta$ -tubulina (FVEG\_04081.3) impiegato per la quantificazione del fungo.

## 3.2 Disegno dei *primers*

Per il disegno dei *primers* da impiegare nello studio di espressione genica, ci si è serviti del programma informatico *DNAMAN* (*Lynnon Biosoft*), che ha inoltre permesso di allineare le sequenze geniche dell'RNA messaggero (mRNA) maturo delle cinque endo- $\beta$ -1,4-xilanasi precedentemente selezionate. Ciò ha consentito la costruzione di *primers* complementari a regioni dei geni che non presentassero omologie tra di loro.

**Tabella 3.1** *Primers per lo studio di espressione*

Gene	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Dimensione amplificato (bp)
FVEG_11849.3	TGTGTACCCGGATCTGGA	CATGGTGGTAACGTGGTTCT	413
FVEG_08828.3	CCACAAACGTCTCGACA	TGCTGAAAGGTCTTGTTACCC	421
FVEG_13343.3	TCGGTAGCTTCGACCAGGT	AGGTGAGACTGGGAGCCAA	451
FVEG_07261.3	TACTCCCAACAGTTCCGGTA	CAGTACTGCTGGAAGGTCTGA	405
FVEG_13207.3	CTCGTCCCTTTGACTTCCTC	AGCATTAGCCCAAGCATTG	548
FVEG_04081.3 ( $\beta$ -tubulina)	AGAACATGATGGCTGCTTC	CCTCATCAATACCAGCATC	409

Per testare l'efficacia di amplificazione delle sei coppie di *primers* ed identificare la temperatura di appaiamento migliore si è proceduto con l'estrazione di DNA genomico di *F. verticillioides* (ceppo *PD*) seguendo il seguente protocollo: circa 200 mg di micelio congelato sono stati pestellati in N<sub>2</sub> liquido servendosi di mortaio e pestello sterili, fino ad ottenere una polvere fine. Alla polvere è stato aggiunto 1 ml di CTAB (2% CTAB, 100 mM Tris HCl pH=8.20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% PVP) più 20 µl di β-mercaptoetanololo; la miscela dunque è stata vortexata vigorosamente e successivamente incubata a 65 °C in un bagno termostato per 60 minuti, al fine di favorire la lisi cellulare. Per la purificazione del DNA si è aggiunto alla miscela 1 ml di cloroformio-alcool isoamilico in rapporto 24:1, quindi si è mescolato e incubato in ghiaccio, in agitazione, per 60 minuti. In seguito, la miscela è stata centrifugata 10 minuti a 12000 rpm, si è recuperato il surnatante al quale sono stati aggiunti 750 µl di isopropanolo freddo e 75 µl di sodio acetato 3M (pH=5.2). La miscela è stata invertita più volte e quindi incubata a -20 °C per 25 minuti. Dopo una centrifugazione a 12000 rpm per 20 minuti, si è ottenuta la precipitazione del DNA. Il pellet è stato poi lavato aggiungendo 500 µl di EtOH 70% e quindi risospeso in 100 µl di TE.

Successivamente, i sei geni sono stati amplificati impostando in un termociclatore le seguenti fasi ripetute per un numero di cicli pari a 35:

- i) *Melting* del *duplex* di DNA per 60 secondi a 94 °C;
- ii) *Annealing* dei *primers* al templatolo di DNA per 30 secondi a varie temperature (da 51 a 57 °C);
- iii) *Elongation* della catena per 60 secondi a 72 °C.

I prodotti dell'amplificazione sono stati visualizzati su gel di agarosio 1%. Il gel 1% è stato preparato con 0,5 gr di agarosio, disciolti in 50 ml di TAE 1x servendosi di un agitatore termostato. Le temperature di *annealing* più efficaci sono riportate nella **tabella 3.2**.

## 3.3 Analisi di espressione *in vitro*

### 3.3.1 Mezzi di coltura

Due ceppi del fungo *F. verticillioides* (PD e 1376) sono stati allevati in coltura liquida in 50 ml di un terreno minimale (*Minimal Medium, MM*) sterilizzato in autoclave, contenente xilano di larice 0,5% (*SIGMA Chemical Company*) come fonte di carbonio. Cinque tondelli di agar colonizzato con il fungo in attiva crescita sono stati inoculati in quattro beute separate. Il fungo è stato allevato su un agitatore orbitale a 150 rpm per periodi di 3 e 4 giorni in modo da indurre l'espressione delle endo- $\beta$ -1,4-xilanasi in condizioni di temperatura controllata (25 °C).

50 ml di mezzo di coltura contengono:

- ✓ 0,5 gr Xilano di larice
- ✓ 0,09 gr  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
- ✓ 0,2 gr  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
- ✓ 0,01 gr  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ✓ 0,05 gr KCl

### 3.3.2 Estrazione RNA

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata da micelio di *F. verticillioides*, allevato per periodi di 3 e 4 giorni, recuperato dal mezzo di coltura inducente l'attività xilanasica.

Il micelio è stato precedentemente asciugato con l'ausilio della pompa del vuoto, ed è stato trattenuto utilizzando dei filtri sterili. In seguito, il micelio recuperato è stato posto in *ependorf* siglate con il nome del fungo, il nome del ceppo utilizzato, il peso del campione e poi subito congelato a -80 °C per evitare modificazioni dell'espressione genica. L'estrazione è stata compiuta seguendo il protocollo *Silica capture method* descritto da Foissac *et al.* (2001), che prevede il legame della molecola di RNA con una resina contenente particelle di silicio ( $\text{SiO}_2$ ). Dopo aver eseguito alcuni lavaggi con una soluzione contenente Tris-HCl (pH=7.5), NaCl ed EDTA, l'RNA è stato eluito dalla matrice aggiungendo 100  $\mu\text{l}$  di acqua *RNase-free*.

Successivamente un'aliquota di RNA è stata trattata a 37 °C per 30 minuti, con 1 µl di *DNase* (*Promega*), allo scopo di rimuovere eventuali contaminazioni da DNA genomico. Alla soluzione è stato poi aggiunto 1 µl di *stop solution* e il tutto è stato incubato per 10 minuti a 65 °C.

### 3.3.3 Quantificazione RNA

Utilizzando lo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm si è misurata l'assorbanza di ogni campione di RNA di *F. verticillioides*. I valori di assorbanza ricavati sono stati convertiti in valori di concentrazione (ng/µl) attraverso la seguente formula:  $C = A_{260} \cdot 40 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot \text{FATTORE DI DILUIZIONE}$ . In questo caso, il fattore di diluizione era 100, poiché sono stati diluiti 5 µl di RNA in 500 µl di acqua *RNase-free*. La quantificazione visiva è stata effettuata su gel di agarosio 1%, caricando un volume approssimativo di 4 µl di RNA eluito e 2,5 volumi di tampone di caricamento *LB 1,5x*. Il gel 1% è stato preparato con 0,5 gr di agarosio (*SIGMA Chemical Company*) disciolti in 50 ml di tampone *TAE 1x*. I campioni di RNA prima di essere caricati sul gel sono stati incubati a 65 °C per 10 minuti, poi un minuto in ghiaccio.

### 3.3.4 RT-PCR

Per eseguire una *reverse transcriptase-PCR* (RT-PCR) è necessario utilizzare l'attività di un enzima proprio dei *retrovirus* eucariotici, la *reverse transcriptasi*, che consente a partire da una miscela di RNA messaggeri di risalire alla molecola complementare, il cDNA.

In questo caso, per la retrotrascrizione (RT) dell'mRNA estratto e quantificato dai ceppi *PD* e *1376* di *F. verticillioides*, allevati in cultura liquida inducente attività xilanasica, si è scelto di utilizzare un *primer reverse polyT* composto da 15/18 timine, capace di appaiarsi all'estremità 3' *poliadenilata* dei trascritti. In un primo momento i *primers* (50 ng/µl) sono stati miscelati con un µg di RNA target, quindi sono stati incubati 5 minuti a 70 °C, poi lasciati per almeno 5 minuti in ghiaccio.

In uno *step* successivo sono stati aggiunti alla *mix* i nucleotidi, una miscela contenente un *buffer* che determina l'ambiente chimico favorevole alla reazione,  $\text{MgCl}_2$  che stabilizza la polimerasi e l'enzima *reverse transcriptase* (*Promega Corporation*).



In 30  $\mu\text{l}$  di miscela di reazione erano così contenuti:

- ✓ 8  $\mu\text{l}$  *buffer* di reazione 5x;
- ✓ x  $\mu\text{l}$  (\*) di  $\text{MgCl}_2$  ([ ] finale 3 mM);
- ✓ 2  $\mu\text{l}$  *dNTPs* ([ ] finale 1 mM);
- ✓ 1,5  $\mu\text{l}$  RT *ImProm-II™* (Promega Corporation);
- ✓ 10  $\mu\text{l}$  RNA trattato + *primer oligo dT*;
- ✓ acqua sterile a volume.

(\* poiché il *buffer* di reazione per il trattamento con *DNasi* contiene una concentrazione 10 mM di ioni  $\text{Mg}^{2+}$ , nella miscela di reazione si è aggiunto un volume variabile di  $\text{MgCl}_2$  per avere una concentrazione finale di 3 mM).

Il ciclo RT è il seguente:

- *Annealing*: 25 °C per 5 minuti (appaiamento del *primer reverse*);
- *Elongation*: 42 °C per 60 minuti;
- Inattivazione: 70 °C per 15 minuti.

Il cDNA ottenuto è stato congelato a -20 °C.

Per testare l'espressione dei cinque geni codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasi, si è eseguita una reazione PCR utilizzando come stampo un'aliquota di cDNA, in una mix di 25  $\mu\text{l}$  contenente:

- ✓ 12,5  $\mu\text{l}$  *REDTaq® ReadyMix 2x PCR reaction mix* (SIGMA chemical company);
- ✓ 4  $\mu\text{l}$  cDNA;
- ✓ 1  $\mu\text{l}$  *primers Forward/Reverse* specifici;
- ✓ 6,5  $\mu\text{l}$  acqua *RNase-free*.

Il ciclo PCR utilizzato è il seguente:

- 94 °C per 5 minuti;
  - 94 °C per 1 minuto;
  - $T_a$  variabile (vedi **Tabella 3.2**) per 30 secondi;
  - 72 °C per 1 minuto;
  - 72 °C per 10 minuti.
- } 35 cicli

**Tabella 3.2** Temperature di annealing ( $T_a$ ) utilizzate

<b>Gene</b>	<b><math>T_a</math> °C</b>
FVEG_11849.3	51
FVEG_08828.3	53
FVEG_13343.3	56
FVEG_07261.3	51
FVEG_13207.3	56
FVEG_04081.3	57
( $\beta$ -tubulina)	

Terminati i cicli previsti, l'amplificato è stato mantenuto a 4 °C prima di essere visualizzato su gel.

10  $\mu$ l di miscela PCR sono stati quindi analizzati su gel di agarosio 1%.

## **3.4** **Analisi di espressione *in vivo***

### **3.4.1** *Germinazione dei semi*

Semi di mais della Linea *B73* sono stati utilizzati per l'analisi di espressione *in vivo*. Le cariossidi sono state lasciate sotto flusso corrente di acqua per tutta la notte, e successivamente i semi sono stati sterilizzati con 100 ml di ipoclorito di sodio 0,5%. I semi lavati per 4 volte con un ugual volume di acqua sterile sono stati posti a germinare in piastre Petri contenenti carta bibula imbevuta d'acqua in camera di crescita a 25 °C e al buio per i successivi 3 giorni prima di essere inoculate con spore di *F. verticillioides*.

### **3.4.2** *Infezione delle plantule*

Per l'infezione delle plantule di mais, si sono utilizzate spore raccolte da micelio di *F. verticillioides* (ceppi *PD* e *1376*) cresciuto in una piastra contenete un terreno nutritivo agarizzato (*Potato Dextrose Agar, PDA; DIFCO Laboratories*). Le spore venivano recuperate dalle piastre mediante raschiamento della superficie con bacchetta di vetro in presenza di 10 ml di acqua sterile. Dopo aver filtrato la soluzione su contenitore autoclavato, i conidi filtrati sono stati trasferiti in un tubo *falcon* per il loro conteggio eseguito in camera di *Thoma* adottando appropriate diluizioni della sospensione conidica.

L'infezione è stata eseguita manualmente sotto cappa a flusso laminare servendosi di un ago sterile in modo da ferire il tessuto e facilitare la penetrazione del fungo. L'inoculo è stato effettuato ponendo 5 µl di sospensione conidica contenente  $1 \times 10^4$  conidi sull'area di tessuto precedentemente ferita. Per l'estrazione dell'RNA, sono state prelevate porzioni di radice e di mesocotile dopo 4/5 giorni dall'inoculo.

Un paio di plantule non inoculate col fungo sono state utilizzate come controllo negativo.

#### 3.4.3 Estrazione RNA

Per l'estrazione dell'RNA da tessuto infetto, si è utilizzato un kit commerciale, *RNeasy® Mini Handbook*, distribuito da *QIAGEN (Valencia CA)*. Il kit fornisce in dotazione soluzioni di varia composizione per la purificazione dell'RNA e delle colonnine con all'interno delle matrici silicee per legare gli acidi nucleici. Anche in questo caso, l'RNA è stato eluito dalla matrice con 100 µl di acqua *RNase-free* e subito congelato a -80 °C.

Un'aliquota di 5 µl invece, è stata utilizzata per la quantificazione allo spettrofotometro.

#### 3.4.4 RT-PCR

Come per l'analisi *in vitro* anche per lo studio di espressione genica *in vivo* si è eseguita una RT-PCR, seguendo i seguenti *step*:

- i) Trattamento dell'RNA con *DNasi* e successiva incubazione con *primer oligo dT*;
- ii) reazione di retrotrascrizione dei campioni;
- iii) PCR per l'amplificazione da cDNA delle 5 endo-β-1,4-xilanasi e della β-tubulina (FVEG\_04081.3) di *F. verticillioides*;
- iv) visualizzazione dei campioni amplificati su gel di agarosio 1%.

Il ciclo RT è lo stesso descritto nel paragrafo 3.3.4.

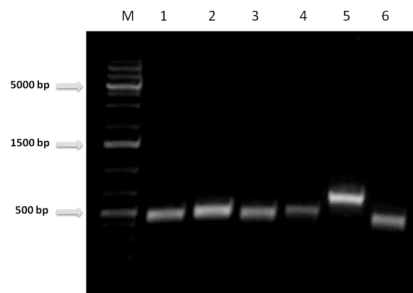
## 4. RISULTATI

### 4.1 *Analisi in silico* delle endo- $\beta$ -1,4-xilanasi di *F. verticillioides*

Consultando il database di *F. verticillioides* disponibile in rete si sono potute identificare cinque sequenze geniche putativamente codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasi, le quali sono state selezionate sulla base della presenza di *peptidi segnale* e analizzate in termini di dimensioni, numero di introni, dimensioni del trascritto maturo e sequenza amminoacidica corrispondente dedotta. Le endo- $\beta$ -1,4-xilanasi selezionate, sono state valutate per il loro livello di omologia di sequenza attraverso l'allineamento multiplo delle sequenze nucleotidiche utilizzando il programma informatico *DNAMAN*. Tra le cinque sequenze codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasi analizzate è stato osservato un grado di omologia di circa il 30% a livello nucleotidico. In particolare le xilanasi FVEG\_11849.3 e FVEG\_13343.3 hanno mostrato un livello di omologia del 63%, mentre le xilanasi FVEG\_08828.3 e FVEG\_07261.3 del 55%. Inoltre dall'allineamento delle sequenze amminoacidiche, la proteina dedotta dal gene FVEG\_08828.3 di *F. verticillioides* è risultata la più simile alla proteina *Xyn11A* di *Botrytis cinerea*, con un'omologia del 54%.

Utilizzando il programma *DNAMAN* si sono disegnati *primers* (**Tabella 3.1**) per l'amplificazione delle cinque sequenze codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasi e di un gene *housekeeping*, codificante la  $\beta$ -tubulina (FVEG\_04081.3) di *F. verticillioides* allo scopo di ricavare informazioni sul loro livello di espressione.

Le sei coppie di *primers* sono state disegnate in modo da ottenere una temperatura di *melting* ( $T_m$  °C) simile, compresa tra 58 °C e 61 °C. Le temperature di *annealing* ( $T_a$  °C) utilizzate sono riportate in **Tabella 3.2**. I *primers* sono stati successivamente testati con reazioni PCR su DNA genomico in modo da verificarne l'efficacia, ossia che ogni coppia producesse un amplificato delle dimensioni attese e ben visibile su gel di agarosio 1% (**Figura 4.1**). Le dimensioni dei frammenti amplificati sono risultate comprese tra i 400 e 600 paia di basi (*bp*) (**Tabella 3.1**).



**Figura 4.1** Gel di agarosio (1%) con frammenti amplificati ottenuti da DNA genomico di *F. verticillioides* (ceppo PD); per ogni corsia sono stati caricati 10  $\mu$ l di prodotto PCR. Corsia M = 1Kb DNA Ladder plus (Fermentas); corsia 1 = frammento FVEG\_11849.3 amplificato a  $T_o$  di 51  $^{\circ}$ C; corsia 2 = frammento FVEG\_13343.3 amplificato a  $T_o$  di 56  $^{\circ}$ C; corsia 3 = frammento FVEG\_08828.3 amplificato a  $T_o$  di 53  $^{\circ}$ C; corsia 4 = frammento FVEG\_07261.3 amplificato a  $T_o$  di 51  $^{\circ}$ C; corsia 5 = frammento FVEG\_13207.3 amplificato a  $T_o$  di 56  $^{\circ}$ C; corsia 6 = frammento gene housekeeping ( $\beta$ -tubulina) amplificato a  $T_o$  di 57  $^{\circ}$ C.

## 4.2 Analisi di espressione *in vitro*

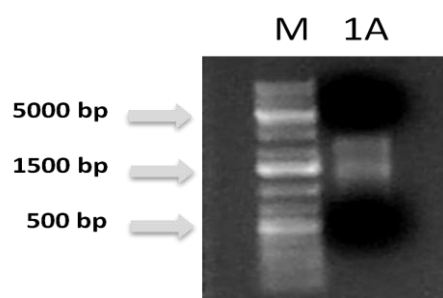
L'analisi di espressione *in vitro* dei geni di *F. verticillioides* codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasasi è stata condotta sia su ceppo PD (A), sia su ceppo 1376 (B), entrambi allevati su terreno liquido per 3 e 4 giorni.

### 4.2.1 *F. verticillioides* ceppo PD (A) dopo 3 giorni di coltura

#### Quantificazione RNA

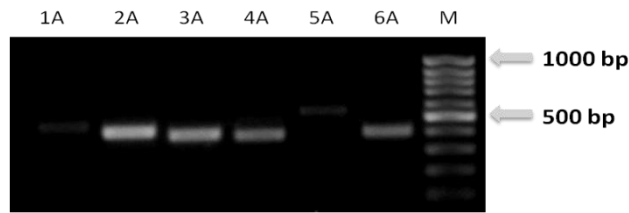
(Fig. 4.2)

Campione RNA ( <i>vitro</i> )	Assorbanza (260 nm)	Concentrazione [ng/ $\mu$ l]	$\mu$ l caricati su gel
<b><i>F. v. PD</i></b> <b>3 giorni</b>	0,068	272	3



**Figura 4.2** Corsa elettroforetica su gel di agarosio (1%) di 3  $\mu$ l di RNA estratto da *F. verticillioides* ceppo PD (A) allevato per 3 giorni in un mezzo di coltura minimale inducente attività xilanasica. Corsia M = 1Kb DNA Ladder plus (Fermentas); corsia 1A = 3  $\mu$ l RNA.

## RT-PCR



**Figura 4.3** Gel agarosio (1%) con frammenti amplificati ottenuti da cDNA di *F. verticillioides* ceppo PD (A) allevato per 3 giorni in un terreno minimale inducente attività xilanasica; per ogni corsia sono stati caricati 10  $\mu$ l di prodotto PCR. Corsia 1A = frammento FVEG\_11849.3 amplificato a  $T_o$  di 51 °C; corsia 2A = frammento FVEG\_13343.3 amplificato a  $T_o$  di 56 °C; corsia 3A = frammento FVEG\_08828.3 amplificato a  $T_o$  di 53 °C; corsia 4A = frammento FVEG\_07261.3 amplificato a  $T_o$  di 51 °C; corsia 5A = frammento FVEG\_13207.3 amplificato a  $T_o$  di 56 °C; corsia 6A = frammento gene housekeeping ( $\beta$ -tubulina) amplificato a  $T_o$  di 57 °C; corsia M = 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

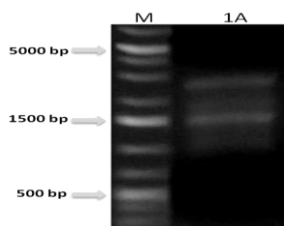
Con la reazione RT-PCR si sono amplificate le cinque endo- $\beta$ -1,4-xilanasie selezionate di *F. verticillioides* ceppo PD (A), allevato su terreno minimale liquido (MM) contenente xilano di larice (0,5%) come unica fonte di carbonio. Dopo 3 giorni di crescita la xilanasia FVEG\_13343.3 è risultata la più espressa tra le cinque (corsia 2A), seguita da FVEG\_08828.3 (corsia 3A) e FVEG\_07261.3 (corsia 4A). Viceversa risultano debolmente espresse le xilanasie FVEG\_11849.3 e FVEG\_13207.3 (corsie 2A e 2B rispettivamente) (**Figura 4.3**).

### 4.2.2 *F. verticillioides* ceppo PD (A) dopo 4 giorni di coltura

#### Quantificazione RNA

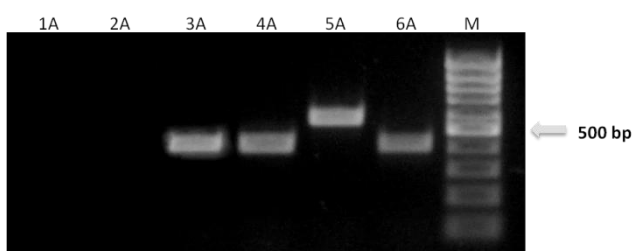
(Fig. 4.4)

Campione RNA ( <i>vitro</i> )	Assorbanza (260 nm)	Concentrazione [ng/ $\mu$ l]	$\mu$ l caricati su gel
<i>F. v. PD</i> 4 giorni	0,096	384	2



**Figura 4.4** Corsa elettroforetica su gel di agarosio (1%) di RNA estratto da *F. verticillioides* ceppo PD (A) allevato per 4 giorni in un mezzo di coltura minimale, inducente attività xilanasi. Corsia M = 1Kb DNA Ladder plus (Fermentas); corsia 1A = 2  $\mu$ l RNA.

### RT-PCR



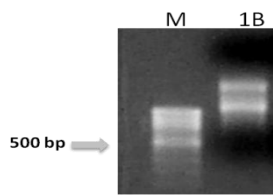
**Figura 4.5** Gel agarosio (1%) con frammenti amplificati ottenuti da cDNA di *F. verticillioides* ceppo PD (A) allevato per 4 giorni in un terreno minimale inducente attività xilanasi. Corsia 1A = frammento FVEG\_11849.3 amplificato a  $T_a$  di 51  $^{\circ}$ C; corsia 2A = frammento FVEG\_13343.3 amplificato a  $T_a$  di 56  $^{\circ}$ C; corsia 3A = frammento FVEG\_08828.3 amplificato a  $T_a$  di 53  $^{\circ}$ C; corsia 4A = frammento FVEG\_07261.3 amplificato a  $T_a$  di 51  $^{\circ}$ C; corsia 5A = frammento FVEG\_13207.3 amplificato a  $T_a$  di 56  $^{\circ}$ C; corsia 6A = frammento gene housekeeping ( $\beta$ -tubulina) amplificato a  $T_a$  di 57  $^{\circ}$ C; corsia M = 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

A 4 giorni dall'inizio della coltura le xilanasi FVEG\_11849.3 (1A) e FVEG\_13343.3 (2A) di *F. verticillioides* (A) non risultano espresse (**Figura 4.5**). In particolare il trascritto della xilanasi FVEG\_13343.3 (2A), visibile a 3 giorni, non è più rilevabile il giorno successivo. Viceversa le xilanasi FVEG\_08828.3 (3A), FVEG\_07261.3 (4A) e FVEG\_13207.3 (5A) sono risultate maggiormente espresse anche a 4 giorni. Tra queste, i trascritti delle xilanasi FVEG\_08828.3 (3A) e FVEG\_13207.3 (5A) si sono rilevati i più abbondanti.

#### 4.2.3 *F. verticillioides* ceppo 1376 (B) dopo 3 giorni di coltura

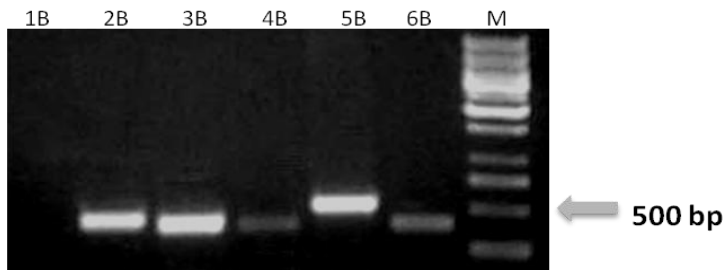
##### Quantificazione RNA (Fig. 4.6)

Campione RNA ( <i>vitro</i> )	Assorbanza (260 nm)	Concentrazione [ng/ $\mu$ l]	$\mu$ l caricati su gel
<b>F. v. 1376</b>	0,181	724	1,1
<b>3 giorni</b>			



**Figura 4.6** Corsa elettroforetica su gel di agarosio (1%) di RNA estratto da *F. verticillioides* ceppo 1376 (B) allevato per 3 giorni in un mezzo di coltura minimale inducente attività xilanasica. Corsia M = 100 bp DNA Ladder (Fermentas); corsia 1B = 1,1  $\mu$ l RNA.

### RT-PCR



**Figura 4.7** Gel agarosio (1%) con frammenti amplificati ottenuti da cDNA di *F. verticillioides* ceppo 1376 (B) allevato per 3 giorni in un terreno minimale inducente attività xilanasica; per ogni corsia sono stati caricati 10  $\mu$ l di prodotto PCR. Corsia 1B= frammento FVEG\_11849.3 amplificato a  $T_o$  di 51  $^{\circ}$ C; corsia 2B = frammento FVEG\_13343.3 amplificato a  $T_o$  di 56  $^{\circ}$ C; corsia 3B = frammento FVEG\_08828.3 amplificato a  $T_o$  di 53  $^{\circ}$ C; corsia 4B = frammento FVEG\_07261.3 amplificato a  $T_o$  di 51  $^{\circ}$ C; corsia 5B = frammento FVEG\_13207.3 amplificato a  $T_o$  di 56  $^{\circ}$ C; corsia 6B = frammento gene housekeeping ( $\beta$ -tubulina) amplificato a  $T_o$  di 57  $^{\circ}$ C; corsia M = 1Kb DNA Ladder (Fermentas).

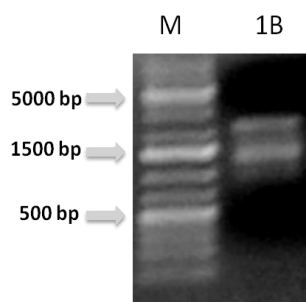
A 3 giorni dall'inizio della coltura *in vitro* di *F. verticillioides* ceppo 1376 (B), le xilanasie FVEG\_08828.3 e FVEG\_13207.3 (**Figura 4.7**; 3B e 5B rispettivamente;) sono risultate le pi $\grave{u}$  espresse, seguite dalla xilanasie FVEG\_13343.3 (2B). Viceversa il trascritto della xilanasie FVEG\_11849.3 (1B) non  $\grave{e}$  rilevabile mentre  $\grave{e}$  risultata debolmente espressa la xilanasie FVEG\_07261.3 (4B).



#### 4.2.4 *F. verticillioides* ceppo 1376 (B) dopo 4 giorni di coltura

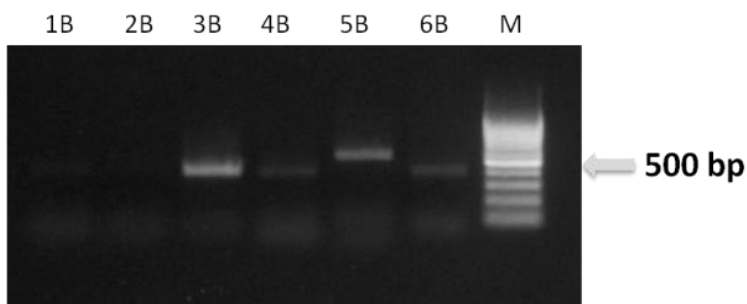
##### Quantificazione RNA (Fig. 4.8)

Campione RNA ( <i>vitro</i> )	Assorbanza (260 nm)	Concentrazione [ng/μl]	μl caricati su gel
<b><i>F. v. 1376</i> 4 giorni</b>	0,102	408	2



**Figura 4.8** Corsa elettroforetica su gel di agarosio (1%) di RNA estratto da *F. verticillioides* ceppo 1376 (B) allevato per 4 giorni in un mezzo di coltura minimale, inducente attività xilanasica. Corsia M = 1Kb DNA Ladder plus (Fermentas); corsia 1B = 2 μl RNA.

##### RT-PCR



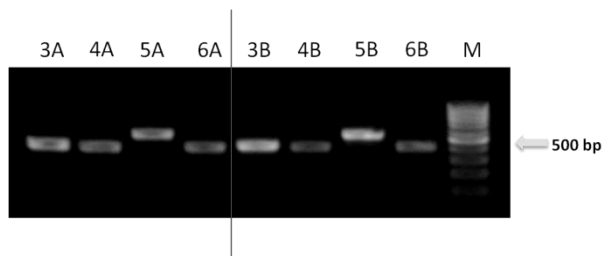
**Figura 4.9** Gel agarosio (1%) con frammenti amplificati ottenuti da cDNA di *F. verticillioides* ceppo 1376 (B) allevato per 4 giorni in un terreno minimale inducente attività xilanasica; per ogni corsia sono stati caricati 10 μl di prodotto PCR. Corsia 1B= frammento FVEG\_11849.3 amplificato a  $T_o$  di 51 °C; corsia 2B = frammento FVEG\_13343.3 amplificato a  $T_o$  di 56 °C; corsia 3B = frammento FVEG\_08828.3 amplificato a  $T_o$  di 53 °C; corsia 4B = frammento FVEG\_07261.3 amplificato a  $T_o$  di 51 °C; corsia 5B = frammento FVEG\_13207.3 amplificato a  $T_o$  di 56 °C; corsia 6B = frammento gene housekeeping ( $\beta$ -tubulina) amplificato a  $T_o$  di 57 °C; corsia M = 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

Per quanto riguarda il ceppo di *F. verticillioides* 1376 (B), l'analisi di espressione dei geni codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasi dopo 4 giorni di coltura in terreno minimale liquido (MM), ha mostrato un profilo di espressione abbastanza simile a quello osservato con il ceppo

PD (A) (**Figura 4.9**). Due dei cinque geni analizzati, FVEG\_08828.3 e FVEG\_13207.3 (3B e 5B rispettivamente), sono risultati chiaramente espressi dopo 4 giorni di coltura, mentre il gene FVEG\_07261.3 (4B) è risultato debolmente trascritto. Per quanto riguarda i geni FVEG\_11849.3 e FVEG\_13343.3 (1B e 2B rispettivamente) il loro trascritto non è stato rilevato. Il gene FVEG\_13343.3 (2B) ha inoltre mostrato similmente al ceppo PD (A) un profilo caratteristico, in quanto è risultato particolarmente espresso dopo 3 giorni di coltura ma il suo trascritto non è stato più rilevabile il giorno successivo.

Successivamente si è eseguita una RT-PCR allo scopo di comparare i due ceppi di *F. verticillioides* (A e B) per l'espressione delle tre endo- $\beta$ -1,4-xilanasi espresse dopo 4 giorni di coltura *in vitro* (**Figura 4.10**). Non sono state prese in considerazione le xilanasi FVEG\_11849.3 e FVEG\_13343.3 in quanto al quarto giorno di coltura non risultavano espresse.

L'analisi di espressione ha confermato che entrambi i ceppi esprimono maggiormente le sequenze FVEG\_08828.3 (3A e 3B rispettivamente) e FVEG\_13207.3 (5A e 5B rispettivamente).



**Figura 4.10** Gel di agarosio 1% con frammenti di cDNA amplificati di *F. verticillioides* ceppi PD (A) e 1376 (B). Corsia 3A = frammento FVEG\_08828.3 amplificato a  $T_o$  di 53 °C; corsia 4A = frammento FVEG\_07261.3 amplificato a  $T_o$  di 51 °C; corsia 5A = frammento FVEG\_13207.3 amplificato a  $T_o$  di 56 °C; corsia 6A = frammento gene housekeeping ( $\beta$ -tubulina) amplificato a  $T_o$  di 57 °C.

Corsia 3B = frammento FVEG\_08828.3 amplificato a  $T_o$  di 53 °C; corsia 4B = frammento FVEG\_07261.3 amplificato a  $T_o$  di 51 °C; corsia 5B = frammento FVEG\_13207.3 amplificato a  $T_o$  di 56 °C; corsia 6B = frammento gene housekeeping ( $\beta$ -tubulina) amplificato a  $T_o$  di 57 °C; Corsia M = 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

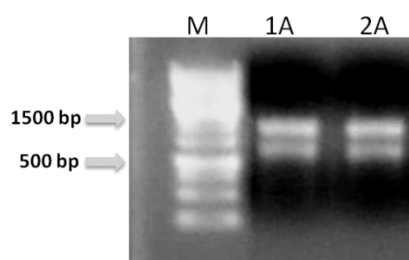
## 4.3 Analisi di espressione *in vivo*

### 4.3.1 *F. verticillioides* ceppo PD (A) a 5 giorni dall'inoculo

Poiché le plantule di mais non manifestavano sintomi chiaramente visibili a 3 e 4 giorni dall'infezione con *F. verticillioides* ceppo PD (A), per l'analisi di espressione si sono utilizzati tessuti di mais infetti recuperati dopo 5 giorni dall'inoculo.

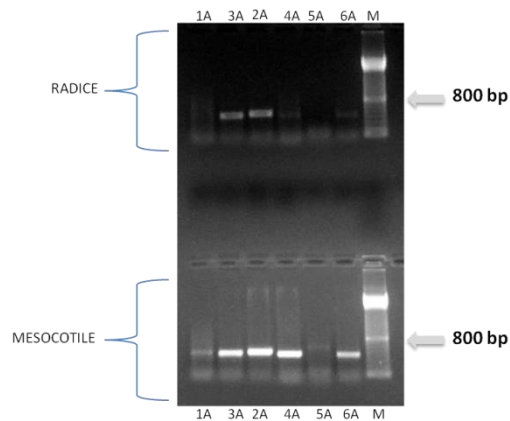
#### Quantificazione RNA (Fig. 4.11)

Campione RNA ( <i>vivo</i> )	Assorbanza (260 nm)	Concentrazione [ng/μl]	μl caricati su gel
<b>Radice-F.v PD</b> <b>5 giorni</b>	0,052	208	4
<b>mesocotile-F.v PD</b> <b>5 giorni</b>	0,048	192	4,2



**Figura 4.11** Corsa elettroforetica su gel di agarosio (1%) di RNA estratto da tessuti di mais infettati con *F. verticillioides* ceppo PD (A) da 5 giorni. Corsia M = 1Kb DNA Ladder (Fermentas); corsia 1A = 4 μl RNA estratto dalla radice (2° eluizione); corsia 2A = 4,2 μl RNA estratto dal mesocotile (2° eluizione).

## RT-PCR



**Figura 4.12** Gel agarosio (1%) con frammenti amplificati ottenuti da tessuto di mais infetto con *F. verticillioides* ceppo PD (A) da 5 giorni; per ogni corsia sono stati caricati 10  $\mu$ l di prodotto PCR. Corsia 1A = frammento FVEG\_11849.3 amplificato a  $T_a$  di 51 °C; corsia 3A = frammento FVEG\_08828.3 amplificato a  $T_a$  di 53 °C; corsia 2A = frammento FVEG\_13343.3 amplificato a  $T_a$  di 56 °C; corsia 4A = frammento FVEG\_07261.3 amplificato a  $T_a$  di 51 °C; corsia 5A = frammento FVEG\_13207.3 amplificato a  $T_a$  di 56 °C; corsia 6A = frammento gene housekeeping ( $\beta$ -tubulina) amplificato a  $T_a$  di 57 °C; corsia M = 100 bp DNA Ladder (Pharmacia).

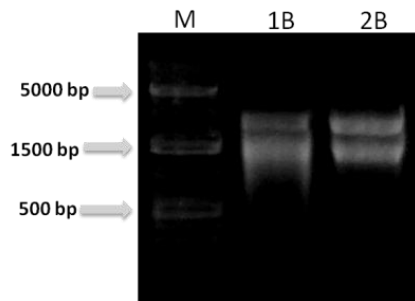
Trascorsi 5 giorni dall'inoculo con *F. verticillioides* ceppo PD (A), il mesocotile è risultato il tessuto maggiormente colonizzato; infatti, il trascritto del gene *housekeeping* FVEG\_04081.3 della  $\beta$ -tubulina (corsie 6A) è risultato più abbondante in questo tessuto rispetto alle radici (**Figura 4.12**).

In radice, i geni FVEG\_13343.3 (2A) e FVEG\_08828.3 (3A) sono risultati i più espressi. Viceversa, il gene FVEG\_07261.3 (4A) è risultato debolmente espresso, mentre non sono rilevabili i trascritti di FVEG\_11849.3 (1A) e FVEG\_13207.3 (5A). Nel mesocotile i geni FVEG\_13343.3, FVEG\_08828.3 e FVEG\_07261.3 si sono mostrati fortemente espressi, mentre i trascritti dei geni FVEG\_11849.3 e FVEG\_13207.3 sono risultati solo debolmente visibili. In particolare il trascritto del gene FVEG\_13343.3 (2A) risulta essere il più abbondante; è inoltre interessante notare che il gene FVEG\_07261.3 (4A), non espresso nella radice, è trascritto ad elevati livelli nel tessuto del mesocotile.

4.3.2 *F. verticillioides* ceppo 1376 (B) a 4 giorni dall'inoculo

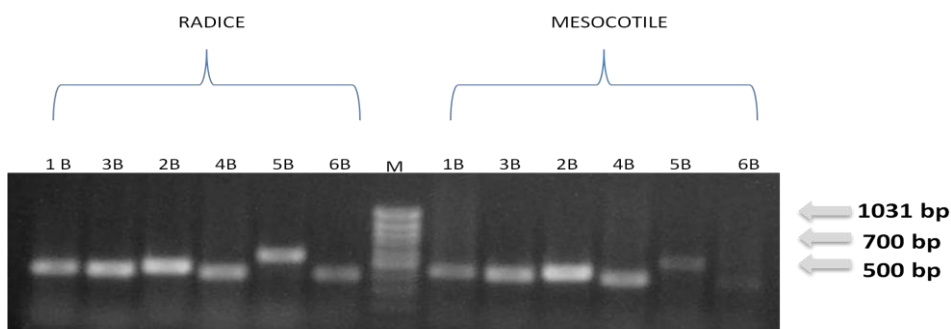
Quantificazione RNA (Fig. 4.13)

Campione RNA (vivo)	Assorbanza (260 nm)	Concentrazione [ng/μl]	μl caricati su gel
<b>Radice-F.v 1376</b> <b>4 giorni</b>	0,072	288	3
<b>mesocotile-F.v 1376</b> <b>4 giorni</b>	0,050	200	1,5



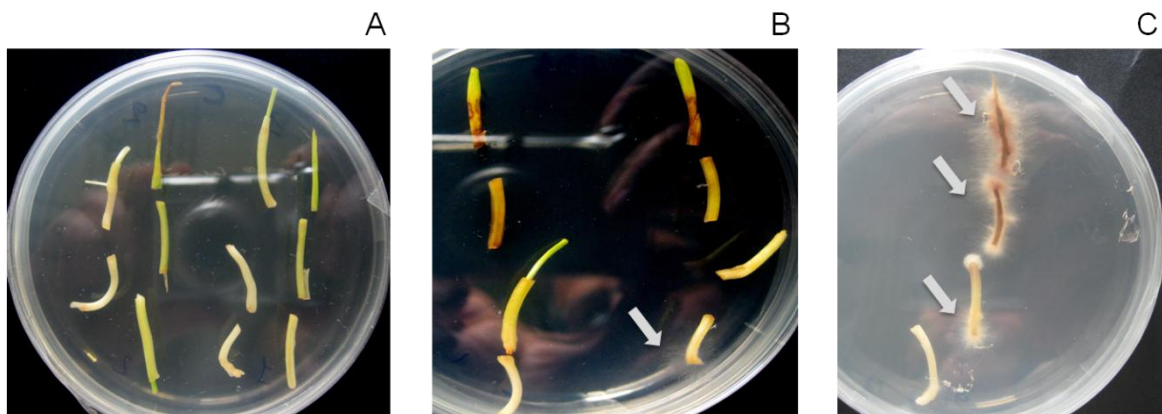
**Figura 4.13** Corsa elettroforetica su gel di agarosio (1%) di RNA estratto da tessuto di mais infettato da 4 giorni con *F. verticillioides* ceppo 1376 (B). Corsia M = 1Kb DNA Ladder (Fermentas); corsia 1B = 3 μl RNA estratto dalla radice (1° eluizione); corsia 2B = 1,5 μl RNA estratto dal mesocotile (2° eluizione).

RT-PCR



**Figura 4.14** Gel agarosio (1%) con frammenti amplificati ottenuti da tessuto di mais infetto con *F. verticillioides* ceppo 1376 (B) da 4 giorni; per ogni corsia sono stati caricati 10 μl di prodotto PCR. Corsia 1B= frammento FVEG\_11849.3 amplificato a  $T_o$  di 51 °C; corsia 3B = frammento FVEG\_08828.3 amplificato a  $T_o$  di 53 °C; corsia 2B = frammento FVEG\_13343.3 amplificato a  $T_o$  di 56 °C; corsia 4B = frammento FVEG\_07261.3 amplificato a  $T_o$  di 51 °C; corsia 5B = frammento FVEG\_13207.3 amplificato a  $T_o$  di 56 °C; corsia 6B = frammento gene housekeeping ( $\beta$ -tubulina) amplificato a  $T_o$  di 57 °C; corsia M = 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

Il ceppo 1376 (B) di *F. verticillioides* è risultato più virulento del ceppo PD (A) in quanto già dopo 4 giorni dall'inoculo erano apprezzabili i sintomi dell'infezione sui tessuti di mais (**Figura 4.15**). A parità di RNA caricato (**Figura 4.13**), il trascritto del gene *housekeeping* della  $\beta$ -tubulina è risultato più evidente nella radice rispetto al mesocotile (**Figura 4.14**, corsie 6B rispettivamente); ciò suggerisce una maggiore colonizzazione della radice da parte del fungo rispetto al mesocotile (6B). Tutti i geni codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasi analizzati sono risultati espressi sia in radice che nel mesocotile, seppur con differenti livelli di intensità (**Figura 4.14**). In entrambi i tessuti il trascritto del gene FVEG\_13343.3 (2B) è risultato il più abbondante. Inoltre, in radice tutti gli altri geni analizzati sono risultati espressi a livelli elevati e comparabili, mentre nel mesocotile FVEG\_11849.3, e FVEG\_13207.3 (1B e 5B, rispettivamente) sono apparsi meno espressi.



**Figura 4.15** Piastre contenenti un terreno nutritivo agarizzato con porzioni di germoglio di mais non inoculato (A); inoculato con *F. verticillioides* ceppo PD (B); inoculato con *F. verticillioides* ceppo 1376 (C). Le frecce indicano il micelio del fungo.

## 4.4 Riassunto dei profili di espressione delle xilanasi di *F. verticillioides*.

### Espressione *in vitro*

GENE	PD→ 3 GIORNI	PD→ 4 GIORNI	1376→ 3 GIORNI	1376→ 4 GIORNI
11849	+	-	-	-
13343	++++	-	++	-
08828	+++	+	+++	+++
07261	++	+++	+	+
13207	+	+++	+++	++
β-Tub	++	++	+	+

Tabella 4.1. Risultati dell'espressione genica di *F.v.* PD e 1376 *in vitro*.

### Espressione *in vivo*

GENE	RADICE		MESOCOTILE	
	PD→ 5 GIORNI	1376→ 4 GIORNI	PD→ 5 GIORNI	1376→ 4 GIORNI
11849	-	++	+	+
13343	+++	+++	+++	+++
08828	++	++	++	++
07261	+	++	++	++
13207	-	++	-	+
β-Tub	+	+	++	-

Tabella 4.2. Risultati dell'espressione genica di *F.v.* PD e 1376 *in vivo*.

## 5. DISCUSSIONE

*Fusarium verticillioides* è un fungo fitopatogeno necrotrofo in grado di infettare numerose piante ospiti quali, mais, riso, sorgo, asparago, frumento e avena (Bacon *et al.*, 1996). Pur non essendo il principale patogeno del mais, questo fungo è particolarmente studiato in quanto produce metaboliti secondari tossici per gli animali, compreso l'uomo (Munkvold 2003; Bacon *et al.*, 2008). In particolare, in seguito a situazioni di stress della pianta, *F. verticillioides* sintetizza tossine come la fumonisina B<sub>1</sub> (Yates *et al.*, 1999), un inibitore dell'attività dell'enzima *ceramide sintetasi*, responsabile del metabolismo dei lipidi di membrana. Inoltre la tossina risulta in grado di provocare nell'uomo malattie come il cancro all'esofago (Marasas, 1995), difetti al tubo neurale e alterazioni al regolare sviluppo del feto (Etzel, 2002). Il fungo *F. verticillioides* riesce a colonizzare la specie vegetale ospite attraverso seme endofiticamente infetto (Bacon e Hinton, 1996), oppure attraverso l'infezione delle setole della spiga (Desjardins *et al.*, 2000) o ancora sfruttando le lesioni provocate dal lepidottero piralide (Maiorano *et al.* 2009). Tuttavia fino ad oggi non è ancora stata chiarita una modalità di colonizzazione diretta dell'ospite da parte del fungo. Poiché la parete cellulare dell'ospite costituisce il primo ostacolo alla penetrazione, è probabile che il fungo secerna degli enzimi in grado di depolimerizzare i componenti della parete cellulare ospite. Tra questi enzimi, noti come *CWDE*, figurano le endo- $\beta$ -1,4-xilanasi responsabili dell'idrolisi dello xilano, il principale costituente delle emicellulose. Poiché la parete primaria delle cellule delle specie monocotiledoni è ricca in xilano (Wong, *et al.* 1998), le endo- $\beta$ -1,4-xilanasi di *F. verticillioides* potrebbero rivestire un ruolo importante nella penetrazione dei tessuti dell'ospite.

Con il completo sequenziamento del genoma del fungo è stato possibile identificare numerosi geni coinvolti nella degradazione dello xilano, e tra questi, dopo analisi *in silico*, sono stati selezionati cinque geni codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasi.

Nella presente tesi, si è voluto quindi caratterizzare l'espressione genica di queste cinque sequenze codificanti endo- $\beta$ -1,4-xilanasi in due differenti condizioni sperimentali. Inizialmente l'espressione è stata studiata *in vitro* allevando per alcuni giorni due ceppi del fungo (*PD* e *1376*) in un mezzo di coltura minimale liquido contenente xilano come unica fonte di carbonio allo scopo di indurre l'attività xilanasi. Successivamente si è cercato di riprodurre in laboratorio l'interazione *mais-F. verticillioides* inoculando porzioni di tessuto, in particolare radici e mesocotili, con spore dei due ceppi del fungo. Per lo



studio di espressione, i tessuti inoculati sono stati recuperati dopo alcuni giorni dall'inizio del processo infettivo. L'analisi di espressione è stata condotta utilizzando la tecnica di RT-PCR che, pur non essendo quantitativa, fornisce informazioni sui geni maggiormente espressi in una determinata condizione.

Per quanto riguarda l'analisi dell'espressione *in vitro* è stato possibile osservare alcune similarità tra i due ceppi di *F. verticillioides*. In particolare la xilanasi FVEG\_08828.3 è risultata mediamente la più espressa dai due ceppi sia dopo 3 che dopo 4 giorni di coltura. La xilanasi FVEG\_13343.3 invece, ha mostrato un profilo di espressione caratteristico, in quanto è risultata tra le più espresse dopo 3 giorni di coltura, mentre al quarto giorno il suo trascritto non è stato più rilevato. Si è inoltre osservato che la xilanasi meno espressa durante la coltura dei due ceppi di *F. verticillioides* è FVEG\_11849.3.

Si sono tuttavia osservate anche alcune differenze di espressione tra i due ceppi. Confrontando infatti l'espressione delle xilanasi FVEG\_13207.3, si è osservato che mentre il ceppo 1376 (B) manteneva elevati livelli di espressione del gene ad entrambi i tempi analizzati, il ceppo PD (A) mostrava un'induzione della trascrizione del gene dal terzo al quarto giorno di coltura. In questo caso, non si può escludere un'induzione dovuta a oligomeri di xilano liberati dalla parziale degradazione della parete cellulare dell'ospite durante la prima fase del processo infettivo. Infine, a differenza del ceppo 1376, il ceppo PD ha espresso elevate quantità della xilanasi FVEG\_07261.3.

Gli esperimenti di infezione di plantule di mais hanno consentito inizialmente di constatare la maggior virulenza del ceppo 1376 rispetto al ceppo PD; infatti radici e mesocotili sono risultati maggiormente colonizzati dal micelio del ceppo 1376 (B). Per questo motivo, l'analisi di espressione *in vivo* è stata compiuta recuperando i tessuti di mais infetti a due tempi differenti: i tessuti inoculati con il ceppo 1376 sono stati recuperati dopo 4 giorni, con il ceppo PD dopo 5.

Osservando i livelli del trascritto della  $\beta$ -tubulina, si può ipotizzare che il ceppo PD (A) colonizzi con più facilità il tessuto del mesocotile rispetto alle radici. Nei tessuti del mesocotile, il fungo ha espresso elevate quantità del trascritto della xilanasi FVEG\_13343.3, e dei trascritti delle xilanasi FVEG\_08828.3 e FVEG\_07261.3. Le xilanasi FVEG\_13343.3 e FVEG\_08828.3 sono risultate inoltre le uniche chiaramente trascritte in radice tra le cinque sequenze analizzate, sebbene abbiano mostrato livelli di espressione meno elevati rispetto al mesocotile.

Diversamente, sempre in base ai livelli di  $\beta$ -tubulina rilevati nei tessuti infetti, il ceppo 1376 (B), appare in grado di colonizzare più facilmente il tessuto della radice. Tutte le endoxilanasasi analizzate hanno mostrato livelli elevati di espressione in entrambi i tessuti, sebbene il trascritto FVEG\_13343.3 sia risultato comunque il più abbondante. Poiché il trascritto di questa xilanasasi è risultato il più espresso da ambedue i ceppi di *F. verticillioides*, in prospettiva futura esperimenti di *knock-out* sito-specifico potrebbero contribuire a far chiarezza sul ruolo di questa xilanasasi nella virulenza del fungo.

Oltre alla xilanasasi FVEG\_13343.3 è stato possibile rilevare una buona espressione anche delle xilanasasi FVEG\_08828.3 e FVEG\_07261.3. In particolare, la xilanasasi FVEG\_08828.3 è molto simile alla xilanasasi *Xyn11A* di *B. cinerea*, dimostrata agire come fattore di necrosi (Noda *et al.*, 2010) ed è risultata espressa da entrambi i ceppi in tutti i tessuti infetti. Resta da chiarire se questa xilanasasi svolga effettivamente un ruolo durante il processo infettivo. Per verificare la capacità di questa xilanasasi di indurre necrosi si potrà esprimere la proteina nel sistema eterologo *Pichia pastoris*. Successivamente, infiltrando nei tessuti di mais la proteina purificata sarà possibile stabilire l'eventuale attività necrotizzante di questa xilanasasi.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Abbas, H.K., Cartwright, R.D., Shier, W.T., 2006. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Prot.* **25**: 1–9.

Apel, P.C., Panaccione, D.G., Holden, F.R., and Walton, J.D. (1993) Cloning and targeted gene disruption of *XYL1*, a  $\beta$ 1,4-xylanase gene from the maize pathogen *Cochliobolous carbonum*. *Mol Plant Microbe Interact.* **6**: 467–473.

Bacon, C.W., Nelson, P.E., 1994. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *J. Food Prot.* **57**: 514–521.

Bacon, C.W., Hinton, D.M., 1996. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Can. J. Bot.* **74**: 1195–1202.

Bacon, C. W., J. K. Porter, W. P. Norred, and J. F. Leslie. (1996). Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4039–4043.

Biely, P., Markovic, O. and Mislovicova, D. (1985). Sensitive detection of endo-1,4-beta-glucanases and endo-1,4-beta-xylanases in gels. *Anal. Biochem.* **144**: 147–151.

Brito N., Espino J.J., and Gonzalez C., 2006. The endo- $\beta$ -1,4-xylanase *Xyn11A* is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *Mol plant microbe interact* **19**: 25-32.

Burgess, L.W., 1981. General ecology of the fusaria. In: Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Cook, R.J. (Eds.), *Fusarium, Disease, Biology, and Taxonomy*. The Penn State University Press, University Park, PA, pp. 225–235.

Collins T., Gerday C. and Feller G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* **29** (2005): 3–23.

Cooper R.M., Longman D., Campbell A., Henry M. and Lees P.E. (1988). Enzymic adaptation of cereal pathogens to the monocotyledonous primary wall. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **32**: 33–47.

Coughlan M.P., Hazlewood G.P. (1993). *Hemicellulose and Hemicellulases*. London: Portland Press Ltd.

Desai, K., Sullards, M. C., Allegood, J., Wang, E., Schmelz, E. M., Hartl, M., Humpf, H. U., Liotta, D. C., Peng, Q., and Merrill, A. H. (2002). Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta—Mol. Cell Biol. Lipids* **1585**:188-192.

Desjardins A.E., Plattner R.D., Gordon T.R.. *Gibberella fujikuroi* mating population A and *Fusarium subglutinans* from teosinte species and maize from Mexico and Central America. *Mycol. Res.* (2000). **104**: 865–872.

Dowd, P.F. (1998). Involvement of arthropods in the establishment of mycotoxigenic fungi under field conditions. Pages: 307-350 in: *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. K.K. Sinha and D. Bhatnagar, eds. Marcel Dekker, New York.

Dowd, P.F., 2003. Insect management to facilitate preharvest mycotoxin management. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **22**: 327–350.

Etzel, R. A. 2002. Mycotoxins. *JAMA (J. Am. Med. Assoc.)* **287**:425-427.

Gomez-Gomez, E., Roncero, M.I.G., Di Pietro, A., and Hera, C. (2001). Molecular characterization of a novel endo- $\beta$ -1,4-xylanase gene from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Curr Genet* **40**: 268–275.

Ha, G.S., I.D. Choi, and Y.J. Choi. (2001). Carbon catabolite repression (CCR) of expression of the xylanase. A gene of *Bacillus stearothermophilus* No. 236. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 131-137.

Headrick, J.M., Pataky, J.K., Juvik, J.A., 1990. Relationships among carbohydrate content of kernels, condition of silks after pollination, and the response of sweet corn inbred lines to infection of kernels by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*. **80**: 487–494.

Hoenisch R.W., Davis R.M., 1994. Relationship between kernel pericarp thickness and susceptibility to *Fusarium* ear rot in field corn. *Plant Dis*. **78**: 517–519.

Howard P.C., Eppley R.M., Stack M. E., Warbritton A., Voss K.A., Lorentzen R.J., Kovach R.M., and Bucci T.J. (2001). Fumonisin B-1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F(1) mice. *Environ. Health Perspect.* (Suppl. 2) **109**: 277-282.

Yates I.E., Hiett K.L., Kapczynski D.R., Smart W., Glenn A.E., Hinton D.M., Bacon C.W., Meinersmann R., Liu S., Jaworski A.J., 1999a. GUS transformation of the maize fungal endophyte *Fusarium moniliforme*. *Mycol. Res.* **103**: 129–136.

Yates I.E., Meredith F.M., Smart W., Bacon C.W., Jaworski A.J., 1999b. Trichoderma viride suppresses fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme*. *J. Food Prot.* **62**: 1326–1332.

Yates I.E., Jaworski A.J., 2000. Differential growth of *Fusarium moniliforme* relative to tissues from 'Silver Queen', a sweet maize. *Can. J. Bot.* **78**: 472–480.

Kim H.Y. and Y.J. Choi. (2000). Regulation of cycloinulooligosaccharide fructanotransferase synthesis in *Bacillus macerans* and *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 877-880.

Koehler B., 1942. Natural mode of entrance of fungi into corn ears and some symptoms that indicate infection. *J. Agric. Res.* **64**: 421–442.

Kriek N.P.J., T. S. Kellerman and W.F.O. Marasas, 1981. A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **48**: 129–131.

Leslie JF (1996) Introductory biology of *Fusarium moniliforme*. *Adv Exp Med Biol.* **392**: 153–164.

Lonnie D.W., Glenn A.E., Zimeri A.M., Bacon C.W., Smith M.A., Riley R.T. (2007). Fumonisin Disruption of Ceramide Biosynthesis in Maize Roots and the Effects on Plant Development and *Fusarium verticillioides*-Induced Seedling Disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. **55**. N° 8.

Maiorano A., Reyneri A., Sacco D., Magni A. and Ramponi, C. (2009). A dynamic risk assessment model (FUMAgrain) of fumonisin synthesis by *Fusarium verticillioides* in maize grain in Italy. *Crop Prot.* **28**: 243-256.

Marasas, W.F.O. (1995). Fumonisin: their implications for human and animal health. *Nat. Toxins* **3**: 193–19.

Min S.Y., Kim B.G., Lee C., Hur H.G. and Ahn J.H., 2002. Purification, characterization, and cDNA cloning of xylanase from fungus *Trichoderma* strain SY. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* **12**: 890-894.

Munkvold G.P., Desjardins AE. Fumonisin in maize, can we reduce their occurrence? *Plant. Dis.* 1997. **81**: 556–565.

Munkvold G.P. and Hellmich R. L., 2000. Genetically modified, insect resistant maize: implications for management of ear and stalk diseases. *Plant Health Prog.* doi: 10.1094/PHP-2000-0912-01-RV. Published online.

Munkvold G.P. (2003). Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**: 99-116.

Nelson P.E., Plattner R.D., Shackelford D.D. and Desjardins A.E. (1992), "Fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section Liseola and by some related species", *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 984-989.

Nelson P.E., Desjardins A.E. & Plattner R.D. (1993) Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annu Rev Phytopathol.* **31**: 233–252.

Nguyen Q.B., Itoh K., Vu B.V., Tosa Y., and Nakayashiki H. (2011) Simultaneous silencing of endo- $\beta$ -1,4 xylanase genes reveals their roles in the virulence of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Microbiology* **81**: 1008–1019.

Nirenberg H.I., and O'Donnell K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia.* **90**: 434-458.

Noda J., Brito N., and Gonzàles C., 2010. The *Botrytis cinerea* Xylanase Xyn11A contributes to virulence whith its necrotizing activity, not with its catalytic activity. *BMC Plant Biology.* **10**: 38.

Prabhu K.A., Maheshwari R. (1999). Biochemical properties of xylanases from a thermophilic fungus, *Melanocarpus albomyces*, and their action on plant cell walls. *J. Biosci.* **24**: 461-470.

Prade R.A. (1995). Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotech. Genet. Eng. Rev.* **13**: 100–131.

Puhalla J.E., Spieth P.T., 1983. Heterokaryosis in *Fusarium moniliforme*. *Exp. Mycol.* **7**: 328–335.

Rossi V., Scandolara A., and Battilani P. (2009). Effect of environmental conditions on spore production by *Fusarium verticillioides*, the causal agent of maize ear rot. *Eur. J. Plant Pathol.* **123**: 159-169.

Seefelder W., H.-U. Humpf, G. Schwerdt, R. Freudinger and M. Gekle. (2003). Induction of apoptosis in cultured human proximal tubule cells by fumonisins and fumonisin metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **192**: 146-153.

Shephard G.S., Thiel P.G., Stockenstrom S., Sydenham E.W. (1996). Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal of AOAC International.* **79**: 671-687.

Shin J.H., D.H. Roh, G.Y. Heo, G.J. Joo, and I.K. Rhee. (2001). Purification and characterization of a regulatory protein xylR in the D-xylose operon from *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 1002-1010.

Sobek E.A., and Munkvold G.P. (1999). European corn borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. *J. Econ. Entomol.* **92**: 503-509.

Stewart D.W., Reid L.M., Nicol R.W., and Schaafsma A.W. (2002). A mathematical simulation of growth of *Fusarium* in maize ears after artificial inoculation. *Phytopathology.* **92**: 534-541.

Styer R.C., Cantliffe D.J., 1984. Dependence of seed vigor during germination on carbohydrate source in endosperm mutants of maize. *Plant Physiol.* **76**: 196–200.

Sunna A. and Antranikian G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**: 39–67.

Vigier B, Reid L.M., Seifert K.A., Stewart D.W., Halminton R.I. Distribution and prediction of *Fusarium* species associated with maize ear rot in Ontario. *Can. J. Plant Pathol* (1997). **19**: 60–65.

Walton J.D. (1994). Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol* **104**: 1113–1118.



Warfield C.Y., and Davis R.M. (1996). Importance of the husk covering on the susceptibility of corn hybrids to *Fusarium* ear rot. *Plant Dis.* **80**: 208-210.

Wilke, A.L., Bronson, C.R., Tomas, A., and Munkvold, G.P. (2007). Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. *Plant Dis.* **91**: 1109-1115.

Wilson T.M., P.F. Ross, D.L. Owens, L.G. Rice, S.A. Green, S.J. Jenkins, and H.A. Nelson. (1992). Experimental reproduction of *ELEM* - a study to determine the minimum toxic dose in ponies. *Mycopathologia*: 115-120.

Wong K.K.Y., Tan L.U.L., Saddler J.N. (1988). Multiplicity of  $\beta$ -1, 4 xylanase in microorganisms functions and applications. *Microbiol. Rev.* **52**: 305-317.

Wu S.C., Ham K.S., Darvill A.G., and Albersheim P. (1997). Deletion of two endo- $\beta$ -1,4-xylanase genes reveals additional isozymes secreted by the rice blast fungus. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 700–708.