



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
FACOLTÀ DI AGRARIA**

Dipartimento di Territorio e Sistemi Agro-Forestali

TESI DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

*Complementazione dell'attività endo-poligalatturonasica (PG) di un mutante  
di *Fusarium graminearum**

Relatore:

**Dott. Luca Sella**

Laureando:

**Alberto Donà**

Matricola n. 595831

ANNO ACCADEMICO 2010- 2011



## INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>5</b>
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>9</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1 Ottenimento del costrutto I</b> .....	<b>11</b>
3.1.1 <i>Amplificazione del gene pgI e delle corrispondenti regioni regolatrici</i> .....	11
3.1.2 <i>Ligasi del frammento amplificato con vettore pGEM-T easy</i> .....	12
3.1.3 <i>Clonaggio del plasmide ricombinante in Escherichia coli</i> .....	12
3.1.4 <i>Estrazione e purificazione del DNA plasmidico ricombinante</i> .....	14
3.1.5 <i>Ottenimento dell'inserto geneticina (Gen)</i> .....	15
3.1.6 <i>Digestione del DNA plasmidico purificato e trattamento con fosfatasi Sap</i> .....	16
3.1.7 <i>Ottenimento del costrutto I e clonaggio in E. coli</i> .....	17
3.1.8 <i>Purificazione del plasmide e ottenimento del costrutto I</i> .....	18
3.1.9 <i>Protoplasting delle cellule fungine di F. graminearum e trasformazione dei protoplasti</i> .....	19
3.1.10 <i>Piastramento dei protoplasti e "overlay"</i> .....	20
3.1.11 <i>Analisi PCR delle colonie fungine trasformate</i> .....	21
<b>3.2 Ottenimento del costrutto II</b> .....	<b>22</b>
3.2.1 <i>Rimozione del frammento contenente il gene pgI con le rispettive regioni regolatrici e clonaggio di un nuovo frammento con promotore più lungo</i> .....	22
3.2.2 <i>Trasformazione di E. coli e ottenimento del costrutto II</i> .....	25
3.2.3 <i>Analisi delle nuove colonie fungine trasformate</i> .....	26
3.2.4 <i>Controllo dell'attività PG mediante saggio Cup Plate</i> .....	27
3.2.5 <i>Controllo dell'attività PG mediante saggio viscosimetrico</i> .....	27

<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Preparazione del costrutto I:.....</b>	<b>29</b>
4.1.1 <i>Amplificazione del gene pg1</i> .....	29
4.1.2 <i>Clonaggio dell'amplificato in pGEM-T Easy</i> .....	30
4.1.3 <i>Estrazione e purificazione del plasmide pGEM-PG1compl</i> .....	31
4.1.4. <i>Amplificazione e purificazione dell'inserto genetica</i> .....	31
4.1.5. <i>Trattamento con Fosfatasi alcalina e clonaggio dell'inserto gen in pGem-PG1compl</i> .....	32
<b>4.2 Trasformazione di <i>F. graminearum</i> per ottenere un mutante codificante per PG1. ....</b>	<b>34</b>
4.2.1 <i>Sviluppo delle colonie trasformate in terreno selettivo contenente genetica</i> ..	34
4.2.2 <i>PCR per la selezione dei funghi trasformati</i> .....	34
4.2.3 <i>Saggio per verificare l'attività poligalatturonasica (PG)</i> .....	35
<b>4.3 Preparazione del costrutto II:.....</b>	<b>36</b>
4.3.1 <i>Excisione del gene pg1 con le rispettivi regioni regolatrici e clonaggio di un nuovo frammento con promotore più lungo</i> .....	36
4.3.2 <i>Ottenimento del costrutto e trasformazione di <i>F. graminearum</i> <math>\Delta</math>PG1</i> .....	36
4.3.3 <i>Verifica espressione dell'attività PG</i> .....	37
<b>5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....</b>	<b>39</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>43</b>

## RIASSUNTO

Durante l'infezione della pianta ospite, i funghi fitopatogeni secernono diversi enzimi degradativi della parete cellulare (CWDE). Tra questi ricoprono un ruolo di primaria importanza le poligalatturonasi (PG). Esse infatti degradano la pectina, uno dei componenti principali della parete cellulare primaria, nonché della lamella mediana. Le PG di alcuni funghi patogeni sono state dimostrate essere fattori di virulenza in numerose interazioni con specie dicotiledoni (Shieh et al., 1997; Isshiki et al., 2001; ten Have et al., 1997), i cui tessuti sono molto ricchi in pectina (Carpita and Gibeaut, 1993). Viceversa, per quanto riguarda le specie monocotiledoni, sebbene contengano un minor quantitativo di pectina a livello della parete cellulare (Carpita and Gibeaut, 1993), è stato dimostrato che due PG di *Claviceps purpurea* sono fattori di patogenicità nell'interazione con la pianta ospite segale (Oeser et al., 2002).

Tra i funghi fitopatogeni che producono attività PG vi è anche *Fusarium graminearum*, l'agente causale della fusariosi della spiga (in inglese "Fusarium Head Blight", FHB), una malattia che colpisce specie cerealicole monocotiledoni come frumento, mais e riso.

In particolare, questo fungo produce elevate quantità di una endo-poligalatturonasi (PG1) sia *in vitro*, in presenza di pectina, che *in vivo* in tessuti di ovario. Tuttavia, il ruolo svolto durante il processo infettivo da PG1 non è ancora stato definito con certezza. Per verificare l'importanza di questo enzima, nel laboratorio dove ho svolto la tesi è stato quindi ottenuto il mutante  $\Delta$ PG1 di *F. graminearum* con gene *pg1* deleto e si è osservata una ridotta virulenza del mutante durante l'infezione di spighe di frumento. E' possibile quindi ipotizzare che questa poligalatturonasi possa essere importante per la virulenza del fungo. Per essere certi dell'importanza della PG1 nell'infezione, è prima necessario complementare l'attività PG del fungo per verificare se viene ripristinata una virulenza simile a quella del fungo WT. In questo modo si potrà dimostrare definitivamente se la diminuzione di virulenza da parte dei mutanti  $\Delta$ PG1 dipende dall'assenza del gene *pg1*.

In questa tesi è stata quindi eseguita la complementazione dei mutanti  $\Delta$ PG1 di *F. graminearum* utilizzando due diversi costrutti con promotori di diverse lunghezze. I mutanti complementati ottenuti sono stati valutati per la presenza del frammento *pg1*, completo di regioni promotrice e terminatrice, e per la ristabilita attività PG. Dall'analisi è emerso che solo i mutanti trasformati con il costrutto contenente il promotore più lungo erano in grado di sviluppare attività PG.



## ABSTRACT

During host plant infection, phytopathogenic fungi produce many cell wall degrading enzymes (CWDE). Among them polygalacturonases (PG) may play a very important role by degrading pectin, one of the primary components of plant cell wall and middle lamella. Some fungal PGs have been shown to be virulence factors in many interactions with dicotyledonous species (Shieh et al., 1997; Isshiki et al., 2001; ten Have et al., 1997), whose tissues are very rich in pectin (Carpita and Gibeaut, 1993). With regard to monocotyledonous species, although they contain less pectin in their cell wall (Carpita and Gibeaut, 1993), two *Claviceps purpurea* PGs have been demonstrated pathogenic factors in the interaction with the host plant rye (Oeser et al., 2002).

Among phytopathogenic fungi producing PG activity, there is *Fusarium graminearum*, the casual agent of Fusarium Head Blight (FHB), a disease affecting many monocotyledonous crops like wheat, maize and rice.

In particular, this fungus produces high amount of an endo-polygalacturonase (PG1) both *in vitro*, in presence of pectin, and *in vivo*, in ovary tissues. However, the role played by PG1 during the infection process has not been clearly defined. To verify the importance of this enzyme, a  $\Delta$ PG1 mutant of *F. graminearum* with the *pg1* gene knocked-out was obtained in the laboratory where I made my thesis and a reduced virulence of this mutant was observed during wheat spikes infection. Therefore it is possible to speculate that this PG could be important for fungal virulence. To fully clarify the relevance of PG1 in the infection process, it is necessary to complement the fungal PG activity in order to verify if the virulence is restored similarly to that of the *Wilde tipe*. In this way it will be possible to conclusively prove that the reduction of virulence of the  $\Delta$ PG1 mutant depends from the lacking of the *pg1* gene.

In my thesis the  $\Delta$ PG1 mutant of *F. graminearum* was complemented by using two different constructs with different promoter length. The complemented mutants obtained were analyzed for the presence of the complete *pg1* encoding sequence together with promoter and terminator regions and for the restored PG activity. The analysis showed that only mutants transformed with the longer promoter were able to secrete PG activity.





## 1. INTRODUZIONE

Il fungo fitopatogeno *Fusarium graminearum* Schwabe è l'agente causale della fusariosi della spiga (in inglese “*Fusarium* Head Blight”, FHB), una delle malattie più studiate in quanto colpisce le tre principali risorse di cibo mondiale: frumento, mais e riso. Questo fungo è un ascomicete che può causare la distruzione del raccolto in poche settimane determinando ingenti perdite economiche.

L'attacco del fungo è favorito se la fioritura e la maturazione del seme coincidono con climi piovosi e umidi, inoltre le spore prodotte possono ricadere sul terreno durante il raccolto, sopravvivendo all'inverno in uno stato di quiescenza (McMullen et al., 1997).

L'infezione avviene a livello delle spighe, *F. graminearum* penetra nell'ospite durante la fase di antesi attraverso l'ovario e colonizza la superficie interna di lemma e palea. Dopo aver superato la cuticola, esso è in grado di diffondere nella spiga in modo sistemico sia in aree intracellulari che in quelle intercellulari (Wanyoike et al., 2002). I danni coinvolgono non solo le infiorescenze, ma anche fusto e radici. I sintomi risultano evidenti: avvizzimento delle spighe, scolorimento e indurimento dei chicchi, marciumi generalizzati (McMullen et al., 1997).

In aggiunta, i semi prodotti dalle piante infette presentano elevati livelli di micotossine, in particolare tricoteceni quali il Deossinivalenolo (DON), un potente inibitore delle sintesi proteica negli eucarioti e molto dannoso per la salute umana e animale. Questa tossina, necessaria per la diffusione del fungo nel rachide, è stata dimostrata essere un fattore di virulenza nell'interazione *F. graminearum* – frumento (Bai et al., 2001).

Per penetrare e colonizzare i tessuti della spiga, *Fusarium graminearum* produce e rilascia numerosi enzimi degradativi della parete cellulare: CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes).

La parete cellulare vegetale è infatti uno dei primi ostacoli che i patogeni delle piante devono superare per penetrare nel tessuto e iniziare l'infezione vera e propria. I patogeni hanno quindi evoluto un complesso sistema di enzimi degradativi della parete cellulare che vengono considerati come fattori chiave nella patogenesi, nonostante non sia stato ancora possibile trarre conclusioni generali riguardo il loro ruolo nel corso dell'infezione. Lo studio di mutanti con delezione o sovraespressione di uno specifico CWDE, non mostra necessariamente variazioni della loro virulenza (Hammer et al., 1997). I patogeni sono in grado di secernere specifici enzimi per ogni componente della parete cellulare

vegetale, nonostante questa possa variare da specie a specie; le tre principali classi di CWDE sono cellulasi, xilanasi e pectinasi. Le prime due agiscono sui componenti polisaccaridici più abbondanti della parete cellulare andando ad idrolizzare i legami della catena polisaccaridica, con varianti di tipi *endo*- (operano un taglio casuale all'interno della catena) o *eso*- (operano il taglio alle estremità).

Le pectinasi vanno a degradare la pectina presente sia nella parete cellulare primaria che nella lamella mediana, uno strato polisaccaridico ricco in pectine, determinando quindi un indebolimento della parete e permettendo agli altri enzimi di attaccare gli strati sottostanti (Wanyoike et al., 2002).

Le pectinasi possono essere classificate in due principali gruppi:

- esterasi: rappresentate dalle pectin metil esterasi (PME) che de-esterificano la pectina rimuovendo i gruppi metilici;
- depolimerasi: rappresentate da poligalatturonasi (PG), pectato liasi (PL) e pectin liasi (PNL) che catalizzano la rottura vera e propria della catena di acido poligalatturonico.

L'azione di questi enzimi è finemente coordinata: in un primo momento agiscono le PME che, demetilesterificando gli omogalatturonani, facilitano la degradazione della pectina da parte di PG, PL e PNL.

Tra le depolimerasi, le PG ricoprono un ruolo di primaria importanza. Queste catalizzano l'idrolisi dei legami  $\alpha$ -1,4 tra i residui di acido galatturonico della pectina e possono essere suddivise in due gruppi principali: le *endo*-poligalatturonasi che degradano la pectina scindendo i legami interni fra le unità di acido galatturonico presenti nella catena polisaccaridica e le *eso*-poligalatturonasi che idrolizzano residui esterni dei polimeri pectici.

Per gli enzimi pectinolitici, come per gli altri CWDE, non è ancora possibile determinare con precisione la loro importanza durante il processo infettivo, nonostante siano alcuni dei primi enzimi ad essere secreti durante le prime fasi dell'infezione. Gli studi hanno infatti portato a risultati contrastanti: la delezione di geni codificanti per poligalatturonasi di *Botrytis cinerea* (ten Have et al., 1998), *Claviceps purpurea* (Oeser et al., 2002) e *Aspergillus flavus* (Shieh et al., 1997) ha portato ad una riduzione della virulenza da parte del patogeno, mentre l'inattivazione delle due più importanti PG di *Cochliobolus carbonum* non ha determinato alcuna alterazione (Scott-Craig et al., 1990).

Nel database genomico di *F. graminearum* (<http://mips.gsf.de/genre/proj/fusarium/>) sono stati identificati due putativi geni codificanti PG. Le isoforme codificate da questi geni

(chiamate PG1 e PG2) sono state caratterizzate *in vitro* e *in vivo* (Tomassini et al., 2009). Grazie alla tecnica della Real Time PCR si è osservato che dopo 24 ore dall'infezione i geni *pg1* e *pg2* erano espressi ad alti livelli nei tessuti delle spighe di frumento infette. Tuttavia è stato possibile evidenziare, dopo 4 giorni dall'inoculo, elevati livelli di attività poligalatturonasica corrispondente alle PG1 nei tessuti dell'ovario, un tessuto particolarmente ricco in pectina (Tenberge et al., 1996 – misurazione dei livelli di pectina nell'ovario della pianta ospite segale).



## 2. SCOPO DELLA TESI

Tra gli enzimi secreti da *F. graminearum*, le PG potrebbero svolgere un ruolo chiave nel processo infettivo, ma la loro importanza non è ancora completamente chiarita. Tuttavia i dati di espressione e di attività PG nei tessuti infetti, ottenuti nel laboratorio dove ho svolto la tesi, potrebbero far ipotizzare un loro ruolo come possibili fattori di virulenza.

Per chiarire il ruolo della PG1 di *F. graminearum* nell'infezione, è stato infatti inattivato il corrispondente gene codificante mediante knock-out genico ottenuto attraverso ricombinazione omologa sito specifica del gene target.

Il knock-out è una tecnica notevolmente usata in biologia molecolare per verificare il ruolo di una proteina mediante osservazione del fenotipo mutante. Negli studi di patologia vegetale questa tecnica viene utilizzata per caratterizzare potenziali fattori di virulenza.

Il mutante  $\Delta$ PG1 ottenuto nel laboratorio dove ho svolto la mia tesi ha mostrato una ridotta virulenza durante l'infezione di spighe di frumento.

Per stabilire se il fenotipo del mutante knock-out è dovuto alla perdita del gene (*pg1*), è necessaria la complementazione del gene per ristabilire il fenotipo del *wild-type*: nel caso in cui la complementazione dell'attività PG ripristini la virulenza del fungo, si può concludere che quel gene codifica per un enzima con un ruolo importante nel processo infettivo.

L'obiettivo di questa tesi è stato quindi l'inserimento della sequenza codificante PG1 e delle rispettive sequenze regolatrici in mutanti privi del gene in questione. La complementazione è stata resa possibile grazie a tecniche di clonaggio per ottenere il costrutto di interesse, contenente la sequenza codificante PG1 completa di promotore e terminatore, e a trasformazione fungina al fine di ottenere i mutanti capaci di esprimere PG1. Per verificare il successo della complementazione sono stati eseguiti una reazione PCR per controllare la presenza del costrutto e saggi di attività *in vitro*.



### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Ottenimento del costrutto I

##### 3.1.1 Amplificazione del gene *pg1* e delle corrispondenti regioni regolatrici

Il frammento *pg1* con le corrispondenti regioni regolatrici è stato amplificato con i primers PG1complF e PG1complR (vedi tabella 3.1), usando come stampo il DNA genomico di *Fusarium graminearum*. L'amplificazione è stata effettuata mediante tecnica PCR in un volume totale di 25 µl contenenti:

- 1 µl primer PG1complF (100 ng);
- 1 µl primer PG1complR (100 ng);
- 1 µl DNA genomico (≈ 80 ng);
- 12,5 µl REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, USA) contenente 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dNTP mix e 0,06 unità/µl di Taq DNA polimerasi;
- 9,5 µl H<sub>2</sub>O sterile.

L'amplificazione del DNA è avvenuta per 35 cicli alle seguenti condizioni: 1 min a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 52 °C (annealing), 3 min a 72 °C (allungamento). Una corsa elettroforetica su gel di agarosio ha evidenziato che i primers avevano amplificato una regione di circa 2533 bp, corrispondente al frammento *pg1* comprendente inoltre le regioni promotrice e terminatrice.

Primers	Sequenza	Ta
Pg1complF	GCGTCGATGAGAACAGA	52 °C
Pg1complR	TCACAAACCAACGTGATAGT	52 °C

**Tabella 3.1:** Primers per l'amplificazione dell'intera sequenza *pg1*. (Ta = temperatura di annealing dei primers)

L'amplificato è stato purificato utilizzando un kit commerciale: il Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, USA). Al prodotto PCR è stato aggiunto un egual volume di "Membrane Binding Solution" e la miscela è stata incubata in una colonnina silicea a temperatura ambiente per 1 minuto. La colonnina è stata poi centrifugata a 14.000 rpm per 1 minuto: in questo passaggio il DNA si lega ai silicati

presenti sulla superficie della membrana della colonnina. In seguito la colonnina è stata lavata con 700 µl di “Washing Buffer” (precedentemente diluito con etanolo 95%) e posta nuovamente in centrifuga a 14.000 rpm per 1 minuto. Dopo aver eliminato il “flow-through”, è stato fatto un nuovo lavaggio con 500 µl di “Washing Buffer” e una centrifugazione a condizioni analoghe alle precedenti. Il DNA è stato infine eluito con 30 µl di Nuclease-Free Water mediante centrifugazione a 14.000 rpm per 1 minuto.

Una successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% di permesso di stimare in circa 30 ng/µl la quantità di amplificato purificato.

### *3.1.2 Ligasi del frammento amplificato con vettore pGEM-T easy*

Il prodotto di amplificazione purificato è stato inserito nel vettore pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, USA) già linearizzato. L’inserimento è avvenuto ad opera dell’enzima T4 DNA ligasi (Promega Corporation, Madison, USA). Nella miscela di ligasi di 10 µl sono stati posti l’inserito e il vettore pGEM-T Easy in rapporto 4:1. La miscela conteneva:

- 3 µl (≈ 100 ng) di prodotto di amplificazione purificato;
- 0,5 µl (≈ 25 ng) di pGEM-T easy;
- 5 µl buffer di ligasi 2X;
- 1 µl ligasi T4 (3 U/µl);
- 0,5 µl H<sub>2</sub>O sterile.

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

### *3.1.3 Clonaggio del plasmide ricombinante in Escherichia coli*

Il vettore ricombinante ottenuto mediante ligasi è stato clonato in cellule competenti di *Escherichia coli*, ceppo DH5α. Le cellule competenti conservate a -80 °C sono state scongelate in ghiaccio. A 100 µl di cellule scongelate sono stati aggiunti i 10 µl di miscela di ligasi. Le cellule sono state incubate insieme al plasmide in ghiaccio per 20 minuti, quindi sono state sottoposte a shock termico ponendole in bagnetto termostato a 42 °C per un tempo di 45-50 secondi e in seguito la sospensione batterica è stata posta nuovamente in ghiaccio per 2 minuti. Questo shock termico porta alla formazione di



sbilanciamenti di carica sulla membrana plasmatica, favorendo la formazione di correnti che portano all'entrata del plasmide nelle cellule.

Le cellule sono state inoculate in 900 µl di LB-Broth liquido (Sigma-Aldrich Inc., St.Louis, USA) e incubate per 1,5 h alla temperatura di 37 °C in agitazione a 150 rpm. Questa è una fase molto importante perché ha dato modo ai batteri trasformati correttamente di esprimere la resistenza all'antibiotico ampicillina contenuta nel plasmide pGEM-T Easy.

Successivamente, 100 µl di sospensione batterica sono stati distribuiti in piastre contenenti 12 ml di terreno LB-Broth solido (LB Broth liquido + 1,5% Bacto-Agar [Difco Laboratories, Detroit, USA]) e 100 µg/ml di ampicillina e su cui erano stati piastrati 40 µl di X-Gal (25 mg/ml) sterilizzato per filtrazione.

La presenza del vettore pGEM-T Easy all'interno delle cellule conferisce alle stesse la resistenza all'antibiotico ampicillina quindi sulle piastre sono cresciute solo colonie di batteri trasformati che contenevano al loro interno il plasmide. Inoltre, il costrutto si inserisce nel vettore andando ad interrompere il gene *lacZ* che codifica per la β-galattosidasi, la quale scinde X-Gal (un analogo del galattosio) producendo una colorazione blu delle colonie. Le cellule che dunque sono apparse di colorazione blu sono state escluse perché avevano integrato al loro interno il plasmide privo del costrutto di interesse.

Sono state invece tenute in considerazione le colonie bianche: ne sono state selezionate 8 e la corretta integrazione dell'inserto all'interno del vettore pGEM-T Easy è stata verificata mediante una reazione PCR. La miscela di reazione conteneva:

- 1 µl primer PG1complF (100 ng);
- 1 µl primer PG1complR (100 ng);
- 12,5 µl REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, USA);
- 10,5 µl H<sub>2</sub>O sterile.

Come stampo sono state utilizzate alcune cellule batteriche prelevate dalle colonie selezionate. La reazione PCR è avvenuta alle seguenti condizioni: 3 minuti a 94 °C in modo che le cellule batteriche potessero lisarsi e rilasciare il DNA da usare come stampo, poi 30 cicli dei seguenti step: 94 °C per 1 minuto (denaturazione), 52 °C per 30 secondi (annealing), 72 °C per 3 minuti (allungamento).

### *3.1.4 Estrazione e purificazione del DNA plasmidico ricombinante*

La colonia n. 7, risultata positiva per PCR, è stata prelevata e posta in terreno liquido LB-Broth contenente ampicillina (100 µg/ml) e il tutto è stato incubato, in agitazione, a 37 °C *overnight*.

Dopo la crescita batterica, il plasmide è stato estratto grazie al kit commerciale Wizard® *Plus* Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation, Madison, USA).

La coltura batterica è stata centrifugata a 14.000 rpm per 1 minuto; il surnatante è stato eliminato e il tubo è stato fatto ben asciugare per eliminare residui del mezzo. In seguito il pellet è stato risospeso con 250 µl di “Cell Resuspension Solution” e la sospensione è stata posta in una microprovetta da 1,5 ml. Sono stati poi addizionati 250 µl di “Cell Lysis Solution”, il tubo è stato dunque invertito quattro volte e lasciato a riposo per 5 minuti fino a che la sospensione non è diventata limpida. Dopo l’aggiunta di 10 µl di “Alkaline Protease Solution”, il tubo è stato nuovamente invertito quattro volte e lasciato a riposo per 5 minuti. Infine sono stati aggiunti 350 µl di “Neutralization Solution” prima di invertire nuovamente il tubo quattro volte. Il tubo è stato successivamente posto in centrifuga a 14.000 rpm per 10 minuti e il surnatante è stato poi trasferito in una “spin column” inserita in un “collection tube” fornito dal kit. Dopo l’aggiunta di 750 µl di “Wash Solution” il tubo è stato centrifugato a 14.000 rpm per 1 minuto. Il “flow-through” è stato scartato e questo passaggio è stato ripetuto con 250 µl di “Wash Solution”.

La colonnina è stata infine trasferita in una nuova microprovetta da 1,5 ml, sono stati aggiunti 100 µl di acqua “Nuclease Free” al centro della membrana e la colonnina è stata lasciata a riposo per qualche minuto in modo da far imbibire bene la membrana. Il tubo è stato poi centrifugato a 14.000 rpm per 1 minuto e il DNA plasmidico eluito è stato conservato a -20 °C.

Una successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% ha permesso di stimare in circa 90 ng/µl la quantità di amplificato purificato.

### 3.1.5 Ottenimento dell'inserto geneticina (*Gen*)

Per ottenere il frammento di DNA codificante per la resistenza alla geneticina (*gen*) è stata eseguita una reazione PCR utilizzando come stampo il vettore pII99 che conteneva il gene di interesse. Sono stati utilizzati primers specifici in grado di amplificare tutte le regioni regolatrici e l'ORF della geneticina e contenenti alle estremità degli adattatori con il sito di restrizione dell'enzima di restrizione *SacI*.

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

- 1 µl plasmide pII99 (≈ 90 ng);
- 1 µl primer GenSacF (100 ng);
- 1 µl primer GenSacR (100 ng);
- 25 µl REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, USA);
- 22 µl H<sub>2</sub>O sterile.

L'amplificazione è avvenuta effettuando 35 cicli alle seguenti condizioni: 1 minuto a 94°C (denaturazione), 30 secondi a 50 °C (annealing), 3 minuti a 72 °C (allungamento).

Dopo aver verificato, con successo, la corretta amplificazione, il prodotto PCR è stato purificato mediante il kit commerciale Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, USA), come precedentemente illustrato.

Una successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio 1 % ha confermato la corretta presenza dell'inserto.

L'inserto *Gen* è stato quindi digerito con l'enzima di restrizione *SacI*, in un volume di reazione di 30 µl:

- 5 µl inserto *Gen* (≈ 200 ng);
- 2 µl *SacI* (10 U/µl);
- 3 µl buffer J 10X (per *SacI*);
- 3 µl BSA 10X;
- 17 µl H<sub>2</sub>O sterile.

La miscela è stata posta a 37 °C per 4 ore.

Dopo la digestione è seguita la precipitazione del DNA: ai 30 µl di miscela di reazione sono stati addizionati 2 volumi di etanolo 100 % e 3 µl di Sodio Acetato 3M pH 5,2. La miscela è stata quindi posta a -20 °C per 30 minuti, prima di essere sottoposta a centrifugazione per 15 minuti a 14.000 rpm. Dopo aver eliminato il surnatante sono stati addizionati 500 µl di etanolo al 70 %. Si è vortexato ed è stato ripetuto il passaggio in

centrifuga alle medesime condizioni. Il surnatante è stato quindi eliminato e il pellet è stato asciugato in pompa a vuoto. Il DNA è stato infine risospeso in 10 µl di H<sub>2</sub>O sterile. Una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1 % ha permesso di stimare in circa 35 ng/µl la concentrazione dell'inserto digerito.

### 3.1.6 Digestione del DNA plasmidico purificato e trattamento con fosfatasi Sap

Un'aliquota di plasmide ricombinante purificato (vedi paragrafo 3.1.4) è stata sottoposta a digestione utilizzando l'enzima di restrizione *SacI*. La miscela di reazione conteneva:

- 5 µl DNA plasmidico con *pg1* integrato ( $\approx$  150 ng);
- 3 µl *SacI* (10 U/µl);
- 5 µl buffer J 10X (per *SacI*);
- 5 µl BSA 10X;
- 32 µl H<sub>2</sub>O sterile.

La miscela è stata incubata a 37 °C per 2 ore e successivamente concentrata mediante precipitazione, come precedentemente descritto nel paragrafo 3.1.5.

Poiché il vettore pGEM-T Easy contenente la regione codificante il gene *pg1* è stato digerito con un solo enzima di restrizione (*SacI*); per evitare la chiusura del plasmide senza l'integrazione dell'inserto *gen*, il vettore linearizzato è stato sottoposto ad un trattamento con fosfatasi alcalina di gamberetto (SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase) che, rimuovendo il gruppo fosfato al 5', impedisce al vettore di richiudersi.

La reazione è avvenuta in un volume di 20 µl e conteneva:

- 3 µl plasmide digerito ( $\approx$  75 ng);
- 1 µl SAP (1 U/µl);
- 2 µl buffer SAP 10X;
- 14 µl H<sub>2</sub>O sterile.

La miscela è stata posta per un'ora a 37 °C. Per inattivare l'enzima la miscela è stata posta per 15 minuti in bagnetto termostato a 65 °C.

Questa fosfatasi viene inibita solamente mediante calore, senza utilizzare EDTA che, essendo un agente chelante, può interagire in modo negativo nella successiva fase di ligasi.

### 3.1.7 Ottenimento del costrutto I e clonaggio in *E. coli*

L'inserto *Gen* è stato integrato all'interno del vettore contenente il gene *pg1* e le corrispondenti regioni regolative grazie all'enzima T4 DNA ligasi (Promega Corporation, Madison, USA). La reazione di ligasi è avvenuta in un volume complessivo di 10 µl:

- 3,5 µl pGEM-T Easy + *pg1* defosforilato ( $\approx$  15 ng);
- 1 µl inserto *Gen* ( $\approx$  35 ng);
- 1 µl buffer di ligasi 10X;
- 1 µl ligasi T4 (3 U/µl);
- 3,5 µl H<sub>2</sub>O sterile.

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

Il vettore è stato clonato in cellule competenti di *Escherichia coli*, ceppo DH5 $\alpha$ , come precedentemente descritto nel paragrafo 3.1.3, ma non è stato utilizzato X-Gal per selezionare le colonie che presentavano una corretta trasformazione, infatti il plasmide pGEM-T Easy conteneva già un inserto (*pg1*), quindi anche nel caso in cui non ci fosse stato il corretto inserimento dell'inserto *gen*, le colonie sarebbero risultate comunque di colore bianco.

Sono state selezionate 5 colonie; la corretta integrazione dell'inserto *Gen* è stata confermata grazie ad una reazione PCR dove sono stati utilizzati i primers GenPrbR e GenPrbF che hanno amplificato una regione di circa 400 bp. Come stampo è stato utilizzato un prelievo di cellule batteriche che, grazie ad una fase iniziale di 3 minuti a 94°C, hanno rilasciato il DNA plasmidico al loro interno. La miscela di reazione è avvenuta in un volume totale di 20 µl per campione:

- 1 µl primer GenPrbF (100 ng);
- 1 µl primer GenPrbR (100 ng);
- 10 µl REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, USA);
- 8 µl H<sub>2</sub>O sterile.

L'amplificazione è avvenuta in 35 cicli alle seguenti condizioni: 30 secondi a 94 °C (denaturazione), 30 secondi a 54 °C (annealing), 1 minuto a 72 °C (allungamento).

Una successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio 1 % ha evidenziato la presenza della banda corretta a circa 400 bp nelle colonie trasformate correttamente.

### 3.1.8 Purificazione del plasmide e ottenimento del costrutto I

La colonia batterica selezionata (n. 1) è stata posta in 50 ml di terreno liquido LB-Broth addizionato con ampicillina (100 µg/ml), incubando successivamente *overnight* a 37 °C.

Il plasmide è stato estratto con il kit NucleoBond<sup>®</sup> plasmid purification PC 100 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany). La coltura batterica, dopo essere stata trasferita in falcon da 50 ml, è stata centrifugata a 2.600 rpm per 15 minuti alla temperatura di 4 °C. Dopo aver eliminato con cura il surnatante, le cellule sono state risospese con 4 ml di “Buffer S1 + RNase A”. Sono stati poi aggiunti 4 ml di “Buffer S2”, il tubo è stato invertito 6-8 volte e lasciato a riposo, a temperatura ambiente, per un tempo massimo di 5 minuti. Sono stati addizionati infine 4 ml di “Buffer S3”, il tubo è stato nuovamente invertito 6-8 volte ed è stato posto in ghiaccio per 5 minuti. La sospensione è stata quindi centrifugata a 9000 rpm per 45 minuti alla temperatura di 4 °C. Il surnatante recuperato è stato filtrato su colonnina precedentemente equilibrata con 2,5 ml di Buffer “N2”. Dopo aver eliminato il “flow-through”, la colonnina è stata lavata con 10 ml di “Buffer N3”. Infine, il DNA plasmidico contenuto nella colonnina è stato eluito con 5 ml di “Buffer N5”.

Da qui si è proceduto con la fase di precipitazione: al DNA plasmidico sono stati aggiunti 3,5 ml di isopropanolo e si è centrifugato a 14.000 rpm per 30 minuti alla temperatura di 4 °C.

Dopo aver eliminato il surnatante sono stati addizionati 3 ml di etanolo 70%, la miscela è stata sottoposta a vortex e successivamente centrifugata a 14.000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante è stato eliminato e il pellet è stato fatto asciugare accuratamente prima di essere risospeso in un volume di 200 µl di acqua sterile.

Il DNA plasmidico è stato poi digerito al fine di ottenere il costrutto per la successiva trasformazione di *F. graminearum*; si sono utilizzati gli enzimi di restrizione *ApaI* e *BstXI* che andavano a tagliare a monte e a valle del costrutto. La reazione è avvenuta in un volume totale di 500 µl contenenti:

- 200 di DNA plasmidico (≈ 80 ng);
- 5 µl *ApaI* (10 U/µl);
- 5 µl *BstXI* (10 U/µl);
- 50 µl buffer B 10X (per *ApaI*);
- 50 µl buffer O 10X (per *BstXI*);
- 190 µl H<sub>2</sub>O sterile.

La miscela è stata incubata alla temperatura di 37 °C *overnight*.

Con una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% è stato possibile apprezzare la presenza di 2 bande: una di 5471 bp corrispondente al costrutto, l'altra di circa 2900 bp corrispondente al vettore. La concentrazione del costrutto è stata stimata in circa 30 ng/μl. Il DNA plasmidico digerito è stato quindi precipitato: sono stati aggiunti 2,5 volumi di Etanolo 100% e 0,1 volumi di Sodio Acetato 3M a pH 5,2; dopo un'incubazione di 3 ore a -20 °C è stata fatta una centrifugazione a 13.000 rpm per 10 minuti e il pellet ottenuto è stato risospeso in 20 μl di acqua sterile.

### *3.1.9 Protoplasting delle cellule fungine di F. graminearum e trasformazione dei protoplasti*

I protoplasti di *F. graminearum* sono stati ottenuti da micelio cresciuto a partire da conidi inoculati in terreno di coltura YEPD (3g/l estratto di lievito; 10 g/l Bacto Pectone; 20 g/l glicosio), conservati a -80 °C. 570 μl di conidi ( $\approx 1 \times 10^5$  conidi) sono stati posti in una beuta contenente 50 ml di terreno di coltura YEPD autoclavato. La beuta è stata incubata in agitazione a 150 rpm, a 28 °C *overnight*.

Alla coltura sono stati poi aggiunti 150 ml di YEPD sterile e la miscela è stata omogeneizzata mediante "Waringblender" tre volte per 10 secondi. In seguito sono stati prelevati 100 ml di miscela che sono stati posti in una beuta sterile contenente 100 ml di YEPD fresco e si è proceduto con l'incubazione della beuta a 28 °C, sotto agitazione a 150 rpm, *overnight*.

Dopo una crescita di circa 16 ore, 0,5 g di micelio sono stati raccolti, lavati con acqua sterile, asciugati e incubati con 20 ml di soluzione enzimatica sterile (2,5 % driselasi; 0,5% enzimi litici; 1,2 M KCl) per circa 2 ore a 30 °C con agitazione di 80 rpm. In questa fase avviene la degradazione enzimatica della parete cellulare e la formazione di protoplasti che viene controllata mediante osservazione al microscopio.

I protoplasti ottenuti sono stati filtrati per due volte con filtri da 100 μm e da 40 μm. In seguito sono stati posti in centrifuga a 2.000 rpm per 10 minuti e successivamente lavati con 10 ml di soluzione STC-Co (20 % saccarosio; 10 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM CaCl<sub>2</sub>). Dopo una ulteriore centrifugazione, i protoplasti sono stati risospesi in STC-Co alla concentrazione di  $1 \times 10^8$  protoplasti/ml (è stata eseguita una conta al microscopio mediante l'utilizzo di camera di Thoma).

A 200 µl di sospensione (circa  $2 \times 10^7$  protoplasti totali) sono stati aggiunti 10 µl contenenti 150 ng di costrutto digerito con gli enzimi di restrizione *ApaI* e *BstXI*. Dopo aver mescolato gentilmente il campione è stato lasciato a riposo 20 minuti a temperatura ambiente. In seguito è stato aggiunto 1 ml di PEG-Co (60 % STC-Co; 40 % polietilenglicole [PEG] 4000), la miscela è stata agitata delicatamente e incubata per 20 minuti a temperatura ambiente. Il polietilenglicole è un tensioattivo che favorisce l'entrata di DNA esogeno all'interno dei protoplasti.

Infine, alla sospensione sono stati aggiunti 5 ml di terreno di coltura TB3 (3 g/l estratto di lievito; 200 g/l saccarosio; 3 g/l caseina amminoacidi) e il campione è stato incubato *overnight* a temperatura ambiente in agitazione a 100 rpm per rigenerare la parete cellulare.

### 3.1.10 Piastramento dei protoplasti e “overlay”

La sospensione di cellule fungine è stata centrifugata a 5.000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente in modo da concentrare i protoplasti rigenerati. In seguito la miscela è stata suddivisa in tre aliquote da 200 µl, 400 µl e 800 µl.

Le aliquote sono state piastrate su terreno TB3 solido (TB3 medium + 0,8 % agar granulato) contenente 250 µg/ml di antibiotico geneticina e incubate a temperatura ambiente *overnight*.

Il giorno successivo si è proceduto con “l'overlay” delle piastre: ad ogni piastra sono stati aggiunti 12,5 ml di terreno TB3 solido contenente una quantità doppia di antibiotico geneticina. In questo modo si attua una selezione più drastica delle colonie trasformate. Le piastre sono state incubate a 28 °C.

Le colonie fungine che si sono sviluppate sono state trasferite in piastre di CM complete solido (Leach et al., 1982), così composto(dosi per 1l):

- 10 ml “Yeast Casein-Mix” (1 g estratto di lievito; 0,5 g caseina idrolizzata enzimaticamente; 0,5 g caseina idrolizzata acida) autoclavato;
- 930 ml H<sub>2</sub>O + 1,5 % agar granulato, autoclavati;
- 10 g glucosio, in 50 ml di H<sub>2</sub>O sterilizzata per filtrazione;
- 10 ml soluzione A (100g/l Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O, sterilizzata per filtrazione);
- 10 ml soluzione B (20 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O; 15 g/l NaCl pH 5.3), sterilificata per filtrazione;



- 1 ml MNS (60 mg/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 320 mg/l CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O; 13 mg/l KI; 51 mg/l (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> x 4 H<sub>2</sub>O; 60 mg/l MgSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O; 5,48 g/l ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O; 932 mg/l FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O; 2 ml di cloroformio per sterilizzare la soluzione).

Al terreno sono stati infine aggiunti 250 µg/ml di antibiotico geneticina.

### 3.1.11 Analisi PCR delle colonie fungine trasformate

Per verificare la presenza, nei mutanti fungini, del gene d'interesse *pg1* e del gene marker *Gen*, è stata eseguita una reazione PCR. Per ottenere il DNA genomico dei funghi è stata eseguita una estrazione "rapida": da ciascuna colonia è stata prelevata una piccola quantità di micelio che è stata sospesa in 50 µl di TE; la miscela è stata successivamente sottoposta a trattamento in microonde per pochi secondi in modo da far lisare le pareti cellulari e liberare il DNA. La miscela è stata dunque centrifugata a 14.000 rpm per 5 minuti ed è stato prelevato, come stampo per la reazione, 1 µl di DNA genomico. La PCR è stata eseguita con primers specifici (vedi tabella 3.2) sia per la regione *pg1* che per la regione *Gen*, in un volume di 25 µl:

- 1 µl DNA genomico;
- 0,5 µl primer Forward (100 ng);
- 0,5 µl primer Reverse (100 ng);
- 12,5 µl REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, USA);
- 10,5 µl H<sub>2</sub>O sterile.

L'amplificazione è avvenuta in 35 cicli alle seguenti condizioni: 1 minuto a 94 °C (denaturazione), 30 secondi a 55 °C (annealing), 1 minuto a 72 °C (allungamento).

Primers	Sequenza	Ta
fg11011-5int	ATCTCCGGCGCTGTCGTC	55 °C
fg11011-3int	GCAGCTAGCGCAAAGAATGTA	55 °C
GenPRBf	AGGATCTCCTGTCATCTCA	55 °C
GenPRBr	CCAAGCTCTTCAGCAATA	55 °C

**Tabella 3.2:** Primers per l'amplificazione delle regioni interne dei geni *pg1* e *Gen*. (Ta = temperatura di appaiamento dei primers)

La successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio 1 % ha evidenziato la presenza di una banda di circa 400 bp corrispondente alla regione interna del gene *pg1* e una banda di circa 400 bp corrispondente alla regione interna del gene marker *gen*.

### 3.2 Ottenimento del costrutto II

#### 3.2.1 Rimozione del frammento contenente il gene *pg1* con le rispettive regioni regolatrici e clonaggio di un nuovo frammento con promotore più lungo

Il DNA plasmidico contenente gene *pg1* e inserto *Gen* è stato estratto da una sospensione batterica della colonia n. 1 mediante il kit commerciale Wizard<sup>®</sup> Plus Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation, Madison, USA), come illustrato in precedenza nel paragrafo 3.1.4. Per rimuovere il frammento contenente gene *pg1* e regioni regolative è stata eseguita una digestione con gli enzimi di restrizione *ApaI* e *NotI* che andavano a tagliare a monte e a valle del frammento d'interesse. La reazione è avvenuta in un volume totale di 50 µl:

- 5 µl pGEM-T Easy contenente *pg1* e *Gen* ( $\approx$  30 ng);
- 2 µl *ApaI* (10 U/µl);
- 2 µl *NotI* (10 U/µl);
- 5 µl buffer A 10X (per *ApaI*);
- 5 µl buffer O 10X (per *NotI*);
- 31 µl H<sub>2</sub>O sterile.

La miscela è stata posta a 37 °C per 4 ore.

Una successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio 1 % ha confermato la corretta digestione. La banda corrispondente al plasmide pGEM-T Easy contenente l'inserto *Gen* di circa 6.000 bp è stata estratta da gel e purificata mediante il kit commerciale Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, USA).

Dopo aver pesato una microprovetta da 1,5 ml, la banda di interesse è stata excisa dal gel con una lametta sterile e posta nella microprovetta che è stata nuovamente pesata per calcolare la quantità di gel excisa. In seguito sono stati addizionati 10 µl di "Membrane Binding Solution" ogni 10 mg di gel di agarosio presente nella microprovetta. Dopo aver omogeneizzato la soluzione mediante vortex, il campione è stato posto per 10 minuti in

bagnetto termostato a 65 °C. Ogni 3 – 4 minuti la microprovetta è stata sottoposta a vortex per far dissolvere meglio il gel.

Successivamente in un “collection tube” è stata inserita una colonnina in silice dove è stato trasferito il gel disciolto, lasciando a temperatura ambiente per 1 minuto. La soluzione è stata posta in centrifuga per 1 minuto a 14.000 rpm. Dopo aver eliminato il liquido nel collection tube, alla colonnina sono stati addizionati 700 µl di “Membrane Wash Solution” e si è quindi centrifugato per 1 minuto a 14.000 rpm. Questo passaggio è stato ripetuto con 500 µl di “Membrane Wash Solution”. La colonnina è stata posta in un nuovo collection tube e il DNA è stato infine eluito con 30 µl di acqua “Nuclease-Free” mediante centrifugazione a 14.000 rpm per 1 minuto. Il DNA è stato conservato a –20°C.

Per ottenere un nuovo frammento *pg1* con promotore più lungo, il DNA genomico di *F. graminearum* è stato amplificato con i primers Pg1CforApa e Pg1CrevNot (vedi tabella 3.3) che amplificano una regione totale di circa 3000 bp (circa 500 bp di regione promotrice in più rispetto al precedente frammento) e contengono alle estremità degli adattatori con il sito di restrizione rispettivamente degli enzimi di restrizione *ApaI* e *NotI*.

La reazione è avvenuta in un volume totale di 25 µl:

- 1 µl DNA genomico;
- 1 µl primer Pg1forApa (100 ng);
- 1 µl primer Pg1revNot (100 ng);
- 12,5 µl REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, USA);
- 9,5 µl H<sub>2</sub>O sterile.

L'amplificazione è avvenuta in 35 cicli alle seguenti condizioni: 1 minuto a 94 °C (denaturazione), 1 minuto a 52 °C (annealing), 3 minuti a 72 °C (allungamento).

Primers	Sequenza	Ta
Pg1CforApa	ACCAGACCTTCCATCAGG	52 °C
Pg1CrevNot	TCACAAGTTTACTGATCGCTT	52 °C

**Tabella 3.3:** Primers per amplificare la regione *pg1* di 3000 bp (Ta = temperatura di allineamento dei primers)

Dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio 1 % è stato possibile visualizzare un prodotto di amplificazione delle dimensioni attese che è stato quindi purificato mediante

il kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, USA), come precedentemente illustrato al paragrafo 3.1.1; il DNA è stato quantificato su gel di agarosio 1 % in circa 20 ng/μl.

Grazie all'amplificazione con primers dotati di adattatori contenenti i siti di taglio degli enzimi di restrizione *ApaI* e *NotI* è stato possibile digerire il prodotto PCR purificato; la reazione è avvenuta in un volume di 50 μl contenenti:

- 22 μl prodotto di amplificazione purificato (≈ 400 ng);
- 1 μl *ApaI* (10 U/μl);
- 1 μl *NotI* (10 U/μl);
- 5 μl buffer A 10X (per *ApaI*);
- 5 μl buffer O 10X (per *NotI*);
- 16 μl H<sub>2</sub>O sterile.

La miscela è stata incubata a 37 °C *overnight* e in seguito il DNA è stato precipitato aggiungendo 2 volumi di etanolo 100 % e un decimo di volume di Sodio Acetato 3M pH 5,2. La miscela è stata quindi posta a -20 °C per 30 minuti, prima di essere sottoposta a centrifugazione per 15 minuti a 14.000 rpm. Eliminato il surnatante, sono stati addizionati 500 μl di etanolo al 70 %. Dopo una rapida agitazione con vortex, è stato ripetuto il passaggio in centrifuga alle medesime condizioni. Il surnatante è stato eliminato e il DNA è stato infine risospeso in 10 μl di acqua sterile. Una quantificazione su gel di agarosio 1 % ha stimato in 15 ng/μl la concentrazione del DNA.

In seguito si è proceduto con la reazione di ligasi tra il vettore pGEM-T Easy contenente l'inserto *Gen* e il nuovo frammento *pg1* con promotore più lungo, entrambi digeriti con *ApaI* e *NotI*, in un volume totale di 22,2 μl:

- 12 μl vettore pGEM-T Easy contenente *Gen* (≈ 60 ng);
- 7 μl inserto *pg1* (≈ 100 ng/μl);
- 2,2 μl ligase buffer 10X;
- 1 μl ligasi T4 (3 U/μl).

La miscela di ligasi è stata posta a 4 °C *overnight*.

### 3.2.2 Trasformazione di *E. coli* e ottenimento del costrutto II

La miscela di ligasi è stata impiegata per la trasformazione di cellule competenti di *E. coli* ceppo DH5 $\alpha$ , come descritto nel paragrafo 3.1.3.

Dalla trasformazione sono state ottenute 9 colonie, sottoposte in seguito ad una reazione PCR con primers specifici per la regione *pg1* che amplificavano la completa regione codificante del gene di circa 1.100 bp. La miscela di PCR di 25  $\mu$ l totali conteneva:

- 1  $\mu$ l primer Pg1orfF (100 ng);
- 1  $\mu$ l primer Pg1orfR (100 ng);
- 12,5  $\mu$ l REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, USA);
- 10,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O sterile.

Come stampo è stato utilizzato un prelievo di cellule batteriche dalle rispettive colonie.

L'amplificazione è avvenuta in 35 cicli alle seguenti condizioni: 1 minuto a 94 °C (denaturazione), 1 minuto a 53 °C (annealing), 1 minuto 30 secondi a 72 °C (allungamento).

Una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1 % ha confermato la presenza del costrutto nelle colonie batteriche 1, 2, 3 e 4.

Il DNA plasmidico è stato quindi purificato mediante il kit Wizard<sup>®</sup> Plus Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation, Madison, USA), come descritto precedentemente al paragrafo 3.1.4.

Per ottenere il costrutto II, il DNA plasmidico è stato digerito con gli enzimi di restrizione *ApaI* e *HindIII* che andavano a tagliare a monte e a valle del costrutto d'interesse. La reazione è avvenuta in un volume finale di 1 ml contenente:

- 333  $\mu$ l DNA plasmidico ( $\approx$  50  $\mu$ g);
- 7  $\mu$ l *ApaI* (10 U/ $\mu$ l);
- 7  $\mu$ l *HindIII* (10 U/ $\mu$ l);
- 100  $\mu$ l buffer Multicore 10X;
- 10  $\mu$ l BSA 100X;
- 543  $\mu$ l H<sub>2</sub>O sterile.

La miscela è stata posta a 37 °C *overnight* e una corsa elettroforetica ha evidenziato la corretta digestione: erano ben visibili una banda da circa 7000 bp corrispondente al costrutto II e una banda da circa 3000 bp corrispondente al vettore pGEM-T Easy.

In seguito il DNA è stato precipitato aggiungendo un egual volume di isopropanolo, 0,1 volumi di sodio acetato e ponendo la miscela a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  *overnight*. In seguito la miscela è stata centrifugata a 14.000 rpm per 15 minuti, il surnatante è stato eliminato e il DNA è stato risospeso in 100  $\mu\text{l}$  di acqua sterile.

### 3.2.3 Analisi delle nuove colonie fungine trasformate

L'ottenimento dei protoplasti, la trasformazione e il piastramento sono stati effettuati come descritto in precedenza nei paragrafi 3.1.9 e 3.1.10.

Per verificare la presenza del gene *pg1* con promotore più lungo è stata eseguita una reazione PCR. Non sono stati utilizzati primers specifici per il gene marker, visto che vi era stata un'ottima crescita su terreno di coltura contenente l'antibiotico geneticina.

Per ottenere il DNA è stata eseguita una estrazione "rapida", come riportato nel paragrafo 3.1.11. Sono state eseguite due reazioni PCR in un volume totale di 20  $\mu\text{l}$ , usando due diverse coppie di primers specifici per la regione *pg1*: fg11011-5int/ fg11011-3int e Pg1orfF/ Pg1orfR. La miscela di reazione conteneva:

- 1  $\mu\text{l}$  DNA genomico;
- 0,5  $\mu\text{l}$  primer Forward (100 ng);
- 0,5  $\mu\text{l}$  primer Reverse (100 ng);
- 10  $\mu\text{l}$  REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con  $\text{MgCl}_2$  (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, USA);
- 8  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  sterile.

L'amplificazione è avvenuta in 35 cicli alle seguenti condizioni: 1 minuto a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  (denaturazione), 30 secondi a  $53 - 55\text{ }^{\circ}\text{C}$  (annealing, vedi tabella 3.4), 1 minuto a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  (allungamento).

Primers	Sequenza	Ta
fg11011-5int	ATCTCCGGCGCTGTCGTCAA	$55\text{ }^{\circ}\text{C}$
fg11011-3int	GCAGCTAGCGCAAAGAATGTA	$55\text{ }^{\circ}\text{C}$
Pg1orfF	ATGTTCTCTTCCATGATCCTTC	$53\text{ }^{\circ}\text{C}$
Pg1orfR	TTAGCAAGAAGCTCCAGAAGG	$53\text{ }^{\circ}\text{C}$

**Tabella 3.4:** primers per l'amplificazione delle regione *pg1* (Ta = temperatura di appaiamento dei primers)

La successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% ha evidenziato la presenza del costrutto in tutte le colonie fungine trasformate analizzate.

#### *3.2.4 Controllo dell'attività PG mediante saggio Cup Plate*

Da ogni piastra di CM *complete* solido (Leach et al., 1982) contenente i mutanti fungini, sono stati prelevati 2 tondelli di terreno con micelio in crescita attiva e sono stati posti in beute contenenti 20 ml di terreno di coltura Szecsi [ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0,09%;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0,2%,  $\text{MgSO}_4$  0,01%,  $\text{KCl}$  0,05%] addizionato con pectina (Citrus Pectin 1%) come unica fonte di carbonio per indurre l'attività PG del fungo. Le beute sono state incubate per 4-7 giorni a 24 °C in agitazione a 100 rpm.

Per saggiare l'attività PG, è stato eseguito un saggio "Cup Plate": 12 ml di un adeguato substrato [Agar 0,8%, acido poligalatturonico (PGA) 1%, tampone sodio acetato 50 mM pH 5; sciolto a bagnomaria] sono stati posti in piastre Petri lasciando solidificare. Alle piastre sono stati praticati alcuni fori (questa operazione è stata eseguita utilizzando l'estremità più larga di una Pasteur di vetro) nei quali sono stati aggiunti 20  $\mu\text{l}$  di filtrato colturale delle colture allevate in terreno Szecsi. Il tutto è stato lasciato digerire *overnight*. L'attività poligalatturonasica (PG) è stata evidenziata aggiungendo alle piastre  $\text{HCl}$  6 M. Come controllo sono stati utilizzati il ceppo WT di *F. graminearum* e il mutante  $\Delta\text{PG1}$ .

#### *3.2.5 Controllo dell'attività PG mediante saggio viscosimetrico*

L'attività PG dei mutanti fungini selezionati è stata determinata anche con un saggio viscosimetrico. L'attività è stata saggiata misurando a 30 °C la diminuzione della viscosità relativa di 2 ml di miscela di reazione contenente 0,5 ml di filtrato colturale (prelevato da colture fungine allevate in Szecsi con pectina 1%), 1 ml di acido poligalatturonico (PGA 1 %, disciolto in tampone sodio acetato 50 mM pH 5,0) e 0,5 ml di tampone sodio acetato 50 mM pH 5,0.

La miscela di reazione è stata posta in un viscosimetro capillare Micro-Ostwald, collegato ad un sistema AVS 310 (Schott Geräte). Una unità enzimatica (unità

viscosimetrica, UV) è definita come la quantità di enzima che causa una diminuzione del 50 % di viscosità relativa della miscela di reazione in 1000 minuti.



## 4. RISULTATI

### 4.1 Preparazione del costrutto I:

#### 4.1.1 Amplificazione del gene *pg1*

In questa fase si è amplificato il gene *pg1* completo di sequenze regolatrici al fine di ottenere mediante PCR un considerevole numero di copie della sequenza di interesse da clonare. Per amplificare questo frammento di DNA sono stati utilizzati i primers Pg1complF e Pg1complR, in grado di amplificare una regione *pg1* della grandezza di 2.533 bp, comprendente ORF di 1.128 bp, promotore di 1.068 bp e terminatore di 337 bp (Fig.4.1).

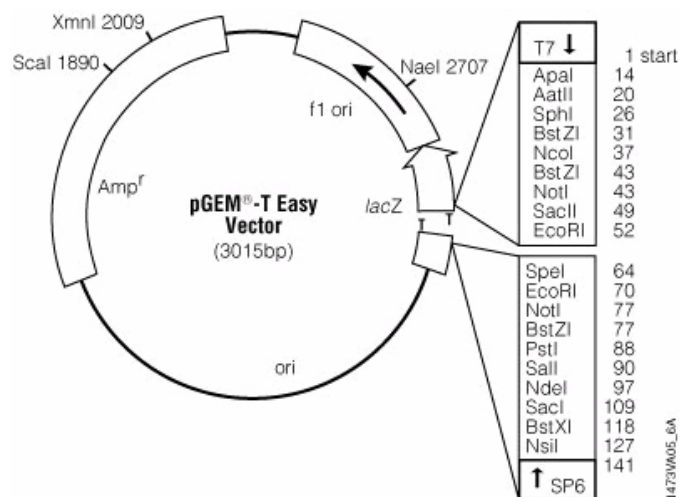
```
ACCAGACCTTCCATCAGGATCTAGAAGGATTC AAGTGGTTTGATACGATTCATACACCAGCCGATAGTCGTGGTA
AAAGGATTTCTAGAAACAAACACAGCCACCACACCTTGTTC AACTTCTGGCAGATCATCAGTCAGGAAGAGAT
AAATCTGTGTAGTCCAAAGCCAAGCCTCAGCCGCCACATTCCGGGCTACGGCATTGTTTCACATCATCTCTCAG
CTGTTTCAGGGGAAACAATACGTACTGATGGTGCCACAGGATGACGAATGCTTCAAACACAGAAGATCAAACA
CATTTATAAACACGAATTCGATATTCAGTTGATCATGATATAACACATTGCCATTTTCCATTGAGATTTTTTGCTAC
CGACATCTCTGACTTGTGTTTTGACCAGTTCTACCAGCATGGTGGAGGTCACGTGACATAAGGGGGCAACGTGAT
TGCCTCGAATCTTTCAAACCCGCGTCCGATGAGAAACAGA AATAGTCAACATTAAGCCACCACATGCGATTCTTCC
ATAATAAGAAGTGTCAAGGTGCTCACTCGACGTTATTTTACGATTGGAACATTGTTATTAGTTGATTTTTATTTTTT
TCTTATTTACTTTTTAATGTTATGCATCAAACAACACCCACCCCAATTCGTGCGTAGGGTAGGCTCCTGAGATTATTC
ATGCTGTACATATGTAACACTTGTATGTCTGGGTAGCTTTTACAATTGTCAATGTTGAGAAAATAGACCAATATC
TAGATATATGCCATCAATTGAACAGCCTGAATTCAGTATCCCGTATACTATTTAGATTTGAAGTCAGAGCATAAGTTG
GTTTATTTTGTGCTGTTAACTTCAAGCACATCGAAAAACGTCCATTGAGACGACTATTTGATGCCGAGGAATCATT
GTCCTACCCCTTGCAGATATCCCCCAGGACTGTCCCGACGATTGATCATTCAAACACATTCCTAGCAGCCGAGTTAG
TACGCGTATAGAAAGTCCGTCCTTGATCCAACCTTCTCCACAAATGAACTAAATGCCGTTTCATCTCCCCAAAGCC
TTGAAGCTATTACCAGTTTGAAGTTCCCTCGCATTGCAACCATTCACAAGTGTTC AACCCCAATCTCACCATCTCAC
AAGACCCAGAGTATCATCAGAATGCCGTGCATCCGATTCATCGAAATTGGACTAGATGCTGAAACTTGACAGTA
GCTGAGGAAATTCAGATCCCA CCAATTAGAGGCGAGACGGCCATAGATCGGGGTTAGCGGTTCCATCTCAACCCC
AGGAAATTACCAAGAATGGTGGAGCAGATCCGTGTAATCGTTTGATGGAAACACGTTCTGGACACTGACACGGG
CCTTTATCACGGCTGAACGGCATCAAAGGCGTTGTAATCGGAGCTTTTACATGTTGTATTGCCAAGGATAAAAAGAA
CCAAGATCCTCAACTCTAAGTCAACTCTATTATCTCATCCAACAATTCATCTTCACTTAGTACATATTTCTACTC
TCAACTACATATCTCATCATGTTCTCTTCATGATCCTTTCAGCGGCCTGGTTGCCTCAGCCTTTGCCACCCCA
CTGTTGAGCCCCGTGCCAGCTGCACCTTTACTGATGCTGCTTCTGCTATCAAGGGCAAGGGTAGCTGCTTACCATT
ATCCTCAACAACATTGCCGTCCTGCTGGCACTACTCTTGATCTTACCAAGCTCAAGGATGGCACTCATGTAAGTTAT
TCTGTTCTCTAAATATGGACTCTTTCTCACACAATATAGGTCATCTTCCAAGGAAAAGACTACCTTTGGGTATGATACCTG
GGAAGTCCCCTGATCTCCTTCACTGGAAACAACCTTCTCATCGAAGGTGCCGATGGCCACTCCATTGACTGCTCAG
GGTCAGCGCTGGTGGGATGGCAAGGGCAGCAACGGTGGCAAGACCAAGCCAAAGTTCTTCAAGTCCCATTCTCTC
CAGAACTCCAACATCAAGAAGTTGAACGTTATCAACACTCCCGTTCAGGCTTTCAGCATCAACGGAGTCACCAACC
TCGGTGTCTACAACGTCCACATGGACAACCTCTGCGGAGATACCCAGGGTGGACACAACACTGACGCTTTCCGATGT
CGGCTCTCCACCGGTGTTTACATCTCCGGCGCTGTCGTC AAGACCAGGACGACTGCCTCGCCATCAACTCCGG
ACCAACATCACCTCACTGGTGGTAACTGCAAGTGGTGGTACGGTCTTTCCATCGGATCCGTTGGAGGTCGATCC
AACAACGACGTC AAGACCGTCCGATCTCAACTCATCCATCTCCAACCTCCGACAACGGTGTTCGCATCAAGACCG
TTTCTGGAGCTACCGGTTCCGCTCTCCGACGTCAAGTACGATTCCATCACTCTTAGCAACATTGCCAAGTACGGTATT
GTCATTGAGCAGGATTACGAGAACGGCTCTCCACTGGTACCCTACTGCTGGTGTTCATCACCGATGTCACCA
TCAACAAGGTTACCGGATCTGTCAAGTCCAGCGTACCGATATCTACATTCTTTGGCAGTGC AAGAAGCTGGA
CCTGGACCAACAACAAGGTCACCGGTGGTAAGACCTCTGACAAGTGCCAGGGTGTTCCTTCTGGAGCTTCTTGGT
AAGTATCACGTTGGGCGTGAGAAGCAGTTGATGGGCTGAGATGAAGAAGAGTACCTTATTTGTATATAGTTATTA
GCTCGAGTA AATAATGAGCAGTATCCTAACTTGTATCCCGCATTGAAAAATTGATGTGTATATTCAGAATGAGGA
ACTTTAGTAGCCAGTCAGCTTTGAGCGATAGCTGAGACTGACCATAACAAGCATCGCGTGTGATGTGGCTGAGT
TTGTATTGTTTACCCTAAAATCGAACTAGTCTACGTCATCAAATCATCCAGTCCCTGGCAAAAAGACAAAAGGAAAA
TGATGGACTTGATCAACTATCACGTTGGTTTGTGATGA AAGCGATCAGTAAACTGTGA
```

**Figura 4.1:** sequenza codificante il gene *fgsg\_11011* (*pg1*) [cromosoma 3, super contig 8 (*Fusarium Comparative Database, Broad Institute*)] con le rispettive sequenze regolatrici. Legenda: punto di inizio trascrizione (ATG) in colore arancione; codone di stop (TAA) in colore indaco; sequenza di poliadenilazione in fucsia; coppie di primers *PG1complF/PG1complR* in verde-sottolineato; coppie di primers interni *fg11011-5int/fg11011-3int* in rosso sottolineato; coppie di primers *PG1orfF/PG1orfR* in blu sottolineato; coppie di primers *PG1forApa/PG1revNot* in marrone sottolineato; introne sottolineato; regione putativa TATA box e regione CCAAT evidenziate in giallo.

#### 4.1.2 Clonaggio dell'amplificato in pGEM-T Easy

Dopo aver purificato il frammento di interesse, circa 100 ng di amplificato sono stati utilizzati per la ligazione nel vettore plasmidico pGEM-T Easy (Fig.4.2).

Questo vettore contiene un marcatore di selezione (gene che conferisce alla cellula la resistenza all'antibiotico ampicillina) e un gene *lacZ*, codificante per la  $\beta$ -galattosidasi, che contiene il sito di policlonaggio. Linearizzato, il vettore presenta delle timine in posizione 3' di ciascun filamento. Con l'amplificazione del gene *pg1* mediante PCR, la Taq polimerasi ha aggiunto almeno una adenina al 3' dell'amplificato. Questo ha permesso l'appaiamento del vettore con il prodotto PCR e la reazione di ligasi ha consentito la completa saldatura delle due sequenze di DNA.



**Figura 4.2:** rappresentazione del plasmide pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, USA).

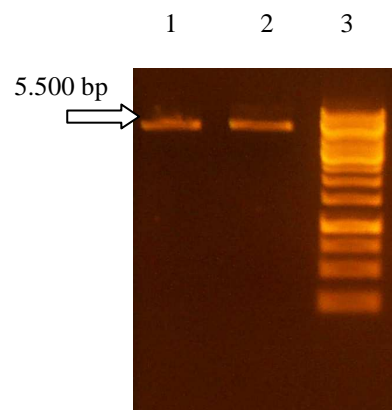
Il prodotto di ligazione è stato quindi utilizzato per trasformare le cellule batteriche competenti. Sono state ottenute 8 colonie trasformate e l'integrazione del gene *pg1* è stata confermata con una PCR dove sono stati utilizzati i primers specifici PG1complF e PG1complR.

#### 4.1.3 Estrazione e purificazione del plasmide pGEM-PG1compl

La colonia trasformata numero 7 è stata selezionata per l'allevamento in coltura liquida in modo da poter estrarre il DNA plasmidico. Il plasmide è stato poi digerito, alternativamente, con gli enzimi di restrizione *SacI* e *BstXI* che vanno ad eseguire un taglio a valle del gene *pgl*.

La successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% (Fig.4.3) ha confermato la presenza di una banda di circa 5.500 bp, esattamente la lunghezza del vettore con l'inserto *pgl* integrato.

Il prodotto di digestione ottenuto tagliando con *SacI* è stato successivamente utilizzato per aggiungere al costrutto il gene di selezione per la resistenza alla geneticina.



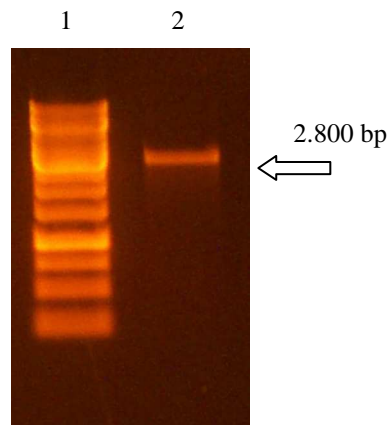
**Figura 4.3:** verifica in gel di agarosio 1% della presenza della banda di circa 5.500 bp corrispondente al vettore pGEM-T easy con inserto *pgl* dopo digestione con enzima *SacI* (corsia 1) e *BstXI* (corsia 2). In corsia 3 è stato caricato il marker 1Kb DNA Ladder Plus (Gene Ruler<sup>TM</sup> – Fermentas)

#### 4.1.4. Amplificazione e purificazione dell'inserto geneticina

Il gene codificante per la resistenza all'antibiotico geneticina (*Gen*), necessario per la fase di selezione delle colonie fungine, è stato amplificato mediante tecnica PCR usando il vettore pII99 (contenente il gene) come stampo e i primers GenSacF e GenSacR, in grado di amplificare tutte le regioni regolatrici e l'ORF della geneticina e contenenti degli adattatori alle estremità con il sito di restrizione di *SacI*.

La reazione PCR ha evidenziato la presenza della banda attesa di circa 2.800 bp corrispondente al gene *gen* (Fig.4.4).

L'amplificato è stato poi digerito con l'enzima di restrizione *SacI* e quantificato.



**Figura 4.4:** verifica della corretta amplificazione dell'inserto *gen* (corsia 2) su gel di agarosio 1%. In corsia 1 è stato caricato il marker 1Kb DNA Ladder Plus (Gene Ruler<sup>TM</sup> - Fermentas)

#### 4.1.5. Trattamento con fosfatasi alcalina e clonaggio dell'inserto *Gen* in *pGem-PG1compI*

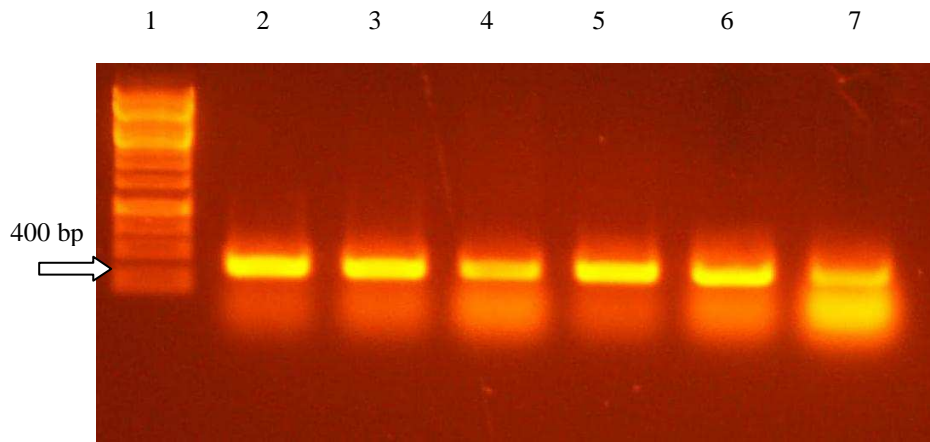
Poiché il plasmide *pGEM-PG1compI* è stato digerito con un solo enzima di restrizione potevano avvenire errori nell'integrazione dell'inserto dovuti alla ricircolizzazione del plasmide senza il gene da integrare. Per ovviare a questo problema, il plasmide *pGEM-PG1compI* è stato trattato con la fosfatasi alcalina SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) che, rimuovendo il gruppo fosfato al 5', impedisce al vettore di richiudersi. Questa fosfatasi viene inibita solamente mediante calore, senza utilizzare EDTA che, essendo un agente chelante, potrebbe andare ad interagire in modo negativo nella successiva fase di ligasi.

Rimuovendo il fosfato al 5', la ligasi va così a saldare le catene tra inserto e vettore solo in due punti; restano quindi dei nick, ma con la replicazione le molecole di DNA si rigenerano in modo corretto.

La reazione di ligasi ha quindi consentito di integrare l'inserto *Gen* e trasformare nuove cellule batteriche.

Sono state ottenute e selezionate 6 colonie. Ciascuna di esse è stata sottoposta a reazione PCR, in cui sono stati utilizzati i primers interni *GenPrbF* e *GenPrbR* che andavano ad

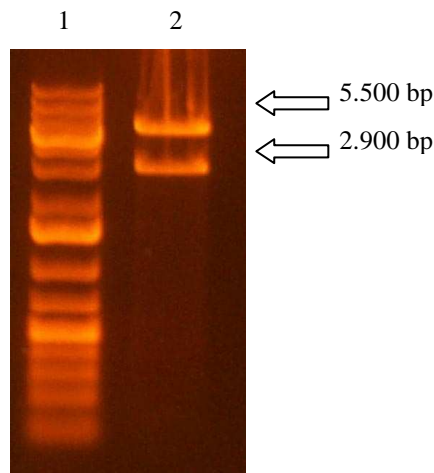
amplificare una regione interna del gene di circa 400 bp, e sono risultate tutte positive (Fig.4.5).



**Figura 4.5:** PCR per controllare la presenza dell'inserto gen nelle 6 cellule trasformate. In corsia 1 è stato caricato il marker 1Kb DNA Ladder Plus (Gene Ruler™ – Fermentas)

Il DNA plasmidico è quindi stato estratto e purificato dalla colonia n° 1.

Il plasmide è stato digerito con gli enzimi di restrizione *ApaI* e *BstXI* che hanno tagliato a monte e a valle del costrutto e la successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% ha rivelato la presenza di due bande: una corrispondente all'inserto di circa 5.500 bp, l'altra corrispondente al vettore di circa 2.900 bp (Fig.4.6).



**Figura 4.6:** analisi in gel di agarosio 1% del profilo di digestione del costrutto (corsia 2) digerito con enzimi di restizione *ApaI* e *BstXI* e ottenimento delle bande da 5.500 bp (inserto) e 2.900 bp (pGEM-T easy). In corsia 1 è stato caricato il marker 1Kb DNA Ladder Plus (Gene Ruler™ – Fermentas)

## 4.2 Trasformazione di *F. graminearum* per ottenere un mutante codificante per PG1.

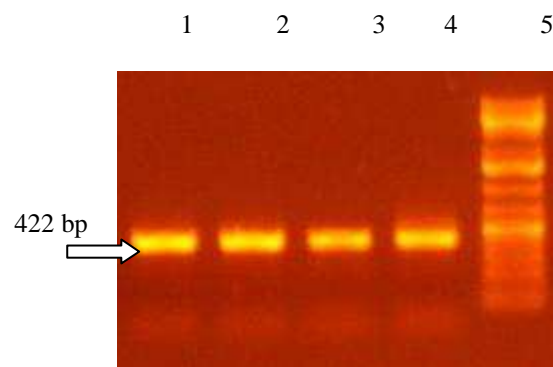
### 4.2.1 Sviluppo delle colonie trasformate in terreno selettivo contenente geneticina

10 µg del costrutto di circa 5.500 bp exciso dal DNA plasmidico sono stati utilizzati per la trasformazione dei protoplasti di *F. graminearum* ΔPG1 ottenuti mediante digestione delle pareti cellulari fungine.

Dopo selezione in terreno contenente geneticina, sono state ottenute e selezionate 24 colonie fungine che sono state poi trasferite in altre piastre contenenti l'antibiotico per verificare la resistenza degli isolati.

### 4.2.2 PCR per la selezione dei funghi trasformati

Per selezionare i funghi trasformati sono state eseguite due reazioni di PCR (Fig. 4.7) utilizzando i primers GenSacF e GenSacR, per verificare la presenza del gene codificante la resistenza all'antibiotico, e i primers fg11011-5int e fg11011-3int per verificare la presenza del gene codificante PG1.



**Figura 4.7:** analisi su gel di agarosio 1% dei prodotti PCR ottenuti da 4 colonie fungine trasformate (corsie 1-4) utilizzando i primers per amplificare la regione interna del gene *pg1* di 422 bp. In corsia 5 si è caricato il marker 1Kb DNA Ladder Plus (Gene Ruler<sup>TM</sup> – Fermentas).

#### 4.2.3 Saggio per verificare l'attività poligalatturonasica (PG)

Per determinare l'attività PG dei mutanti trasformati è stato eseguito il saggio "Cup Plate". L'attività dell'enzima viene visualizzata con la formazione di un alone attorno al foro centrale in cui viene messa ad incubare l'attività PG (terreno di coltura del fungo mutante allevato in presenza di pectina). La piastra contiene il substrato delle PG (PGA 1%) e l'alone indica se c'è stata degradazione o meno del substrato. A differenza del fungo WT (Fig. 4.9), utilizzato come controllo positivo, tutti i funghi mutanti analizzati non producevano attività PG (Fig. 4.8).



**Figura 4.8:** Saggio "Cup Plate" di alcuni mutanti fungini dove non è stata riscontrata attività PG



**Figura 4.9:** Saggio "Cup Plate" del fungo WT. In questo caso l'attività PG è visibile sotto forma di alone biancastro.

Un successivo saggio viscosimetrico ha confermato l'assenza di attività PG nei mutanti fungini (dati non mostrati).

### 4.3 Preparazione del costrutto II:

#### 4.3.1 Excisione del gene *pg1* con le rispettive regioni regolatrici e clonaggio di un nuovo frammento con promotore più lungo

Il costrutto I (pGEM-*pg1*compI-Gen) è stato digerito con gli enzimi di restrizione *ApaI* e *NotI* che hanno tagliato a valle e a monte delle regioni regolatrici del gene *pg1*. Il frammento corrispondente al plasmide pGEM-Gen, di circa 6.000 bp, è stato quindi tagliato da gel e in seguito purificato e quantificato.

Con una reazione PCR è stato amplificato un nuovo frammento *pg1*, usando i primers Pg1forApa e Pg1revNot, in grado di amplificare una regione di circa 3.000 bp con circa 500 bp di regione promotrice in più rispetto al costrutto I e dotati, rispettivamente, di adattatori alle estremità con il sito di restrizione di *ApaI* e *NotI*. L'amplificato è stato purificato e quantificato.

La successiva reazione di ligasi ha permesso l'integrazione del nuovo frammento con promotore più lungo all'interno del plasmide pGEM-Gen.

Con la trasformazione batterica sono state ottenute 9 colonie. Una PCR dove con i primers PG1orfF e PG1orfR, che amplificano la regione codificante del gene *pg1* di circa 1.100 bp, ha dimostrato che 8 colonie su 9 erano positive (dati non mostrati).

#### 4.3.2 Ottenimento del costrutto e trasformazione di *F. graminearum* $\Delta$ PG1

Il nuovo DNA plasmidico è stato estratto dalle colonie 1, 2 e 4 e digerito con gli enzimi di restrizione *ApaI* e *HindIII* per excidere il nuovo costrutto. Una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1 % ha confermato la presenza di una banda di circa 7.000 bp (costrutto) e una di circa 2.900 bp (plasmide pGem-T Easy) (dati non mostrati).

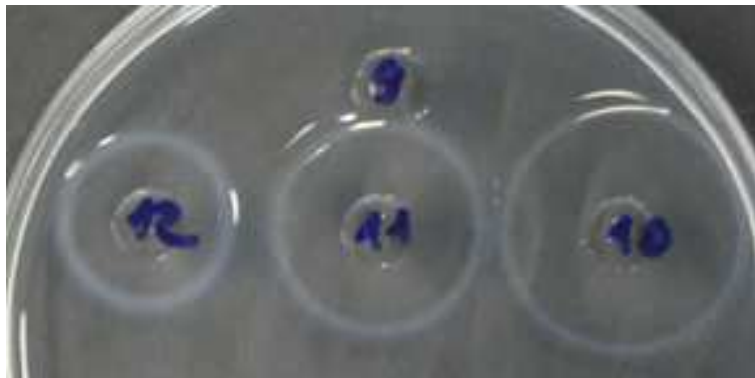
Il nuovo costrutto è stato utilizzato per trasformare i protoplasti di *F. graminearum*  $\Delta$ PG1: sono stati quindi ottenuti nuovi mutanti dai quali è stato estratto il DNA genomico per eseguire una reazione di PCR utilizzando le coppie di primers PG1orfF/PG1orfR e fg11011-5int/fg11011-3int.

La PCR ha confermato la presenza del costrutto in tutti i 22 mutanti analizzati (dati non mostrati).



#### 4.3.3 Verifica espressione dell'attività PG

L'attività poligalatturonasica è stata inizialmente evidenziata grazie al saggio “Cup Plate”. In questo caso si è rilevata attività PG in tutti i mutanti analizzati (Figg. 4.10 e 4.11).

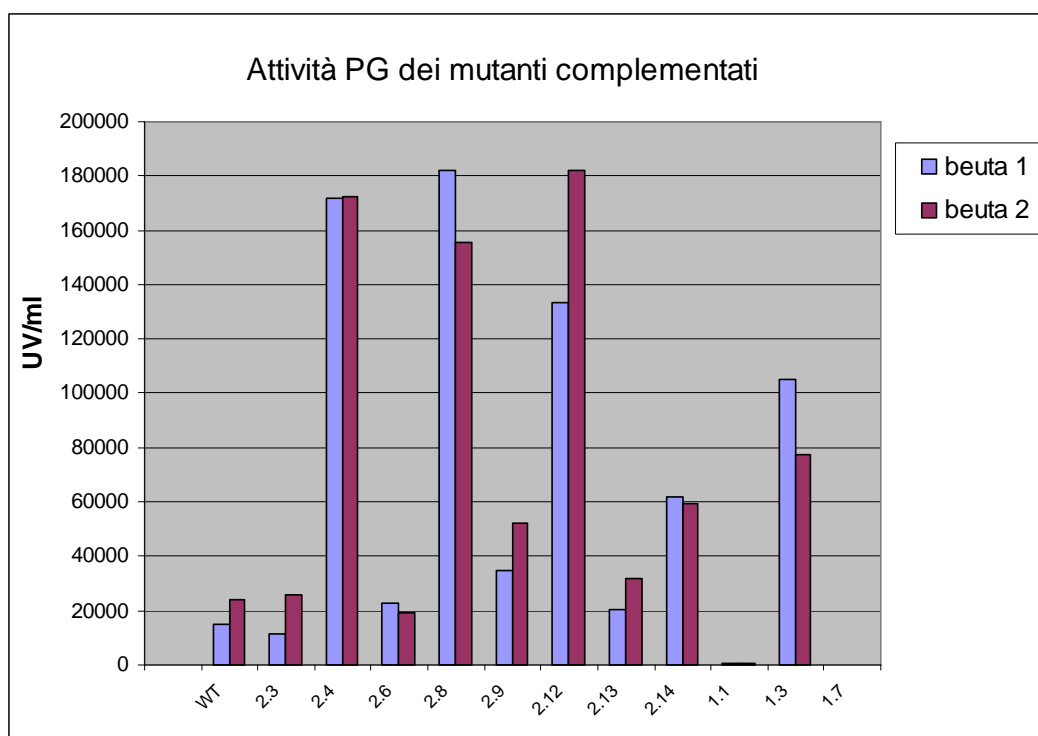


**Figura 4.10:** Saggio “Cup Plate” di alcuni mutanti fungini (pozzetti 10-11-12) contenenti il costrutto con promotore più lungo, nei quali è visibile attività PG. Nel pozzetto 9 è stato caricato il controllo negativo.



**Figura 4.11:** Saggio “Cup Plate” dove sono stati analizzati il mutante fungino  $\Delta PG1$  (pozzetto 21A.3 – non è visibile attività PG) e il fungo WT dove è visibile attività PG

L'attività PG dei mutanti è stata misurata e confermata anche mediante saggio viscosimetrico; in alcuni casi si è rilevata un'attività PG molto superiore a quella del fungo WT (Fig. 4.12). Ciò potrebbe essere dovuto ad integrazioni multiple del costrutto all'interno del genoma del fungo.



**Figura 4.12:** grafico dove sono stati riportati i valori di attività PG espressi in unità viscosimetriche (UV) per ml di coltura. In alcuni casi l'attività dei mutanti è molto simile al WT (es. campioni 2.3; 2.6), in altri è molto superiore (campioni 2.4; 2.8).

## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le poligalatturonasi (PG) sono tra i primi enzimi degradativi della parete cellulare ad essere secreti dai funghi patogeni durante l'infezione di piante ospiti. Le PG svolgono un ruolo importante nell'infezione di alcune piante dicotiledoni (Shieh et al., 1997; Isshiki et al., 2001; ten Have et al., 1997), note per possedere pareti cellulari ricche in pectina.

Per quanto riguarda le specie monocotiledoni, che contengono un minor quantitativo di pectine nella parete cellulare (Carpita and Gibeaut, 1993), un ruolo delle PG nel processo infettivo è stato dimostrato solo nel caso dell'interazione *Claviceps purpurea*-segale (Oeser et al., 2002). Tra le specie monocotiledoni, anche il frumento è soggetto all'attacco di un fungo, *Fusarium graminearum*, che secreta elevate quantità di una endo-poligalatturonasi (PG1) nei tessuti dell'ovario. Nonostante ciò, il ruolo della PG1 nell'infezione di spighe di frumento non è ancora stato chiarito con certezza.

Per chiarirne il ruolo, nel laboratorio dove ho svolto la mia tesi è stato inattivato il corrispondente gene codificante mediante knock-out genico ottenuto attraverso ricombinazione omologa sito specifica. È stato dunque ottenuto un mutante  $\Delta$ PG1 che, sottoposto a prove di infezione di spighe di frumento, ha mostrato una ridotta virulenza rispetto al fungo *Wilde type* (WT). La PG1 appare dunque come un potenziale fattore di virulenza nel processo infettivo di *F. graminearum*, ma per poter confermare questa ipotesi è prima necessario complementare il gene *pg1* in modo da verificare il ripristino della virulenza simile a quella del fungo WT.

In questa tesi è stato quindi ottenuto un costrutto per la complementazione, contenente il gene d'interesse (*pg1*) completo di regioni regolatrici e un gene marker per la selezione dei mutanti, con il quale è stata resa possibile la trasformazione dei mutanti  $\Delta$ PG1. I mutanti complementati ottenuti sono stati caratterizzati *in vitro*.

Grazie ad una reazione di PCR è stato verificato che il genoma dei mutanti complementati conteneva correttamente sia il frammento d'interesse *pg1* che il gene per la resistenza alla geneticina utilizzato per selezionare le colonie fungine trasformate. Il successivo saggio per verificare l'attività PG ha tuttavia mostrato che l'enzima non era espresso in nessun mutante analizzato.

Per escludere errori nella sequenza codificante è stato eseguito il sequenziamento del costrutto utilizzato per la trasformazione, sia per quanto riguarda la regione codificante PG1, che le regioni regolatrici quali il promotore (circa 1.000 bp) e il terminatore, verificando così la correttezza delle sequenze nucleotidiche.

Dopo aver escluso errori nella sequenza codificante, si è deciso di analizzare la sequenza promotrice del gene *pg1* di *F. graminearum*: si è così osservata l'assenza di una sequenza "TATAA" conservata, determinante per indicare alla RNA polimerasi II il punto esatto da cui iniziare la trascrizione. Nel costrutto è presente invece una regione "TAAAA", molto simile alla sequenza conservata, situata 104 bp a monte dell'elemento da trascrivere. Il promotore della sequenza *pg1* di *F. graminearum* appare dunque come un promotore debole con bassa attività trascrizionale.

Andando a verificare le sequenze promotrici di altri geni codificanti pectinasi di *F. graminearum*, un secondo gene codificante PG (*pg2*) e il singolo gene codificante pectin metil esterasi (*Pme1*), si è osservato che entrambe le sequenze contengono la regione conservata "TATAA", presente rispettivamente 142 bp e 77 bp a monte dell'ATG.

Inoltre, allineando la sequenza codificante PG1 di *F. graminearum* con le sequenze codificanti poligalatturonasi omologhe di altri funghi del genere *Fusarium* (*F. verticillioides* e *F. oxysporum*), si nota una elevata omologia di sequenza (oltre il 90 %); il frammento codificante risulta quindi molto conservato tra specie diverse di *Fusarium*. Analizzando in dettaglio anche la sequenza promotrice dei geni *pg* di *F. verticillioides* e di *F. oxysporum* è possibile identificare un frammento di circa 150 bp a monte dell'ATG molto conservato con una omologia dell'90 %; questo frammento contiene la sequenza conservata "TATAA" 131 bp a monte dell'elemento da trascrivere. Per quanto riguarda il promotore di *F. graminearum*, oltre all'assenza della regione conservata, si è verificato che la similarità con le sequenze promotrici dei geni *pg* di *F. verticillioides* e *F. oxysporum* risulta molto bassa (circa 24 %).

Sempre nella regione promotrice di *F. graminearum* è stato possibile identificare, 296 bp a monte della sequenza codificante, l'elemento CCAAT, importante per l'inizio della trascrizione. In *Penicillium griseoroseum* questo elemento è situato 270 bp a monte dell'ATG (Ribon et al., 2009) ed è considerato un elemento importante per determinare elevati livelli di espressione genica della PG del fungo. I "CCAAT boxes" potrebbero infatti essere implicati nella modulazione dei livelli trascrizionali anche in altri CWDE di altri funghi patogeni (Ribon et al., 2009).

Ipotizzando quindi che l'incapacità di produrre attività PG dei mutanti complementati con il gene *pg1* dipenda dal fatto che la regione promotrice inserita nel costrutto non contenga tutte le regioni regolatrici necessarie per l'espressione, si è deciso di preparare un nuovo costrutto con un promotore più lungo di circa 500 bp.

Dopo trasformazione, si è confermata la presenza di questo secondo costrutto nei nuovi mutanti mediante una reazione di PCR dove è stata amplificata tutta la regione codificante del frammento *pg1*.

Il successivo saggio di attività PG ha dimostrato che tutti i mutanti presi in esame producevano attività PG; è dunque ipotizzabile che nelle 500 bp aggiuntive presenti nel promotore del secondo costrutto ci siano sequenze regolatrici importanti, putativamente riconosciute da fattori di trascrizione indispensabili per l'espressione del gene codificante PG1. Per determinare se in queste 500 bp aggiuntive del promotore si legano fattori di trascrizione, si potrebbe eseguire un "Gel Mobility Shift Assay". Le proteine prodotte dal fungo in terreno inducente contenente pectina potrebbero essere messe a contatto con il frammento di DNA della regione regolatrice di interesse. Con una successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio, utilizzando sonde specifiche per riconoscere il frammento, si potrebbe stabilire, in base alla velocità di migrazione su gel, se la regione promotrice presa in esame ha legato una proteina (fattore putativo di trascrizione).

L'analisi dell'attività PG *in vitro* ha mostrato in alcuni mutanti complementati un'attività simile al WT, mentre in altri un'attività PG anche molto superiore. Questa differenza potrebbe essere dovuta ad integrazioni multiple del costrutto nel genoma del fungo. Per verificare la correlazione tra elevati livelli di attività PG e il numero di inserzioni del costrutto all'interno del genoma dei mutanti, in prospettiva futura sarà necessario eseguire un'analisi Southern Blot.

Per verificare il ripristino della virulenza dei mutanti complementati e confermare dunque il ruolo della PG1 di *F. graminearum* nel processo infettivo, saranno necessari esperimenti di infezione *in vivo* di spighe di frumento con spore prodotte dai funghi mutanti complementati.



## 6. BIBLIOGRAFIA

- Bai G.H., Desjardins A.E. and Plattner R.D., 2001. Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* 153: 91-98.
- Carpita N. and Gibeaut D., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the cell walls during growth. *Plant Journal* 3: 1-10.
- Hammer J. E. and Holden D. W., 1997. Linking approaches in the study of fungal pathogenesis: a commentary. *Fungal Genetics and Biology* 21: 11 -16.
- Isshiki A., Akimistu K., Yamamoto M. and Yamamoto H., 2001. Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14 (6): 749-757.
- Kikot G.E., Hours R.A. and Alconada T.M., 2009. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. *Journal of Basic Microbiology* 49: 231-241.
- Leach J., Lang B.R. and Yoder O.C., 1982. Methods for selection of mutants and in vitro culture of *Cochliobolus heterostrophus*, *Journal of General Microbiology* 128: 1719 – 1729.
- McMullen M., Jones R. and Gallemborg D., 1997. Scab of wheat and barley: a remerging disease of devastating impact. *Plant Disease* 81: 1340-1348.
- Oeser B., Heidrich P.M., Muller U., Tudzynski P. and Tenberge K.B., 2002. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea* rye interaction. *Fungal Genetics and Biology* 36: 176-186.

- Ribon A. de O. B., Ribeiro J. B., Gonçalves D. B., de Queiroz M. V. and de Araújo E. F., 2009. Gel mobility shift scanning of pectin-inducible promoter from *Penicillium griseoroseum* reveals the involvement of a CCAAT element in the expression of a polygalacturonase gene. *Genetics and Molecular Biology*. 32: 129-132.
- Scott-Craig J.S., Cheng Y.G., Cervone F., De Lorenzo G., Pitkin J.W. and Walton J.D., 1998. Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1497-1503.
- Shieh M.T., Brown R.L., Whitehead M.P., Carey J.W., Cotty P.J., Cleveland T.E. and Dean R.A., 1997. Molecular genetic evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3548-3552.
- Szécsi A., 1990. Analysis of pectic enzyme zymograms of *Fusarium* Species. II. Comparison of polygalacturonase zymograms of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum*. *Journal Phytopathology* 130: 188-196.
- Tenberge K.B., Homann V., Oeser B. and Tudzynski P., 1996. Structure and expression of two polygalacturonase genes of *Claviceps purpurea* oriented in tandem and cytological evidence for pectinolytic enzyme activity during infection of rye. *Phytopathology* 86 (10): 1084-1097.
- ten Have A., Mulder W., Visser J. and van Kan J.A.L., 1998. The endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 11: 1009-1016.
- ten Have A., Tenberge K.B., Benen J.A.E., Tudzynski P., Visser J. and van Kan J.A.L., 2002. The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal plant pathogens. *The Mycota XI, Agricultural Applications*, Kempken (Ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 341-358.



- Tomassini A., Sella L., Raiola A., D'Ovidio R. and Favaron F., 2009. Characterization and expression of *Fusarium graminearum* endo-polygalacturonases *in vitro* and during wheat infection. *Plant pathology* 58 (3): 556-564.
- Wanyoike W.M., Zhensheng K. and Buchenauer H., 2002. Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *European Journal of Plant Pathology* 108: 803-810.

