



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Dipartimento di Territorio e Sistemi Agro-Forestali

TESI DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

**TRATTAMENTO DI *ARABIDOPSIS THALIANA* CON  
UNA XILANASI DEL FUNGO *FUSARIUM*  
*GRAMINEARUM* PER INDUZIONE DI RESISTENZA.**

Relatore:

Prof. Luca Sella

Laureando:

Valentina Rigon

Matricola: 1007361

ANNO ACCADEMICO 2013-2014



A chi insegue i propri sogni.



# INDICE

RIASSUNTO .....	1
ABSTRACT .....	3
1. INTRODUZIONE .....	5
2. SCOPO DELLA TESI.....	11
3. MATERIALI & METODI .....	13
3.1. Preparazione della Xilanasi di <i>F. graminearum</i> .....	13
3.2. Trattamento delle foglie di <i>Arabidopsis thaliana</i> con xilanasi dializzata .....	13
3.3. Infezione delle foglie di <i>Arabidopsis thaliana</i> con patogeni.....	14
3.4. Estrazione di RNA da foglie di <i>Arabidopsis thaliana</i> trattate con xilanasi.....	15
3.5. Trattamento con DNasi e retrotrascrizione.....	16
3.6. Real Time-PCR da cDNA di <i>Arabidopsis thaliana</i> trattata con <i>xilanasi</i> .....	18
4. RISULTATI .....	21
4.1. Analisi dell'espressione dei geni PR1 e PDF1.2 su foglie di <i>Arabidopsis thaliana</i> trattate con xilanasi. ....	21
4.2. Trattamento di foglie di <i>Arabidopsis thaliana</i> con xilanasi e infezione con <i>Pseudomonas syringae pv. maculicola</i> . ....	25
4.3. Trattamento di foglie di <i>Arabidopsis thaliana</i> con xilanasi e infezione con <i>Botrytis cinerea</i> . ....	27
5. DISCUSSIONE .....	29
6. BIBLIOGRAFIA .....	31
Ringraziamenti.....	35



# RIASSUNTO

Le xilanasi sono enzimi degradativi della parete cellulare (Cell Wall Degrading Enzymes: CWDE) prodotti da microrganismi fitopatogeni in grado di idrolizzare completamente lo xilano. Data la capacità di alcune endo- $\beta$ -1,4-xilanasi di fungere da elicitatori di alcune risposte difensive, nel presente lavoro si è studiato l'effetto del trattamento con la xilanasi FGSG\_03624 del fungo *Fusarium graminearum* (nota possedere la capacità di indurre risposta ipersensibile e produzione di  $H_2O_2$  nei tessuti trattati a prescindere dall'azione enzimatica) in piante di *Arabidopsis thaliana* per verificare la possibilità di indurre resistenza nei confronti di microrganismi fitopatogeni.

Inizialmente è stata analizzata l'espressione dei geni PDF1.2, un gene marker della via difensiva di jasmonato ed etilene, e PR1, un gene marker della via difensiva del salicilato, in foglie di *A. thaliana* a 24, 48 e 96 ore dopo il trattamento con la xilanasi. Dall'analisi si è notato che l'espressione del gene PDF1.2 risulta essere indotta nelle foglie trattate a 48 e soprattutto a 96 ore dopo il trattamento; viceversa il trattamento non ha indotto l'espressione di PR1, a dimostrazione che la xilanasi di *F. graminearum* induce le vie di difesa di jasmonato/etilene, notoriamente più efficaci nei confronti di patogeni necrotrofi.

Successivamente, per verificare se l'attivazione di queste vie difensive determina un aumento di resistenza nei tessuti trattati, foglie di *A. thaliana* sono state infettate con il batterio emibiotrofo *Pseudomonas syringe* pv. *maculicola* e il fungo necrotrofo *Botrytis cinerea*. Le infezioni delle foglie sono avvenute dopo 48 ore dal trattamento nel caso di *Pseudomonas syringe* pv. *maculicola* e dopo 48 ore e 96 ore per *Botrytis cinerea*. Dal monitoraggio dei sintomi è emerso che il trattamento delle foglie con xilanasi ha indotto una resistenza parziale contro *Pseudomonas syringe* pv. *maculicola*, con una riduzione dei sintomi del 20% circa rispetto al controllo, mentre è risultato inefficace contro *Botrytis cinerea*.



# ABSTRACT

Xylanases are cell wall degrading enzymes (CWDE) produced by phytopathogenic microorganisms capable of hydrolyzing xylan completely. Since some endo- $\beta$ -1,4-xylanases have been shown to act as elicitors of some defensive responses, in the present work we studied the effect of treatments with the FGSG\_03624 xylanase of the fungus *Fusarium graminearum* (known to induce hypersensitive response and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the treated tissues regardless by the enzymatic activity) in *Arabidopsis thaliana* plants to test the possibility of inducing resistance against phytopathogenic microorganisms.

Initially we analyzed the expression of PDF1.2, a marker gene of the jasmonate/ethylene defensive pathways, and PR1, a marker gene of salicylate defensive pathway, in *A. thaliana* leaves at 24, 48 and 96 hours after treatment with the xylanase. The analysis showed that the expression of the PDF1.2 gene appears to be induced in treated leaves at 48 and especially at 96 hours after treatment ; conversely the treatment did not induce the expression of PR1, demonstrating that the *F. graminearum* xylanase induces the jasmonate/ethylene pathway.

To test whether the activation of this pathway leads to an increase of resistance in the treated tissues, leaves of *A. thaliana* were infected with the hemibiotrophic bacterium *Pseudomonas syringe* *pv.* *maculicola* and the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. Infections of leaves were made 48 hours after treatment in the case of *Pseudomonas syringe* *pv.* *maculicola*, and after 48 and 96 hours for *Botrytis cinerea*. The monitoring of symptoms showed that the xylanase treatment of leaves with induced a partial resistance against *Pseudomonas syringe* *pv.* *maculicola*, with a reduction of symptoms by about 20% compared to the control, while was ineffective against *Botrytis cinerea*.



# 1. INTRODUZIONE

Le piante nel corso della loro evoluzione hanno messo a punto dei sistemi di difesa per resistere agli attacchi di organismi fitopatogeni quali insetti, batteri, virus e funghi. Queste difese si possono raggruppare in difese preformate e difese indotte.

Le difese preformate sono costituite da elementi costitutivi della pianta, come ad esempio particolari strutture morfologiche e strutturali (morfologia fogliare, spessore della cuticola, cere, caratteristiche della parete) e la presenza nei tessuti di sostanze tossiche come le fitoanticipine o le proibitine. Al contrario, le difese indotte necessitano di essere attivate tramite l'attacco di un organismo patogeno, che la pianta recepisce grazie al riconoscimento di precise molecole chiamate elicitori di difesa. Questi sono distinguibili in MAMPs (Microbe Associated Molecular Patterns) o PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) che sono di origine esogena ossia originati dal microorganismo (Boller et al., 2009) oppure DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) (Schulze–Lefert., 2010) se sono endogeni, quindi provenienti dalla pianta in seguito ad interazione col patogeno, come ad esempio frammenti di parete vegetale rilasciati in seguito all'attacco da parte di enzimi degradativi dei patogeni. Quando questi elicitori si legano a specifici recettori PRR (Pattern Recognition Receptor) posti sulla membrana cellulare si innesca un meccanismo a catena causato dall'attivazione dei canali  $Ca^{2+}$  del plasmalemma che porta ad alterazione delle funzionalità degli altri canali di membrana; ciò causa un incremento di  $Ca^{2+}$  nel citosol (Klüsener et al., 2002) che stimola la produzione di anione superossido ( $\cdot O_2^-$ ) attraverso fosforilazione di una NADPH ossidasi di membrana. In seguito l'anione superossido ( $\cdot O_2^-$ ) subisce dismutazione a  $H_2O_2$  ad opera di enzimi chiamati superossido dismutasi (SOD) (Sharma et al., 2012) e a partire da questa si ha una produzione di radicale ossidrilico (OH $\cdot$ ), fortissimo ossidante che causa un "burst ossidativo" che comporta la rapida produzione di ROS (Reactive Oxygen Species) nel sito di inoculo. Il riconoscimento del patogeno da parte del recettore e la notevole produzione di ROS causa la cosiddetta "risposta ipersensibile" (HR), ossia un processo fisiologico che consiste nella che causa la morte cellulare programmata (Programmed Cell Death:

PCD) delle cellule limitrofe al sito di contatto con il patogeno (Morel et al., 1997). Un altro tipo di risposta indotta dall'attacco di patogeni è la produzione di fitoalessine, composti antimicrobici a basso peso molecolare (Hammerschmidt et al., 1999) e proteine di patogenesi (Niki et al. 1998). Le proteine di patogenesi (PR), indotte da ferite o attacchi da parte di organismi patogeni (Niki et al. 1998), sono divise in 17 famiglie, in base alla loro funzione (inibitori di proteasi, defensine, ribonucleasi etc.) e sono note per svolgere un ruolo diretto nella resistenza alle malattie esibendo elevata attività antimicrobica (Tonon et al, 2002; Anand et al., 2004).

La risposta ipersensibile è strettamente correlata alla risposta sistemica della pianta, chiamata SAR (Systemic Acquired Response) (Ryals et al., 1994). Questa è caratterizzata da un aumento della resistenza in tessuti non infetti e distali ed è efficace verso un ampio spettro di patogeni, dai funghi ai virus (Ryals et al., 1996) per periodi che variano da alcune settimane a qualche mese (Fu et al., 2013). L'induzione di SAR non necessita della presenza del patogeno in quanto bastano alcuni composti chimici naturali o sintetici per indurla. Il marker principale di SAR è l'acido salicilico (SA) o salicilato, un fitormone di origine fenolica, coinvolto nell'accumulo di ROS in quanto inibisce l'azione di catalasi (Conrath et al., 1995) e ascorbato perossidasi, enzimi che detossificano la cellula degradando  $H_2O_2$  a  $H_2O$ .

In particolare PR1 è considerato uno dei principali marcatori del pathway difensivo mediato dall'acido salicilico (Maleck et al., 2000).

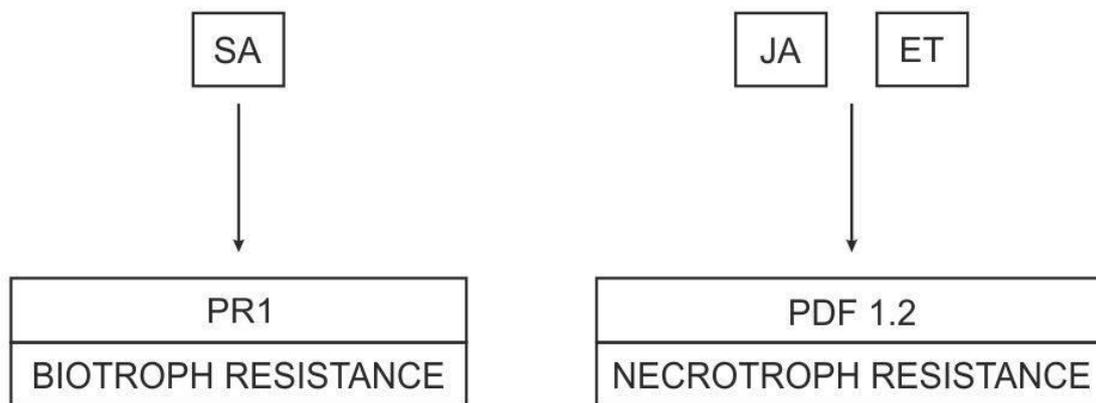
Un altro tipo di resistenza sistemica indotta e diversa da SAR è denominata ISR (Induced Systemic Resistance), una resistenza ai patogeni attivata dall'associazione di batteri non patogeni PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) con le radici di pianta. La ISR differisce da SAR per il fatto che non è caratterizzata dall'accumulo di acido salicilico (Pieterse et al., 1998) ma da jasmonato o acido jasmonico (JA) ed Etilene (ET). L'acido jasmonico e i suoi precursori si riscontrano in diverse fasi del ciclo biologico di una pianta; dallo sviluppo di semi e polline, all'allungamento delle radici. Il jasmonato è sintetizzato anche in seguito ad attacchi alla pianta da parte di insetti fitofagi oppure a causa di lesioni di tipo meccanico. Infatti a seguito delle lesioni un precursore polipeptidico già presente nella pianta, la pro-sistemina, viene processato

in sistemina, un segnale mobile e traslocabile via floema che si lega a specifici recettori attivando delle fosfolipasi che a loro volta andranno a liberare dal doppio strato fosfolipidico di membrana dei residui di acido linoleico (acido grasso polinsaturo). Grazie ad enzimi quali lipossigenasi e allene ossido sintasi vengono sintetizzati i jasmonati (ormoni volatili acido jasmonico e metiljasmonato) i quali inducono la trascrizione di geni di difesa (Ryan et al., 2003). Una delle molecole marker della via del jasmonato è la difensina PDF1.2, un piccolo polipeptide ad attività antimicrobica.

L'etilene è un ormone sintetizzato dalle piante a partire dall'amminoacido metionina, che influisce sulla germinazione e sull'invecchiamento della pianta. Provoca la maturazione dei frutti, lo sviluppo dei germogli, la caduta delle foglie in autunno, la morte di parti della pianta e data la sua natura gassosa lo si trova in tutti gli spazi intracellulari. L'etilene è inoltre coinvolto nelle risposte di difesa della pianta in caso di attacco da parte di patogeni (Val Loon et al., 2006). Jasmonato ed etilene agiscono spesso in modo sinergico nell'attivazione dei pathways di difesa (Memelink, 2009).

Al contrario, il pathway del salicilato e il pathway del jasmonato interagiscono tra loro, inibendosi a vicenda (Brodsen et al., 2006).

Le due pathway differiscono anche nell'efficacia verso i patogeni. Infatti i microrganismi patogeni possono essere di tipo necrotrofo (ossia causano la morte dei tessuti dell'ospite per poi invaderli e nutrirsi del tessuto morto), biotrofo (riescono a crescere in associazione con il tessuto ospite senza uccidere le cellule vegetali fino a quando non sono pronti a riprodursi) oppure emibiotrofi (causano un'infezione nella quale le cellule ospiti restano inizialmente vive ma poi collassano e muoiono con l'avanzamento dell'infezione) (Smith et al., 2011). In base al tipo di associazione che il patogeno crea con la pianta, il tipo di risposta innescata dalla pianta risulta più o meno efficace: la risposta mediata dal Jasmonato è più efficace verso i patogeni necrotrofi, mentre la risposta mediata dal salicilato è più efficace verso patogeni biotrofi, in quanto la produzione di ROS e la conseguente HR nei tessuti potrebbe avvantaggiare il patogeno necrotrofo (fig.1).



**Figura 1** – Modello schematico dei diversi network che attivano nella pianta sistemi di risposta difensiva all’attacco di patogeni biotrofi e necrotrofi.

Un esempio di patogeno necrotrofo è il fungo *Botrytis cinerea*, l’agente responsabile della “Muffa Grigia”, in grado di diffondersi per via aerea e attaccare oltre 200 ospiti delle colture in tutto il mondo. *B. cinerea* produce un’ampia gamma di CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes) e tossine; la sua strategia di attacco si basa principalmente sull’induzione di morte cellulare dell’ospite (Williamson et al., 2007). Tra i patogeni emibiotrofi *Pseudomonas syringae* è un batterio Gram-negativo i cui ceppi sono stati classificati in patovars in base alla pianta ospite nel quale sono stati identificati. *P. syringae* vive sia sulla superficie che nell’apoplasto della pianta e per riuscire a proliferare nel suo ospite deve superare le risposte difensive della pianta mediante produzione di esopolisaccaridi all’interno dell’apoplasto e di composti come la coronatina che alterano le risposte delle piante (Block et al., 2011).

In base al tipo associazione che il patogeno crea con la pianta, il tipo di risposta innescata dalla pianta risulta più o meno efficace: la risposta mediata dal Jasmonato è più efficace verso i patogeni necrotrofi, mentre la risposta mediata dal salicilato è più efficace verso patogeni biotrofi, in quanto la produzione di ROS e la conseguente HR nei tessuti potrebbe avvantaggiare il patogeno necrotrofo.

Attualmente in commercio sono presenti alcune sostanze che fungono da attivatori di risposte di difesa della pianta e al contrario dei fungicidi tradizionali, non hanno effetto diretto sul patogeno. Queste sostanze sono in grado di indurre le piante a produrre

composti di difesa naturali e conferiscono resistenza ad ampio spettro (batteri, funghi, virus, insetti). Il composto più utilizzato è il benzotriazololo (BHT), una molecola simile al SA ma con un livello di fitotossicità più basso rispetto a trattamenti esogeni con SA. Un altro approccio che si può utilizzare è l'utilizzo di elicitori esogeni per indurre resistenza nella pianta; ad esempio proteine quali arpine, flagelline ed enzimi quali poligalatturonasi e xilanasi, in grado di indurre la formazione di elicitori (DAMPs) o di essere riconosciuti direttamente da recettori di pianta.

In particolare le xilanasi sono enzimi degradativi della parete cellulare (Cell Wall Degrading Enzymes: CWDE) appartenenti alla famiglia delle emicellulasi e sono naturalmente secreti da alcuni organismi fitopatogeni durante il processo infettivo. Un componente importante della famiglia di enzimi con attività xilanasica è rappresentato 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), il quale costituisce il componente principale della parete cellulare primaria delle cellule vegetali di specie monocotiledoni. Recenti studi hanno dimostrato che alcune endo- $\beta$ -1,4-xilanasi dei funghi *Botrytis cinerea*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride* e *Fusarium graminearum* sono in grado di scatenare la risposta ipersensibile (Noda et al., 2010, Enkerli et al., 1999, Furman- Matarasso et al., 1999, Sella et al., 2013). In particolare il trattamento di foglie e glumette di *Triticum aestivum* con la xilanasi FGSG\_03624 di *Fusarium graminearum* determina l'induzione di morte cellulare e l'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nei tessuti trattati indipendentemente dall'attività xilanasica (Sella et al., 2013). Recenti studi hanno identificato in pomodoro un recettore ricco di leucine, in grado di riconoscere la xilanasi EIX (Ethylene-inducing xylanase) di *Trichoderma viride* e indurre PCD e l'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ron et al., 2004). In modo analogo FGSG\_03624 potrebbe essere riconosciuta da alcuni recettori di membrana presenti nel frumento e non ancora conosciuti (Sella et al., 2013).



## 2. SCOPO DELLA TESI

In questo lavoro di tesi si è indagato le capacità di indurre resistenza mediante trattamenti con la endo- $\beta$ -1,4-xilanasi FGSG\_03624 di *Fusarium graminearum* in foglie di *Arabidopsis thaliana*. Il riconoscimento in piante di questa xilanasi come un elicitore potrebbe infatti attivare risposte di difesa in modo da rendere la pianta più resistente nei confronti dei patogeni. La xilanasi ottenuta precedentemente nel laboratorio dove ho svolto il mio lavoro di tesi mediante espressione eterologa in *Pichia pastoris* è stata precipitata, purificata ed usata per trattare foglie di *Arabidopsis thaliana*. Una parte del mio lavoro si è concentrata sull'analisi di espressione di 2 geni di *Arabidopsis thaliana* coinvolti nell'induzione di risposte di difesa: PR1, gene marker del pathway del salicilato e PDF1.2, gene marker delle vie del jasmonato ed etilene. L'espressione è stata studiata mediante le tecnica della Real Time PCR utilizzando il gene dell'ubiquitina come housekeeping. L'altra parte del lavoro ha riguardato la verifica dell'effettivo aumento di resistenza in *Arabidopsis thaliana*: dopo trattamento con la xilanasi FGSG\_03624 sono state quindi eseguite delle infezioni con i patogeni *Botrytis cinerea*, un fungo necrotrofo, e *Pseudomonas syringae pv. maculicola*, un batterio emibiotrofo.



## **3. MATERIALI & METODI**

### **3.1. Preparazione della Xilanasi di *F. graminearum***

La xilanasi FG\_03624 di *F. graminearum* è stata ottenuta nel laboratorio dove ho svolto la tesi mediante espressione eterologa nel lievito *Pichia pastoris*.

A 200 ml di una coltura di lievito contenenti la xilanasi di interesse è stato addizionato del *solfato ammonico* al 20% (w/v), con lo scopo di far precipitare le cellule presenti nel mezzo ed eventuali impurità. La soluzione è stata quindi incubata a 4 °C per 1 h, centrifugata a 9000 rpm per 20' e il pellet formatosi è stato scartato mantenendo il surnatante contenente la proteina di interesse. Al surnatante è stato quindi aggiunto *solfato ammonico* all'80% (w/v), con lo scopo di far precipitare la xilanasi FG\_03624. Dopo incubazione a 4°C over night e centrifugazione a 9000 rpm per 20', il precipitato è stato risospeso in circa 10 ml di H<sub>2</sub>O e centrifugato per eliminare gli ultimi residui di impurità, questa volta scartando il pellet. Il surnatante così ottenuto è stato dializzato over night a 4 °C in H<sub>2</sub>O per pulire la proteina dai sali del *solfato ammonico*. La concentrazione della xilanasi è stata valutata mediante analisi SDS-PAGE confrontandola con concentrazioni note di BSA (dati non mostrati).

### **3.2. Trattamento delle foglie di *Arabidopsis thaliana* con xilanasi dializzata**

Foglie di *Arabidopsis thaliana* (allo stadio di 8-12 foglie) coltivate in cella a temperatura controllata (22-20 °C) con un fotoperiodo di 14 ore di luce, sono state recise dalla pianta con l'ausilio di un bisturi sterilizzato con alcool, lavate con H<sub>2</sub>O mq per eliminare eventuali residui di terriccio, asciugate accuratamente e trattate a spruzzo sulla pagina fogliare inferiore nebulizzando la xilanasi dializzata (100 ng/μl) o H<sub>2</sub>O mq come

controllo; alcune foglie sono state recuperate dopo 24, 48 e 96 ore per l'analisi di espressione genica mentre altre, dopo il trattamento, sono state posizionate in piastre Petri contenenti fogli di carta da filtro sterile imbevuti di H<sub>2</sub>O mq sterile e sono state infettate dopo 48 ore con il batterio *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. Per l'infezione con *Botrytis cinerea* si è deciso di eseguire il trattamento in vivo, ossia senza recidere la foglia dalla pianta e l'inoculo è stato eseguito sia 48 che 96 ore dopo il trattamento. In questo caso per favorire l'adesione della xilanasi alla superficie fogliare si è aggiunto a questa e all' H<sub>2</sub>O del controllo l'adesivante *pinolene* alla concentrazione di 0,04% (v/v). Le foglie sono state recise solo prima dell'infezione.

### **3.3. Infezione delle foglie di *Arabidopsis thaliana* con patogeni**

Foglie di *Arabidopsis thaliana* trattate sono state infettate dopo 48 ore con il batterio *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* e dopo 48 e 96 ore con il fungo *Botrytis cinerea*. Nel primo caso *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* è stato fatto crescere per 24 ore in terreno *King's B Broth* (Peptone digerito 20 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 g/l, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1,5 g/l, glicerolo 15 ml/l) a 28 °C in agitazione a 200 giri/minuto; la sospensione batterica è stata poi centrifugata a 5000 rpm per 5 minuti, risospesa in un tampone MgSO<sub>4</sub> 0,01M e diluita per avere una OD<sub>600</sub> di 0,2 (10<sup>8</sup> cfu/ml). L'infezione è stata eseguita sotto cappa infiltrando la pagina fogliare inferiore con l'ausilio di una siringa senza ago.

Nel caso di *Botrytis cinerea* (ceppo B05.10) per l'infezione sono stati utilizzati i conidi ottenuti da piastre di *Botrytis cinerea* cresciuto su PDA (Potato Dextrose Agar: amido di patata 4 g/l, destrosio 20 g/l, bacto agar 15 g/l). I conidi sono stati risospesi in glicerolo 10% (v/v) sterile e contati utilizzando la camera di *Thoma*. In base alla conta i conidi sono stati diluiti in terreno PDB sterile (Potato Dextrose Broth: amido di patata 4 g/l, destrosio 20 g/l) a 10<sup>6</sup>conidi/ml e conservati a -80 °C fino al momento dell'utilizzo. L'infezione è stata eseguita pipettando 5 µl di sospensione conidiale (10<sup>6</sup> conidi/ml in PDB) sulla pagina superiore delle foglie trattate (Debener et al., 1991). Le foglie inoculate sono state monitorate per circa una settimana. La valutazione dei sintomi è

stata eseguita visivamente e analizzando le immagini delle foglie con il programma di elaborazione grafica "*Fiji ImageJ*", in modo da calcolare la percentuale di tessuto infetto (presenza ed estensione di lesioni clorotiche e necrotiche) rispetto al tessuto sano.

### **3.4. Estrazione di RNA da foglie di *Arabidopsis thaliana* trattate con xilanasi**

Foglie di *Arabidopsis thaliana* trattate con *xilanasi* o acqua sono state recuperate dopo 24, 48 e 96 ore dal trattamento per l'analisi di espressione genica. Le foglie sono state recise con l'aiusilio di un bisturi sterilizzato e conservate a -80°C fino al momento dell'estrazione dell'RNA.

L'RNA è stato estratto utilizzando il kit "RNeasy plant mini" della QIAGEN e seguendo il protocollo fornito con il kit.

Prima di iniziare l'estrazione, il BUFFER RLC deve essere addizionato con  $\beta$ -mercaptoetanolo (10  $\mu$ l di  $\beta$ -mercaptoetanolo per 1 ml di BUFFER RLC), in modo da distruggere i legami disolfuro e inattivare quindi le RNasi presenti.

Come primo step circa 150g di tessuto sono stati prelevati, pestellati in presenza di azoto liquido e trasferiti in eppendorf da 2 ml. Alla eppendorf sono stati aggiunti 450  $\mu$ l di BUFFER RLC e il tutto è stato vortexato. Il lisato è stato poi trasferito nelle colonnine fornite dal kit, centrifugato per 2' a massima velocità e il surnatante trasferito in una nuova eppendorf. A questo sono stati aggiunti 0,5 volumi di etanolo (96-100%) e il tutto è stato mescolato ed in seguito trasferito in nuove colonnine fornite dal kit che legano gli acidi nucleici. Si è quindi proceduto con una centrifuga per 30'' a 10000 rpm cui è seguito un lavaggio delle colonnine con 700  $\mu$ l di BUFFER RW1 e successiva centrifugazione per 30'' a 10000. Dopo ulteriori 2 lavaggi con 500  $\mu$ l di BUFFER RPE e centrifugazione per 30'' a 10000, la colonnina è stata posizionata in una nuova eppendorf da 1,5 ml e l'RNA è stato eluito con 40  $\mu$ l di acqua RNasi free centrifugando 1' a 10000 rpm.

La soluzione di RNA è stata conservata alla temperatura di -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Conclusa l'estrazione, la concentrazione di RNA è stata verificata tramite l'utilizzo dello spettrofotometro (A260/A280) che permette di valutare qualitativamente e quantitativamente l'estrazione di acidi nucleici.

I valori di assorbanza ricavati sono stati convertiti in valori di concentrazione (ng/μl) attraverso la seguente formula:

$$C = A_{260} \times 40 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{FATTORE DI DILUIZIONE}$$

La quantificazione è stata verificata anche su gel di agarosio al 2% (w/v) in presenza di tampone TAE 1X sterile.

Prima del caricamento, ai campioni di RNA è stato aggiunto il tampone LB 5X (per avere una concentrazione finale 2X) e, dopo incubazione per 5' a 65 °C per degradare eventuali strutture secondarie, sono stati addizionati 2 μl di Etidio Bromuro 0,1 % (v/v) per poter visualizzare le bande di RNA ribosomiale su gel. Dopo il caricamento dei campioni, il gel è stato fatto correre per circa 15' a 90 V.

L'Etidio Bromuro viene utilizzato per le corse elettroforetiche come intercalante di acidi nucleici in quanto quando viene esposto a raggi UV è in grado di emettere fluorescenza, molto più intensa se intercalato a DNA o RNA.

In base alle intensità delle bande rilevate su gel è stato possibile uniformare la quantità di RNA per ogni campione.

### **3.5. Trattamento con DNasi e retrotrascrizione**

La retrotrascrizione è il passaggio fondamentale che permette la conversione dell'RNA in cDNA, ossia il filamento di DNA complementare costituito esclusivamente da sequenze codificanti. Questo passaggio è reso possibile grazie all'utilizzo della *Retrotrascrittasi*, un enzima che agisce come una normale polimerasi, ad eccezione del fatto che utilizza come stampo di partenza templati di RNA.

Prima della retrotrascrizione , i campioni di RNA quantificati sono stati sottoposti a trattamento con DNasi, un enzima in grado di eliminare eventuali tracce di DNA genomico, che interferirebbero successivamente con la Real-Time PCR.

Il trattamento è stato eseguito aggiungendo a 8 µl di RNA, 1 µl di DNasi e 1 µl di buffer 10X (Promega), e incubando a 37°C per 30'. Ad ogni campione viene in seguito aggiunto 1 µl di stop solution a cui segue un'ulteriore incubazione a 65 °C per 10' per bloccare la reazione. Per la retrotrascrizione sono stati utilizzati 1,5 µg di RNA per campione. Inizialmente è stata preparata una miscela contenente RNA e 1 µg di primer oligo dT (Tab. 1).

	24H CONTROLLO	24H TRATTATO	48H CONTROLLO	48 TRATTATO	96H CONTROLLO	96H TRATTATO
RNA+Dnasi	13 µl	1,38 µl	1,38 µl	2,06 µl	2,75 µl	5,5 µl
Oligo dT 500 ng/µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2µl
H <sub>2</sub> O	0 µl	6,62 µl	6,62 µl	5,94 µl	5,25 µl	2,5 µl
Volume finale	15 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

**Tabella 1** – Volumi di reagenti aggiunti nei diversi campioni.

I campioni sono stati quindi incubati a 70 °C per 5' e a 4 °C per 5'. In seguito vengono addizionati il buffer 5X, l'enzima RT (Promega), i dNTPs (0,5 mM finali), l'MgCl<sub>2</sub> (3 mM finali) e l'H<sub>2</sub>O (Tab. 2)

	24H CONTROLLO	24H TRATTATO	48H CONTROLLO	48H TRATTATO	96H CONTROLLO	96H TRATTATO
BUFFER [5X]	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl
dNTPs (stock 10mM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
RT	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Mg <sup>2+</sup> (stock 25 mM)	0 µl	4,3 µl	4,3 µl	4 µl	3,8 µl	2,8 µl
H <sub>2</sub> O	13,5 µl	14,2 µl	14,2 µl	14,5 µl	14,7 µl	15,7 µl
Volume finale	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40µl	40 µl

**Tabella 2** – Volumi di reagenti aggiunti nei diversi campioni.

Tenendo conto del fatto che all'interno del buffer 10X utilizzato per il trattamento con la DNasi è già contenuta una quantità di Mg<sup>2+</sup> si sono aggiunti ad ogni campione volumi variabili di MgCl<sub>2</sub> (Tab. 2).

La retrotrascrizione è stata quindi eseguita utilizzando il seguente ciclo:

25 °C x 5'

42 °C x 1h

70 °C x 15'

### **3.6. Real Time-PCR da cDNA di *Arabidopsis thaliana* trattata con xilanasi**

Per l'amplificazione e la quantificazione in tempo reale è stato utilizzato il metodo della Real-time PCR, utilizzando lo strumento Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH).

La Real-time PCR è una tecnica che permette di amplificare e quantificare simultaneamente il DNA dei nostri campioni, grazie alla presenza di fluorofori o sonde (in questo caso si è usato il SYBR® Green, fluoroforo che si intercala alla doppia elica del DNA ed emette fluorescenza a 510 nm) in grado di emettere fluorescenza nel momento della formazione di dsDNA proporzionalmente alla quantità di dsDNA amplificato. In ogni eppendorf sono stati aliquotati 10 µl di Master Mix 2X (Qiagen, contenente Mg<sup>2+</sup>, i nucleotidi e il SYBR® Green), 1 µl di primer forward, 1 µl di primer reverse (alla concentrazione finale di 1 µM finale), 5 µl di H<sub>2</sub>O mq e 3 µl di cDNA. Nel caso dei controlli negativi vengono aggiunti 3 µl di H<sub>2</sub>O al posto del cDNA (Tab. 3)

	Campione	Controllo neg.
Master Mix 2X	10µl	10µl
Primer forward	1µl	1µl
Primer reverse	1µl	1µl
cDNA	3µl	0µl
H <sub>2</sub> O	5µl	8µl
Totale	20µl	20µl

**Tabella 3** – Volumi di reagenti aggiunti nei diversi campioni.

La real time PCR è stata eseguita utilizzando coppie di primers specifiche per 3 geni: PR1 (coinvolto nella via del salicilato), PDF1.2 (coinvolto nella via del jasmonato) e UBQ

(gene codificante ubiquitina, utilizzato da noi come gene housekeeping, in quanto espresso costitutivamente nei tessuti a prescindere dal trattamento). Le sequenze dei primers utilizzati sono le seguenti:

UBQ5\_F: 5'- GTGGTGCTAAGAAGAGGAAGA - 3'

UBQ5\_R: 5'- TCAAGCTTCAACTCCTTCTTT - 3'

PDF1.2\_F: 5'- GGGTTTGCGGAAACAGTAATG - 3'

PDF1.2\_R: 5'- TGTAACAACAACGGGAAAATAAAG - 3'

PR1\_F: 5'- ACTAAGAGGCAACTGCAGACTCAT - 3'

PR1\_R: 5'- ATGGCTTCTCGTTCACATAATTCC - 3'

Per ogni campione sono state preparate 3 repliche più 3 repliche per ogni controllo negativo, per un totale di 63 campioni:

9 campioni contenenti cDNA 24h CONTROLLO (24h C)

9 campioni contenenti cDNA 24h TRATTATO (24h T)

9 campioni contenenti cDNA 48h CONTROLLO (48h C)

9 campioni contenenti cDNA 48h TRATTATO (48h T)

9 campioni contenenti cDNA 96h CONTROLLO (96h C)

9 campioni contenenti cDNA 96h TRATTATO (96h T)

3 campioni contenenti i controlli negativi per UBQ

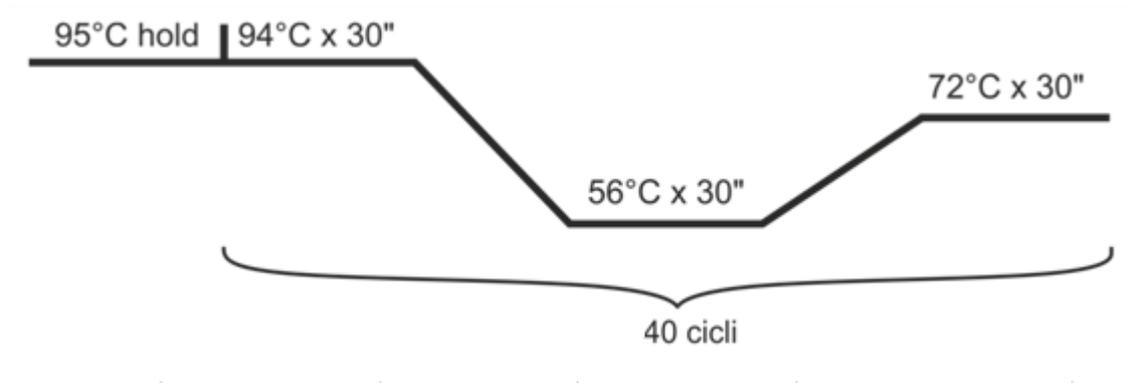
3 campioni contenenti i controlli negativi per PR1

3 campioni contenenti i controlli negativi per PDF1.2

Lo schema di caricamento dei campioni nello strumento Real-Time è il seguente:

	24h C	24h T	48h C	48h T	96h C	96h T	Controllo neg.
UBQ	1-3	10-12	19-21	28-30	37-39	46-48	55-57
PR1	4-6	13-15	22-24	31-33	40-42	49-51	58-60
PDF1.2	7-9	16-18	25-27	34-36	43-45	52-54	61-63

Il termociclatore è stato quindi impostato con i seguenti parametri (fig. 2):



**Figura 2** – Parametri del termociclatore per la Real Time PCR

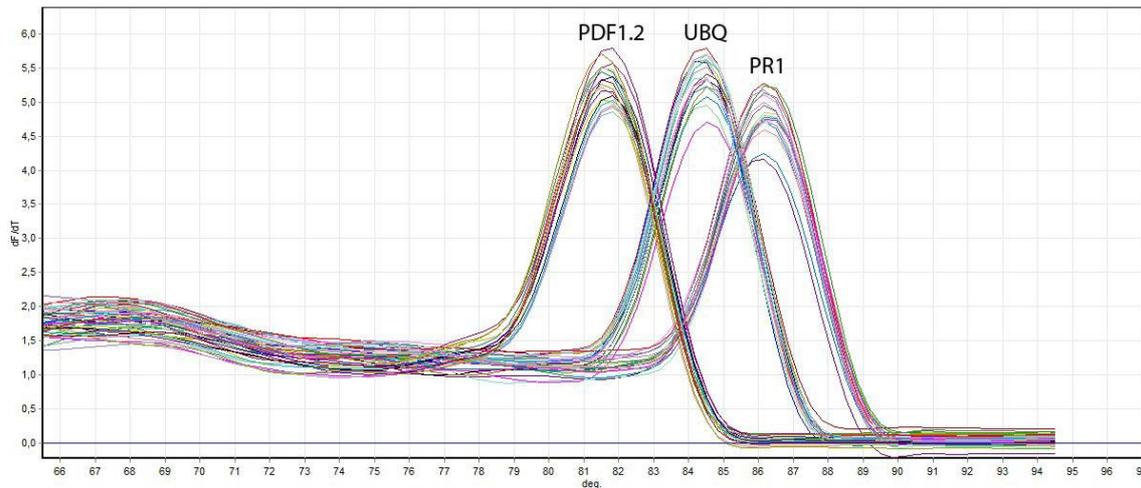
L'amplificato ottenuto è stato poi quantificato tramite quantificazione comparativa, usando il software Rotor-GeneQ (Qiagen GmbH) e fissando a 1 l'espressione relativa del gene housekeeping dell'UBQ. La specificità dei prodotti di amplificazione è stata verificata tramite l'analisi di melting, che si ottiene alla fine dell'amplificazione innalzando la T da 65 °C a 95 °C e misurando il calo di fluorescenza dovuto alla separazione dei due filamenti di DNA stampo con conseguente dissociazione del fluoroforo.

## **4. RISULTATI**

### **4.1. Analisi dell'espressione dei geni PR1 e PDF1.2 su foglie di *Arabidopsis thaliana* trattate con xilanasi.**

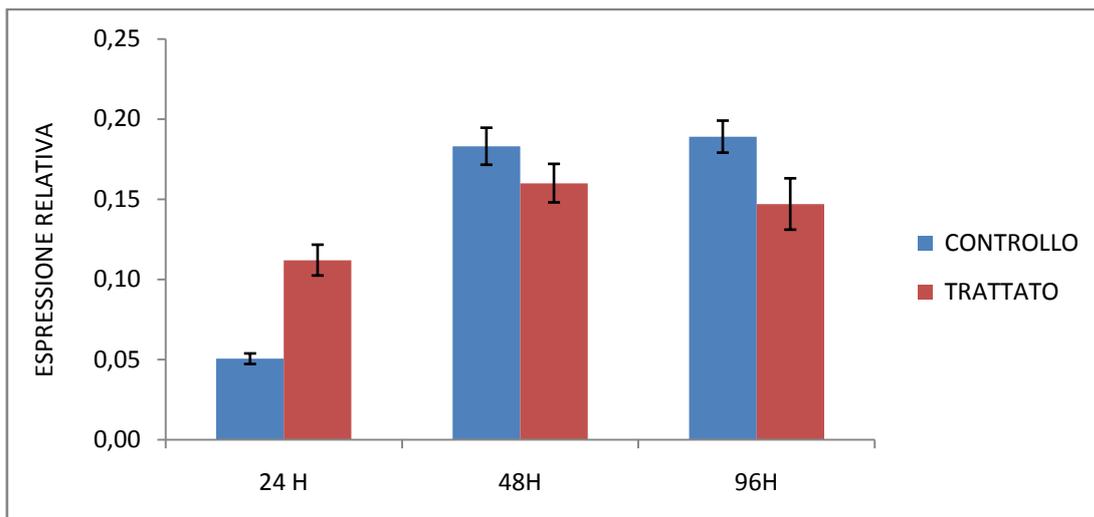
L'analisi d'espressione dei geni PR1 e PDF1.2 di *Arabidopsis thaliana* è stata eseguita tramite l'utilizzo della Real Time PCR a partire da cDNA ottenuto da RNA estratto da foglie di *A. thaliana* a 24, 48 e 96 ore dal trattamento con la xilanasi FGSG\_03624 di *F. graminearum*. Come controllo è stato utilizzato cDNA ottenuto da RNA estratto da foglie trattate con H<sub>2</sub>O e il gene dell'ubiquitina di *A. thaliana* (UBQ) è stato utilizzato come housekeeping.

L'analisi di espressione è stata effettuata. Prima di procedere con la quantificazione comparativa dell'espressione dei geni d'interesse è stata verificata la specificità di amplificazione dei geni PR1, PDF1.2 e UBQ tramite l'analisi di melting. Tutte le curve corrispondenti agli amplificati di ogni singolo gene risultavano avere un picco alla stessa temperatura di melting, indice di una buona specificità di amplificazione e dell'assenza di contaminanti (Fig. 3).



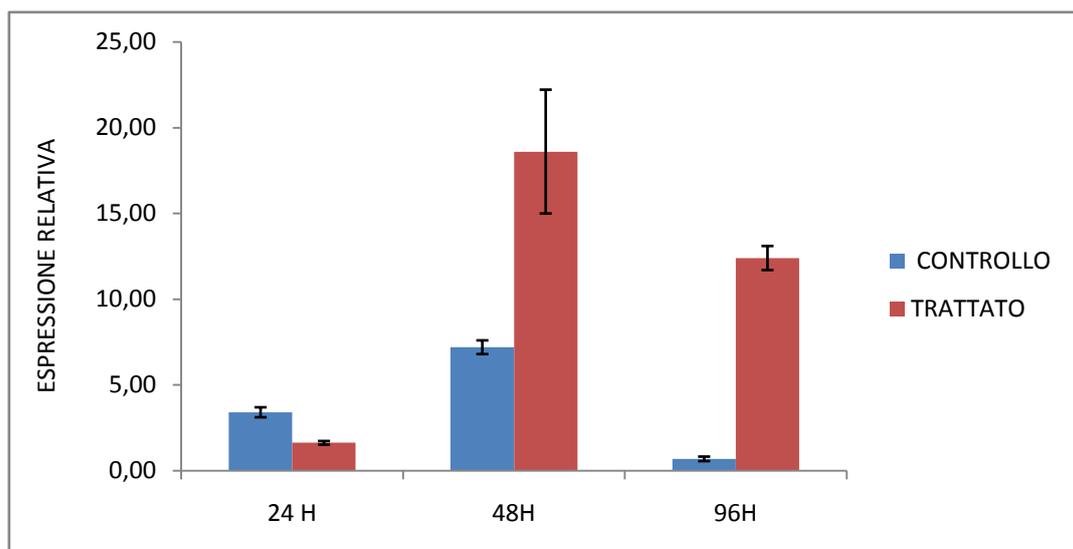
**Figura 3** – Analisi di melting dei prodotti di amplificazione ottenuti dalle foglie di controllo e trattate di *Arabidopsis thaliana* a 24, 48 e 96 ore dal trattamento (Rotor-Gene Q, Qiagen).

La quantificazione comparativa dell'espressione ha dimostrato che il gene PR1 risulta avere un'espressione molto bassa (5 volte minore dell'ubiquitina a 48 e a 96 ore dal trattamento, la cui espressione è stata fissata a 1) e piuttosto costante nel tempo. Inoltre l'espressione di PR1 a 48 e a 96 ore è risultata simile sia nelle foglie trattate che in quelle di controllo (Fig.4).



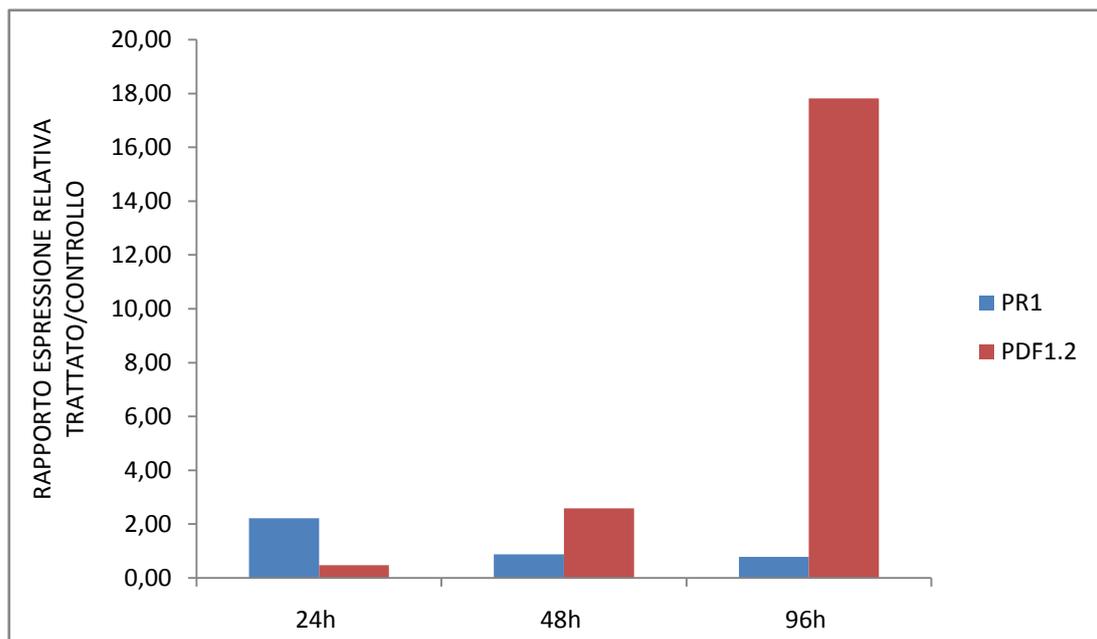
**Figura 4** – Espressione relativa del gene PR1 in foglie di *Arabidopsis thaliana* di controllo e trattate con xilanasi dopo 24, 48 e 96 ore dal trattamento. L’espressione dell’ubiquitina è stata posta uguale a 1. L’espressione relativa è stata calcolata utilizzando il software Rotor-Gene 2.0.3.2 (Qiagen GmbH).

Per quanto riguarda il gene PDF1.2, l’analisi di espressione a 24 ore dal trattamento dimostra una espressione leggermente maggiore nel controllo rispetto al trattato; a 48 ore si verifica un forte innalzamento del livello di espressione del gene PDF1.2 sia nel controllo che nel trattato, dove tuttavia il gene risulta mostrare una induzione di espressione decisamente più forte (circa 20 volte rispetto all’ubiquitina). A 96 ore si manifesta invece un forte calo di espressione nel controllo mentre nel trattato il gene PDF1.2 risulta rimanere a livelli piuttosto elevati (12-13 volte circa rispetto all’ubiquitina)(Fig. 5).



**Figura 5** – Espressione relativa del gene PDF1.2 in foglie di *Arabidopsis thaliana* di controllo e trattate con xilanasi dopo 24, 48 e 96 ore dal trattamento. L'espressione dell'ubiquitina è stata posta uguale a 1. L'espressione relativa è stata calcolata utilizzando il software Rotor-Gene 2.0.3.2(Qiagen GmbH).

I rapporti dei livelli di espressione relativa dei geni PDF1.2 e PR1 dimostrano che l'espressione del gene PDF1.2 risulta essere indotta nelle foglie trattate sia a 48 ore (circa 2,5 volte) che a 96 ore, dove raggiunge livelli di espressione circa 18 volte superiori. Per quanto riguarda PR1, dopo una iniziale induzione a 24 ore (circa 2 volte), a 48 e 96 ore mantiene un livello di espressione inferiore a 1, indice che l'espressione del gene PR1 non è indotta dal trattamento con xilanasi.



**Figura 6** – Rapporto tra l'espressione relativa dei geni PDF1.2 e PR1 nelle foglie di *Arabidopsis thaliana* trattate con xilanasi rispetto a foglie di controllo dopo 24, 48 e 96 ore dal trattamento. L'espressione relativa è stata calcolata utilizzando il software Rotor-Gene 2.0.3.2 (Qiagen GmbH), fissando a 1 l'espressione del gene housekeeping dell'UBQ.

## 4.2. Trattamento di foglie di *Arabidopsis thaliana* con xilanasi e infezione con *Pseudomonas syringae pv. maculicola*.

Foglie di *Arabidopsis thaliana* sono state selezionate e trattate con la xilanasi FGSG-03624 o con H<sub>2</sub>O come controllo. Dopo 48 ore dal trattamento le foglie sono state infiltrate con il batterio *Pseudomonas syringae pv. maculicola*. Le foglie sono state quindi monitorate e fotografate per alcuni giorni valutando il decorso dei sintomi. Dopo 3 giorni dall'inoculo si nota chiaramente la presenza di aloni clorotici nelle foglie di controllo, che in alcuni casi ricoprono tutta la superficie fogliare (Fig. 7). Le foglie trattate invece, nonostante presentino anch'esse aloni clorotici, risultano essere meno sintomatiche (Fig. 8).



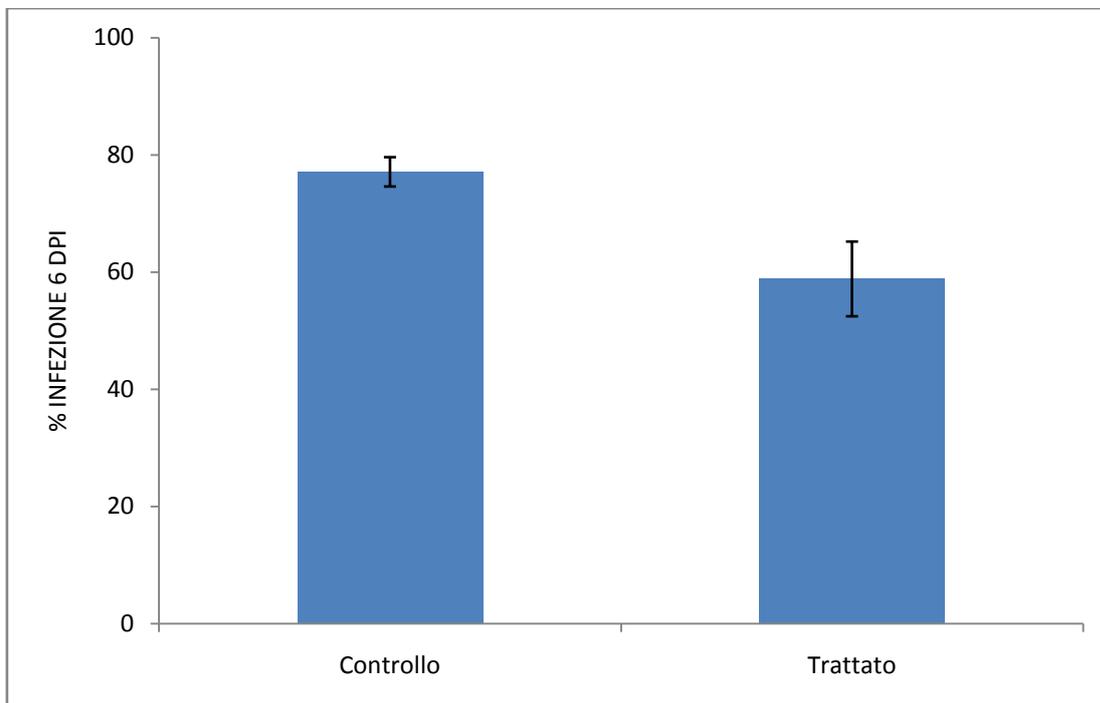
**Figura 7** – Foglie di controllo dopo 3 giorni dall'infezione con *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*.



**Figura 8** – Foglie trattate con xilanasi dopo 3 giorni dall'infezione con *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*.

Dopo 6 giorni dall'inoculo le foglie di controllo risultavano quasi completamente sintomatiche, con estesi aloni clorotici su tutta la superficie fogliare, mentre le foglie trattate manifestavano sintomi in misura minore. La misura delle aree infette rispetto all'area fogliare totale (espressa in %) ha evidenziato che le foglie trattate con xilanasi,

e in seguito infettate con *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, mostrano una riduzione dei sintomi del 20% circa rispetto alle foglie di controllo (Fig. 9).

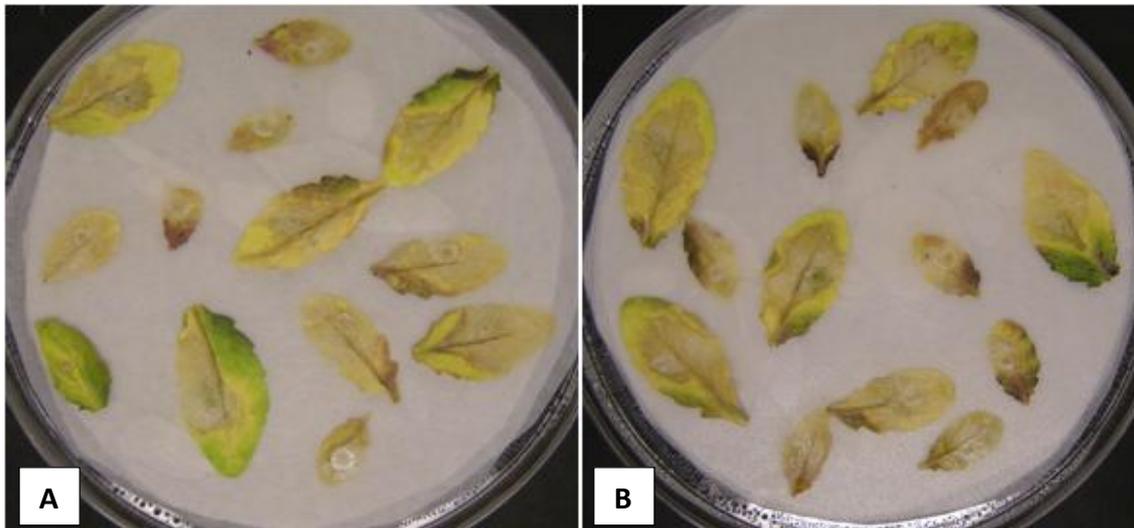


**Figura 9** – In grafico è riportata la % media  $\pm$  errore standard di tessuto sintomatico in foglie trattate con xilanasi e di controllo a 6 giorni dall'infezione con *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. La % di tessuto infetto è stata ottenuta utilizzando il software di elaborazione grafica "Fiji imageJ". Gli esperimenti di infezione sono stati ripetuti 2 volte.

### **4.3. Trattamento di foglie di *Arabidopsis thaliana* con xilanasi e infezione con *Botrytis cinerea***

Il trattamento delle foglie di *Arabidopsis thaliana* con la xilanasi di *F. graminearum* è stato eseguito aggiungendo alla xilanasi e all'H<sub>2</sub>O del pinolene come adesivante e recidendo le foglie subito prima dell'inoculo con conidi di *Botrytis cinerea*. L'infezione è stata effettuata dopo 48 e 96 ore dal trattamento e le foglie sono state fotografate e monitorate per circa una settimana. Sia nel caso dell'infezione dopo 48 ore che dopo

96 ore non si sono manifestate differenze rilevanti tra le foglie controllo e le foglie trattate con xilanasi: dopo 6 giorni dall'inoculo tutte le foglie risultavano sintomatiche e i marciumi fogliari erano comparabili (Fig.10).



**Figura 10** – Foglie di controllo (A) e foglie trattate con xilanasi (B) 6 giorni dopo l'infezione con conidi di *Botrytis cinerea* (infezione dopo 96 ore dal trattamento).

## 5. DISCUSSIONE

Le xilanasi sono enzimi degradativi della parete cellulare appartenenti alla famiglia delle emicellulasi e sono naturalmente secreti da alcuni organismi fitopatogeni durante il processo infettivo. Recenti studi hanno dimostrato che alcune endo- $\beta$ -1,4-xilanasi dei funghi *Botrytis cinerea*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride* e *Fusarium graminearum* sono in grado di scatenare la risposta ipersensibile in piante a prescindere dalla loro attività enzimatica (Noda et al., 2010, Enkerli et al., 1999, Furman- Matarasso et al., 1999, Sella et al., 2013). In particolare il trattamento di foglie e glumette di *Triticum aestivum* con la xilanasi FGSG\_03624 di *Fusarium graminearum* determina l'induzione di morte cellulare e l'accumulo di  $H_2O_2$  nei tessuti trattati indipendentemente dall'attività xilanasica (Sella et al., 2013). In questo lavoro di tesi è stata valutata la capacità di questa xilanasi di indurre risposte di difesa nella pianta modello *Arabidopsis thaliana*. Per prima cosa si è studiata l'espressione dei geni di difesa PR1(marker del pathway del salicilato) e PDF1.2 (marker del pathway del jasmonato e dell'etilene) dopo il trattamento con questa xilanasi in modo da verificare se questa fosse in grado di attivare una specifica via difensiva.

Lo studio di espressione ha evidenziato che la trascrizione del gene PDF1.2 risulta essere indotta dopo 48 ore dal trattamento con la xilanasi, con livelli di espressione circa 2 volte maggiori rispetto al controllo non trattato e 20 volte maggiori rispetto al gene housekeeping UBQ. A 96 ore dal trattamento l'espressione del gene PDF1.2 rimane a livelli elevati, con una espressione relativa circa 18 volte maggiore rispetto al controllo e 13 volte maggiore rispetto all'UBQ. Il gene PR1 risulta invece non essere indotto dal trattamento. La xilanasi FGSG\_03624 di *Fusarium graminearum* appare quindi indurre l'attivazione di geni di difesa coinvolti nelle vie del jasmonato e dell'etilene, che dovrebbero conferire maggiore resistenza nei confronti dei patogeni necrotrofi. Questo risultato è in accordo con quanto osservato con la xilanasi EIX (Ethylene-inducing xylanase) di *Trichoderma viride*, in grado di indurre la produzione di etilene in foglie di *Nicotiana tabacum* trattate (Anderson et al., 1993). Per verificare l'eventuale induzione di resistenza, foglie di *Arabidopsis thaliana* sono state trattate con la xilanasi

FGSG\_03624 e successivamente infettate dopo 48 ore con il batterio emibiotrofo *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* e con il fungo necrotrofo *Botrytis cinerea*. La misura dell'area fogliare infetta ha consentito di dimostrare che il trattamento ha determinato un aumento di resistenza nei confronti di *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* del 20% circa rispetto al controllo. Probabilmente l'induzione delle vie del jasmonato e dell'etilene contribuisce a rallentare la fase necrotrofica del batterio. Viceversa nel caso di *Botrytis cinerea* non si è osservata nessuna riduzione dei sintomi di marciume a seguito del trattamento. In seguito ai risultati negativi ottenuti con *Botrytis cinerea* si è pensato di infettare le foglie dopo 96 ore dal trattamento, ma nonostante questo non si è osservata induzione di resistenza significativa. La mancata induzione di resistenza nei confronti di *Botrytis cinerea* potrebbe dipendere da molteplici cause: il fungo potrebbe aver prodotto delle sostanze elicitrici in grado di attivare la via del salicilato (El Oirdi et al., 2011), la quale è nota antagonizzare la via del jasmonato annullandone l'effetto (Brodsen et al., 2006). Oppure il tempo per l'induzione di risposte di difesa nella pianta non è stato sufficiente per permettere di contrastare efficacemente *Botrytis cinerea*, un patogeno necrotrofo molto aggressivo. Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che la xilanasi è stata spruzzata sulle foglie e necessita di un periodo di tempo per penetrare attraverso gli stomi e attivare le risposte di difesa. Inoltre, l'aumento di espressione di PDF1.2 osservata soprattutto a 96 ore dal trattamento potrebbe indicare che una efficace attivazione di risposte di difesa nella pianta potrebbe avere luogo più tardivamente rispetto alla velocità di colonizzazione del tessuto fogliare da parte di *Botrytis cinerea* (in grado di infettare la foglia in pochissimi giorni). Ulteriori analisi verranno svolte in futuro per chiarire questo aspetto.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Anand A., Lei Z.T., Summer L.W., Mysore K.S. (2004) "Apoplasmic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal." *Mol. Plant-Microbe Interact*, 17(12):13-17.
- Anderson J.D., Bailey B.A., Taylor R., Sharon A., Avni A., Mattoo A.K., Fuchs Y. (1993) "Fungal Xylanase Elicits Ethylene Biosynthesis and other Defense Responses in Tobacco." *Proceedings of the International Symposium on Cellular and Molecular Aspects of Biosynthesis and Action of the Plant Hormone Ethylene*, 16:197 -204.
- Block A., Alfano J.R. (2011) "Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys?" *Cur. Opinion Microbiol.*, 14:39–46.
- Boller T., He S.Y. (2009) "Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens." *Science*, 324:742–744.
- Brodersen P., Petersen M., Bjørn Nielsen H., Zhu S., Newman M.A., Shokat K.M., Rietz S., Parker J., Mundy J. (2006) "Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4." *Plant J.*, 47(4):532-46.
- Collins T., Gerday C., Feller G., (2005) "Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases." *FEMS Microbiol. Rev.*, 29:3–23.
- Conrath U., Chen Z., Ricigliano J.R., Klessing D. (1995) "Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco." *Plant Biol.*, 92:7143-7147.
- Debener T., Lehnackers H., Arnold M., Dangl J.L. (1991) "Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate." *Plant J.*, 1(3):289-302.

- El Oirdi M., El Rahman T.A., Rigano L., El Hadrami A., Rodriguez M.C., Daayf F., Vojnov A., Bouarab K. (2011) "*Botrytis cinerea* Manipulates the Antagonistic Effects between Immune Pathways to Promote Disease Development in Tomato." *Plant Cell*, 23(6): 2405–2421.
- Enkerli J., Felix G., Boller T. (1999) "The Enzymatic Activity of Fungal Xylanase Is Not Necessary for Its Elicitor Activity." *Plant Physiol.*, 121: 391-398.
- Fu Z.Q., Dong X.(2013) "Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense." *Ann. Rev. Plant Biol.*, 64:839-863.
- Furman-Matarasso N., Cohen C., Du Q., Chejanovsky N., Hanania H., and Avni A. (1999) "A Point Mutation in the Ethylene-Inducing Xylanase Elicitor Inhibits the  $\beta$ -1-4-Endoxylanase Activity But Not the Elicitation Activity." *Plant Physiol.*, 121(2):345–352.
- Hammerschmidt R, Dann E.K. (1999) "The role of phytoalexins in plant protection." *Novartis Found Symp.*, 223:175-190.
- Klüsener B., Young J.J., Murata Y., Allen G.J., Mori I.C., Hugouvieux V., Schroeder J.I. (2002) "Convergence of Calcium Signaling Pathways of Pathogenic Elicitors and Abscisic Acid in Arabidopsis Guard Cells." *Plant Physiol.*, 130(4): 2152–2163.
- Maleck K., Levine A., Eulgem T., Morgan A., Schimdt J., Lawton K.A., Dangl J.L., Dietrich R.A. (2000) "The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance." *Nat. Genet.*, 26: 403-410.
- Memelink J. (2009) "Regulation of gene expression by jasmonate hormones." *Phytochem.*, 70:1560-1570.
- Morel J.B., Dangl J.L. (1997) "The hypersensitive response and the induction of cell death in plants." *Cell Death Differ.*, 4(8):671-683.
- Niki T., Mitsubara I., Seo S., Ohtsubo N., Ohashi Y. (1998) "Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves." *Plant Cell Physiol.*, 39:500–507.

- Noda J., Brito N., González C. (2010) "The *Botrytis cinerea* xylanase Xyn11A contributes to virulence with its necrotizing activity, not with its catalytic activity." *BMC Plant Biol.*, 10-38.
- Pieterse C.M.J., van Wees S.C.M., van Pelta J.A., Knoester M., Laana R., Gerritsb H., Weisbeek P.J, van Loona L.C. (1998) "A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*." *Plant Cell.*, 10:1571-1580.
- Ron M., and Avni A. (2004) "The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato". *Plant Cell*, 16:1604-1615.
- Ryals J., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H-Y., Hunt M.D. (1996) "Systemic acquired resistance." *Plant Cell*, 8:1809–1819.
- Ryals J., Uknes S., Ward E. (1994) "Systemic acquired resistance." *Plant Physiol.*, 104:1109-1112.
- Ryan C.A. and Pearce G. (2003) " Systemins: A functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 100:14577–14580.
- Schulze-Lefert P. (2010) "99th Dahlem Conference on Infection, Inflammation and Chronic Inflammatory Disorders: Innate immune responses in plants." *Clin. Exp. Immunol.*, 160(1): 62–69.
- Sella L., Gazzetti K., Faoro F., Odorizzi S., D'Ovidio R., Schäfer W., Favaron F. (2013) "A *Fusarium graminearum* xylanase expressed during wheat infection is a necrotizing factor but is not essential for virulence." *Plant Physiol. Biochem.*, 64:1-10.
- Sharma P., Bhushan Jha C., Dubey R.S., Pessaraki M. (2012) "Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions." *J. Bot.*, 2012, DOI 10.1155/2012/217037
- Smith A.M., Coupland G., Dolan L., Harberd N., Jones J., Martin C., Sablowski R., Amey A. (2011) "Biologia delle piante ©", Zanichelli Editore.

- Tonon, C., Guevara G., Oliva C., Daleo G. (2002) "Isolation of a potato acidic 39kDa  $\beta$ -1,3-glucanase with antifungal activity against *Phytophthora infestans* and analysis of its expression in potato cultivars differing in their degrees of field resistance." J. Phytopathol., 150: 189-195.
- van Loon L.C., Geraats B.P., Linthorst H.J. (2006) "Ethylene as a modulator of disease resistance in plants." Trends Plant Sci., 11(4):184-191.
- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., Van Kan J.A.L. (2007) "*Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease." Mol. Plant Pathol., 8(5):561-580.
- 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.

# Ringraziamenti

*Desidero innanzitutto ringraziare il Professor Luca Sella, la Dottoressa Maria Chiara Paccanaro e il team del laboratorio di Patologia Vegetale, per avermi ospitato in questi mesi e per avermi aiutata a svolgere il mio lavoro di tesi.*

*Grazie anche a mamma Annalisa e papà Walter, che hanno sempre creduto in me spronandomi a inseguire i miei sogni e per avermi resa la persona che sono.*

*Grazie ad Andrea, pilastro fondamentale in questo difficile periodo, per tutta la pazienza dimostratami anche nei momenti più bui, dove starmi accanto è un'ardua impresa .*

*Grazie a Gioia per le ore di studio e le pause caffè, il sostegno nel finire gli ultimi esami e nella scrittura di questa tesi.*

*Un sentito ringraziamento va anche a Valentina, storica amica sempre presente nei momenti di bisogno anche se lontana.*

*Infine, ma non di minor importanza, un grazie a tutto lo staff del ristorante e alla famiglia Milano, che garantendomi un lavoro in questo tempo di crisi, mi hanno permesso di ultimare gli studi e raggiungere questo importante traguardo.*