



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

Dipartimento di TERRITORIO E SISTEMI AGRO FORESTALI

TESI DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

**KNOCK-OUT DI UN GENE CODIFICANTE UNA ENDO- β -1,4-XILANASI
DEL FUNGO FITOPATOGENO *FUSARIUM GRAMINEARUM***

Relatore:
Prof. LUCA SELLA

Laureanda:
SILVIA LAMBURGHINI
Matricola n. 595292

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

INDICE

1. RIASSUNTO	pag.4
2. ABSTRACT	pag.5
3. INTRODUZIONE	pag.6
4. SCOPO DELLA TESI	pag.9
5. MATERIALI E METODI	pag.10
5.1 Preparazione del costrutto	pag.10
5.1.1 <i>Estrazione del DNA genomico di F. graminearum</i>	pag.10
5.1.2 <i>Amplificazione delle due regioni fiancheggianti il gene Fgsg_11487 mediante PCR</i>	pag.10
5.1.3 <i>PCR “fusion”</i>	pag.12
5.1.4 <i>PCR “nested” e purificazione del costrutto</i>	pag.12
5.2 Clonaggio dei costrutti nel vettore plasmidico e trasformazione del fungo	pag.15
5.2.1 <i>Integrazione dei costrutti tramite reazione di ligasi</i>	pag.15
5.2.2 <i>Trasformazione batterica di E.coli e piastramento</i>	pag.15
5.2.3 <i>Estrazione DNA plasmidico e digestione con enzimi di restrizione</i>	pag.16
5.2.4 <i>Protoplasting del fungo Fusarium graminearum</i>	pag.17
5.2.5 <i>Trasformazione dei protoplasti</i>	pag.18
5.2.6 <i>Selezione e piastramento dei mutanti</i>	pag.18
5.3 Analisi dei mutanti	pag.20
5.3.1 <i>Estrazione DNA genomico ed analisi PCR</i>	pag.20
5.3.2 <i>Preparazione delle sonde e marcatura mediante PCR</i>	pag.20
5.3.3 <i>Estrazione DNA genomico e digestione</i>	pag.21
5.3.4 <i>Elettroforesi su gel agarosio e Southern blot</i>	pag.22
6. RISULTATI	pag.24
6.1 Preparazione del costrutto per il knock-out genico	pag.24
6.1.1 <i>Amplificazione delle regioni fiancheggianti UP e DOWN</i>	pag.24
6.1.2 <i>PCR “fusion”</i>	pag.25
6.1.3 <i>PCR “nested”</i>	pag.25
6.1.4 <i>Clonaggio dei costrutti nel vettore pGEM-T Easy</i>	pag.27
6.1.5 <i>Digestione ed isolamento del costrutto</i>	pag.29

6.2 Trasformazione del fungo <i>F. graminearum</i>	pag.30
6.2.1 <i>Selezione dei mutanti trasformati ed analisi PCR</i>	pag.30
6.2.2 <i>Southern blot</i>	pag.31
7. DISCUSSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	pag.34
8. BIBLIOGRAFIA	pag.36

1. RIASSUNTO

Durante il processo infettivo, i funghi fitopatogeni secernono nelle cellule della pianta ospite vari enzimi degradativi tra i quali le xilanasi, che sono state dimostrate essere importanti fattori di virulenza in specifiche interazioni pianta-patogeno (Brito et al., 2006; Nguyen et al., 2011). *Fusarium graminearum* è un fungo patogeno responsabile di una malattia nota come *Fusariosi della spiga (FHB)* che colpisce importanti specie cerealicole quali il frumento. Durante l'infezione di piante di frumento, il fungo è stato dimostrato causare una forte degradazione enzimatica dello xilano di parete (Wanyoike et al. 2002). Recenti studi di trascrittomica e di proteomica (Güldener et al., 2006; Hatsh et al., 2006; Paper et al., 2007) hanno inoltre evidenziato il possibile coinvolgimento di alcune endo- β -1,4-xilanasi di *F. graminearum* nelle prime fasi del processo infettivo della pianta ospite frumento. Sebbene questi studi sostengano la potenziale importanza delle xilanasi di *F. graminearum*, il loro ruolo resta ancora da chiarire.

Dati di analisi di espressione ottenuti nel laboratorio dove ho svolto la tesi hanno inoltre dimostrato che il gene Fgsg_11487, codificante una delle endo- β -1,4-xilanasi di *F. graminearum*, è uno dei più espressi in spighe di frumento infette. Il lavoro svolto nella presente tesi prevede l'ottenimento di mutanti knock-out del gene Fgsg_11487 per poterne in futuro verificare il ruolo nel processo infettivo.

Dai risultati ottenuti si è concluso che solamente in un mutante (SPLIT 13) è avvenuta la corretta trasformazione, con la distruzione del gene Fgsg_11487 e l'integrazione del gene marker di selezione (resistenza all'antibiotico igromicina) mediante un evento di ricombinazione omologa sito-specifica. L'ottenimento di un mutante knock-out vitale privato del gene d'interesse ha confermato che questa xilanasi non ha nessun ruolo essenziale nel regolare le funzioni vitali del fungo *F. graminearum*.

Il mutante verrà in futuro caratterizzato mediante prove d'infezione su spighe di frumento per poter verificare l'effetto del knock-out di questa xilanasi sulla virulenza del mutante.

2. ABSTRACT

During the infection process, phytopathogenic fungi secrete into the host plant cells various degrading enzymes such as xylanases, which have been shown to be important virulence factors in specific plant-pathogen interactions (Brito et al., 2006, Nguyen et al. , 2011). *Fusarium graminearum* is a pathogenic fungus responsible for a disease known as *Fusarium head blight* (*FHB*), which affects important cereal species such as wheat. During wheat infection, the fungus has been shown to cause a strong enzymatic degradation of cell wall v (Wanyoike et al. 2002). Recent studies of transcriptomics and proteomics (Guldener et al. 2006; Hatsh et al., 2006, Paper et al., 2007) have also highlighted the possible involvement of some endo- β -1,4-xylanases of *F. graminearum* in the early stages of wheat infection. Although these studies support the potential importance of the *F. graminearum* xylanases, their role is still unclear.

Expression analysis data obtained in the laboratory where I did my thesis also showed that the gene Fgsg_11487, encoding one of the *F. graminearum* endo- β -1,4-xylanases, is one of the most expressed in infected wheat spikelets. The aim of this thesis is the obtaining of a knock-out mutant of the gene Fgsg_11487 in order to test in the future the role of this xylanase in the infection process.

From the results obtained it was concluded that the correct transformation occurred only in a mutant (SPLIT 13), with the disruption of the Fgsg_11487 gene and the integration of the marker gene (resistance to the antibiotic hygromycin) through site-specific homologous recombination. The obtaining of a vital knock-out mutant lacking the gene of interest has confirmed that this xylanase has no essential role in regulating vital functions of the fungus *F. graminearum*. The mutant will be characterized by wheat spikes infection experiments in order to assess the effect of the knock-out of this xylanase on the virulence of the mutant.

3. INTRODUZIONE

Durante il processo infettivo, la maggior parte dei funghi fitopatogeni produce numerosi enzimi extracellulari che favoriscono la penetrazione e la colonizzazione dei tessuti dell'ospite; questi enzimi sono in grado di degradare le componenti della parete vegetale (*Cell Wall Degrading Enzymes*, CWDE) liberando al contempo elementi nutritivi utilizzabili dai funghi come fonte di energia per la propria crescita e riproduzione. L'importanza dei CWDE è dimostrata dal fatto che alcuni di questi sono importanti fattori di virulenza in specifiche interazioni pianta-patogeno (Kikot et al., 2009). Tra questi enzimi secreti extracellularmente dai funghi si distinguono, sulla base della componente di parete che degradano:

- pectinasi, enzimi idrolitici che rompono i legami della pectina, uno dei principali componenti della parete cellulare e della lamella mediana;
- cellulasi, enzimi che idrolizzano la cellulosa;
- emicellulasi, enzimi in grado di idrolizzare i legami glicosidici delle diverse strutture polisaccaridiche che compongono le emicellulose, quali arabinano (arabinasi), glucano (glucanasi) e xilano (xilanasi).

In particolare le xilanasi sono enzimi idrolitici che catalizzano l'idrolisi dei legami β -1,4-xilosidici dello xilano, il maggior polisaccaride strutturale della parete delle cellule vegetali con cellulosa e lignina, e il secondo polisaccaride più abbondante in natura. Lo xilano costituisce la principale componente emicellulosica della parete secondaria dei tessuti lignificati delle piante e della parete cellulare primaria delle specie monocotiledoni (Cooper et al., 1998).

La struttura dello xilano varia tra le diverse specie vegetali, e l'associazione con gruppi acetili, arabino-furanosili, galattosili e molti altri, aumenta la varietà e ne modifica le proprietà (Collins et al., 2005). La completa idrolisi di questo polisaccaride eterogeneo e complesso è ottenuta grazie alla presenza di un'ampia varietà di xilanasi codificate da numerosi geni identificati nel genoma di fitopatogeni batterici e fungini delle piante (Wong et al., 1988; Walton 1994). È stato inoltre dimostrato che molti di questi geni vengono tradotti e i rispettivi enzimi sono secreti nelle cellule vegetali infette, dove degradano la parete cellulare (Biely, 1985).

Wong et al. 1988 e Biely et al., 1997 hanno classificato le xilanasi in due gruppi principali, sulla base delle loro proprietà fisico-chimiche, riguardanti soprattutto la presenza di svariati domini supplementari, oltre a quelli catalitici: quelle con un alto peso molecolare e quelle con basso peso molecolare. Una recente classificazione ha inserito le endo- β -1,4-xilanasi nelle famiglie 10 e 11 delle glicosil-idrolasi (>30 kDa e <30 kDa) (Collins et al., 2005). Molti studi sono stati dedicati a determinare il ruolo biologico delle endo-xilanasi nella patogenicità fungina. Ad esempio la

distruzione del gene Xyn11A del fungo fitopatogeno *Botrytis cinerea*, codificante per una endo- β -1,4-xilanasi, ha consentito di dimostrare che Xyn11A è un importante fattore di virulenza del fungo durante l'infezione di acini d'uva e foglie di pomodoro. La rimozione del gene determinava infatti una riduzione della virulenza del patogeno (Brito et al., 2006). In particolare è stato in seguito dimostrato che il gene Xyn11A contribuisce al processo infettivo mediante un'attività necrotizzante dei tessuti della pianta piuttosto che degradando lo xilano (Noda et al., 2010). Infatti è stato osservato che infiltrando in foglie di pomodoro e tabacco una xilanasi Xyn11A mutante ottenuta modificando due residui di acido glutammico conservati nel sito attivo, dopo 2-5 giorni l'area trattata necrotizzava per la produzione di perossido di idrogeno come risposta ipersensibile scatenata dalla pianta e quindi incapace di idrolizzare lo xilano (Noda et al., 2010).

Una difficoltà tecnica nel determinare il ruolo biologico dei CWDE e delle endo-xilanasi in particolare utilizzando il knock-out genico, è dovuta tuttavia alla ridondanza funzionale tra i membri della famiglia genica. La presenza di numerosi geni codificanti endo-xilanasi nel genoma di alcuni funghi fitopatogeni può, nei mutanti con un singolo gene inattivato, determinare una compensazione dell'attività xilanasica da parte di alcuni geni. Per ovviare a questo limite, si sono utilizzati RNAi per innescare il silenziamento di geni endoxilanasici durante l'infezione; questo ha permesso di esaminare i loro ruoli nella patogenicità ad esempio del fungo *Magnaporthe oryzae*. L'analisi RT-PCR quantitativa ha rivelato che il livello di trascrizione di tutti i geni xilanasici espressi, era significativamente ridotto nei mutanti, probabilmente a causa della loro "down-regulation". Anche se i mutanti non hanno completamente perso la loro patogenicità per le piante ospite, si osservava comunque un certo grado di riduzione della patogenicità, associato ai livelli di silenziamento dell'attività xilanasica (Nguyen et al., 2011).

Il *Fusarium graminearum* è un fungo patogeno filamentoso appartenente alla classe degli ascomiceti che causa ingenti danni all'agricoltura attaccando principalmente frumento, mais, orzo e altri cereali in aree temperate o semitropicali. In particolare il fungo è responsabile di una grave malattia nota come *Fusariosi della spiga* (*Fusarium head blight, FHB*). Le infezioni di *F. graminearum* causano inoltre seri problemi alla salute, perché durante il processo infettivo il fungo produceva livelli elevati di micotossine tricoteceni (ad esempio il deossinivalenolo), che contaminano la granella causando gravi disfunzioni intestinali negli animali monogastrici non-ruminanti. I tricoteceni possono essere tossici anche per l'uomo, con manifestazioni di nausea, vomito, anoressia e convulsioni (McMullen et al., 1997). L'infezione inizia durante lo sviluppo precoce dei fiori con la produzione di ascospore o conidi del fungo, che penetra attraverso l'ovario e si diffonde poi nella spighetta, sviluppando in breve tempo una rete di ife che colonizzano il rachide per poi raggiungere le altre spighette di cui causa lo scolorimento e l'avvizzimento di fusto e radici

(Paper et al., 2007). La prevenzione della *FHB* è resa difficoltosa dalla capacità del fungo di sopravvivere all'inverno grazie alle spore che ricadono sulla superficie del suolo dopo il raccolto e all'ambiente umido che viene a crearsi dopo la mietitura del cereale (McMullen et al., 1997). La malattia, quando raggiunge livelli epidemici, ha la capacità di ridurre drasticamente il raccolto in poche settimane, determinando una ingente perdita di guadagno a causa della scarsa quantità e qualità delle sementi e alla sterilità dei fiori (Goswami et al., 2004).

La *FHB* è un problema mondiale che ha interessato milioni di ettari di coltivazioni cerealicole in Canada, Europa, Asia, Australia e Sud America, causando difficoltà per la commercializzazione, esportazione e lavorazione della granella infetta. Dal 1998 al 2000 in particolare negli Stati Uniti le perdite economiche dovute a questo fungo fitopatogeno sono stimate intorno ai 2,7 miliardi di dollari (Nganje et al., 2002).

Studi citologici hanno permesso di determinare l'importanza dei CWDE durante le prime fasi di infezione delle spighe di frumento da parte del *Fusarium graminearum*, mediante l'uso di tecniche di marcatura "enzime-gold" (Wanyoike et al., 2002). Il fungo secerne attività pectinasica, xilanasica e cellulastica ed è stato osservato ad esempio che sezioni di tessuto infettato con *F. graminearum* subiscono alterazioni notevoli della densità di xilano rispetto alle sezioni dei corrispondenti tessuti sani.

Per quanto riguarda in particolare le endo- β -1,4-xilanasi del fungo *Fusarium graminearum*, il sequenziamento completo del genoma del fungo ha permesso di identificare 10 geni putativamente codificanti endo- β -1,4-xilanasi, le cui sequenze sono disponibili in rete (<http://mips.helmholtzmuenden.de/genre/proj/fusarium>; <http://www.broad.mit.edu>).

Da un recente studio di trascrittomico (Hatsch et al., 2006), è stato possibile dimostrare che tutti i 10 geni codificanti endo-xilanasi sono attivamente trascritti quando il fungo è coltivato su un mezzo di coltura contenente xilano. Questi geni sono espressi a livelli bassi in presenza di colture contenenti una fonte di carbonio come il glucosio, che agisce da repressore, mentre la parete cellulare della pianta sembra rappresentare il substrato ideale. L'ampia varietà di polimeri che costituiscono la parete cellulare induce, infatti, la trascrizione di quasi tutti i geni codificanti enzimi degradativi dello xilano (Hatsch et al., 2006). In un altro lavoro di trascrittomico, sono state identificate 6 endo- β -1,4-xilanasi trascritte nei tessuti di frumento dopo 72-96 ore dall'inoculo (Güldener et al., 2006). Inoltre mediante un approccio di proteomica comparativa sono state individuate almeno cinque endo- β -1,4-xilanasi di *F. graminearum*, secrete nelle spighe di frumento infette dai tre ai dieci giorni dopo l'inoculo (Paper et al., 2007).

4. SCOPO DELLA TESI

Dei vari enzimi degradativi secreti da funghi fitopatogeni, le xilanasi sono stati dimostrati essere importanti fattori di virulenza in specifiche interazioni pianta-patogeno (Brito et al., 2006; Nguyen et al., 2011). Recentemente, Wanyoike et al. (2002) hanno osservato che il fungo *Fusarium graminearum* sembra causare durante l'infezione di piante di frumento una forte degradazione enzimatica dello xilano di parete. Sebbene questi studi sostengano la potenziale importanza delle xilanasi, quale sia il ruolo svolto dalle xilanasi di *F. graminearum* nel processo infettivo resta ancora da chiarire.

Il lavoro svolto nella presente tesi prevede l'ottenimento di mutanti knock-out del gene Fgsg_11487 (Xyl) (MIPS database) di *F. graminearum* codificante per una delle endo-xilanasi più espresse in presenza di parete cellulare di luppolo e durante l'infezione di spighe di frumento. Una volta realizzato il costrutto con il gene marker Hyg, si è proceduti con la trasformazione e in seguito la selezione dei mutanti knock-out.

Il knock-out è una tecnica largamente usata nella moderna ricerca scientifica, che sfrutta la distruzione genica per caratterizzare il ruolo di un gene attraverso il confronto dei mutanti knock-out con gli organismi *wild-type*. La distruzione del gene si basa su un evento di ricombinazione, per cui un marker di selezione può sostituirsi ad un gene di interesse. È possibile quindi ottenere la delezione genica tramite un costrutto costituito da un marker di selezione affiancato da regioni identiche a quelle fiancheggianti il gene da eliminare. Il knock-out del gene bersaglio avviene quindi mediante ricombinazione omologa: due eventi di crossing over tra le regioni fiancheggianti sono necessari nel caso si utilizzi un costrutto completo e tre eventi nel caso si utilizzino due "mezzi" costrutti, mediante tecnica SPLIT-marker, che contengono rispettivamente solo una regione fiancheggiante e un frammento incompleto del gene di resistenza all'antibiotico. In questo caso due crossing-over avvengono tra le regioni fiancheggianti il gene, mentre il terzo si verifica tra i due frammenti incompleti del marker di selezione che presentano 1000 paia di basi in comune.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Preparazione del costrutto

5.1.1 Estrazione del DNA genomico di *F. graminearum*

Per estrarre il DNA genomico di *F. graminearum*, si è lavorato inizialmente sul micelio coltivato in terreno liquido CM (1% glucosio, 0,05% estratto di lievito, 0,5% YNE [“Yeast Nitrogen Base w/o amino acids”, Difco Laboratories, Detroit, USA]) e conservato a -20 °C. Il micelio è stato omogeneizzato con l’uso di mortaio e pestello, in presenza di azoto liquido ed in seguito si sono aggiunti 2 mL di 2X CTAB (2% CTAB, 100 mM TrisHCl pH 8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% PVP) + β-mercaptoetanololo (rapporto 100:1) ogni 200-400 mg di micelio. La miscela è stata vortexata ed incubata a 65 °C per 1 h nel bagno termostato, per favorire un’efficace lisi cellulare. Successivamente, sono stati aggiunti alla miscela 2 mL di cloroformio + alcol isoamilico (24:1), che è stata quindi incubata in ghiaccio in agitazione per 1-2 ore. Dopo aver centrifugato a 9.000 rpm per 15 min, si è ottenuta una fase liquida, il surnatante in cui è risospeso il DNA deproteinizzato, che è stato recuperato, mischiato con 1 volume di isopropanolo e sodio acetato 3 M (1/10 di volume) ed incubato a -20 °C per favorire la precipitazione del DNA. Il campione è stato nuovamente centrifugato a 9.000 rpm per 10 min e sul fondo della falcon si è depositato il pellet, che è stato lavato con etanolo 70% e risospeso in 300 µL di acqua sterile. Per poter verificare infine la presenza del DNA genomico estratto, il campione è stato sottoposto a corsa elettroforetica su gel agarosio 1% contenente 0,6 µg/mL di etidio di bromuro.

5.1.2 Amplificazione delle due regioni fiancheggianti il gene *Fgsg_11487* mediante PCR

Per l’amplificazione delle due regioni fiancheggianti il gene *Fgsg_11487* (nominate UP e DOWN) di lunghezza pari a 800 bp circa ciascuna (ottenute dal sito “*Fusarium* comparative database” BROADMIT), è stato utilizzato il DNA genomico estratto come stampo e le due coppie di primer specifici UP e DOWN (tab. 5.1). In particolare i primer UP_{prev} e DOWN_{for} posseggono “code” omologhe alle estremità del gene marker per la resistenza all’antibiotico igromicina (Hyg) e servono da innesco anche per la successiva reazione di “fusion” PCR.

L’amplificazione è stata effettuata mediante PCR in un volume totale di 50 µL contenente:

- 1 µL del primer for (100 ng/µL)
- 1 µL del primer rev (100ng/ µL)

- 1 µL di DNA genomico stampo (diluito 1:10)
- 25 µL di REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂ (Promega Corporation, Madison, USA) contenente 3 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP mix 0,06 unità/µL di Taq DNA polimerasi
- 22 µL H₂O sterile

Tabella 5.1: Primer per l'amplificazione delle sequenze UP e DOWN del gene Fgsg_11487	
11487 UPfor	GATCAAGTTGCCGATTCCTC
11487 UPrev	agatgccgaccgaacaagagctgtccccACAAGGCCAACAAAAGCAAG
11487 DOWNfor	tcaatgctacatcaccacctcgtccccGGGTCTTGAGGTTGTTGGAA
11487 DOWNrev	ACACCCGACAACACAGTTCA

I 35 cicli di amplificazione sono avvenuti alle seguenti condizioni:

- 95 °C : 30 sec (fusion)
- 53/ 55 °C : 30 sec (annealing UP/ DOWN)
- 72 °C : 1 min (elongation)

La successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% ha evidenziato una quantità finale di amplificato simile tra le due regioni UP e DOWN. Le bande visualizzate su gel sono state poi tagliate con un bisturi sterile, trasferite in due eppendorf differenti e mischiate con egual volume di Membrane Binding Solution; sono state poi immerse in un bagnetto termostato a 65 °C , vortexate e centrifugate per sciogliere bene il gel. È stato applicato poi il “Protocollo di purificazione”, utilizzando il kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA). Ciascun campione è stato incubato in una colonnina di silice per 1 min a temperatura ambiente. La colonnina è stata poi centrifugata per 1 min a 13.200 rpm, permettendo al DNA di legare i silicati presenti sulla membrana della colonnina, e dopo aver rimosso il liquido, lavata con 700 µL di Washing Buffer contenente etanolo. Dopo aver nuovamente centrifugato la colonnina a 13.200 rpm per 1 min, il processo è stato ripetuto con 500 µL dello stesso tampone per 5 min e con un ciclo di centrifuga a vuoto per 2-3 min, per eliminare tutto il tampone. La colonnina con il filtro è stata trasferita in un'eppendorf da 1,5 mL e il DNA è stato infine eluito con 40 µL di Nuclease-free Water, dopo centrifugazione a 13.200 rpm per 1 min.

Il DNA purificato è stato controllato su gel di agarosio 1% per poter stimare la quantità di amplificato presente nei campioni: 13,3 ng/µL per la regione UP e 16,6 ng/µL per la regione DOWN.

5.1.3 PCR “fusion”

Dopo aver amplificato le sequenze fiancheggianti con le due coppie di primer specifici, gli amplificati sono stati fusi, attraverso PCR “fusion”, al gene marker Hyg (igromicina B fosfotransferasi, enzima per la resistenza all’antibiotico igromicina) sfruttando le “code” delle regioni stesse che fungono da primer omologhi.

La PCR “fusion” è stata realizzata in un volume totale di 50 µL contenenti:

- 7,5 µL di UP (13,3 ng/µL)
- 6 µL di DOWN (16,6 ng/µL)
- 3 µL di Hyg (300 ng/ µL)
- 25 µL di REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂
- 8,5 µL di H₂O sterile

L’amplificazione è stata ottenuta ripetendo per 20 cicli le seguenti condizioni:

- 94 °C: 1 min (fusion)
- 60 °C: 2 min (annealing)
- 72 °C: 4 min (elongation)

5.1.4 PCR “nested” e purificazione del costrutto

Per aumentare notevolmente la sensibilità e specificità dell’amplificazione, il prodotto della PCR “fusion” è stato sottoposto ad una PCR “nested” (Fig. 5.1). Il prodotto “fusion” è stato amplificato con i primer NESTfor e NESTrev che non si associano alle estremità del costrutto, ma a regioni leggermente più interne, per ottenere l’intero costrutto (FULL). Gli altri due costrutti (SPLIT) invece, sono stati ottenuti utilizzando alternativamente uno dei primer NESTfor o NESTrev con un altro primer interno specifico per l’igromicina, ottenendo così i due costrutti SPLIT1 e SPLIT2 (tab. 5.2). I primer interni specifici per l’igromicina sono stati disegnati in modo che SPLIT1 e SPLIT2 possedessero una regione sovrapponibile di 1000 bp.

11487 NESTfor	CACAGCCTCGAGAGTGATTG
11487 NESTrev	CAGGCGGGGTAAAACCTAAT
Hyg-PRBfor	GTTGGCGACCTCGTATTGG
Hyg-PRBrev	CTTACCACCTGCTCATCACCT

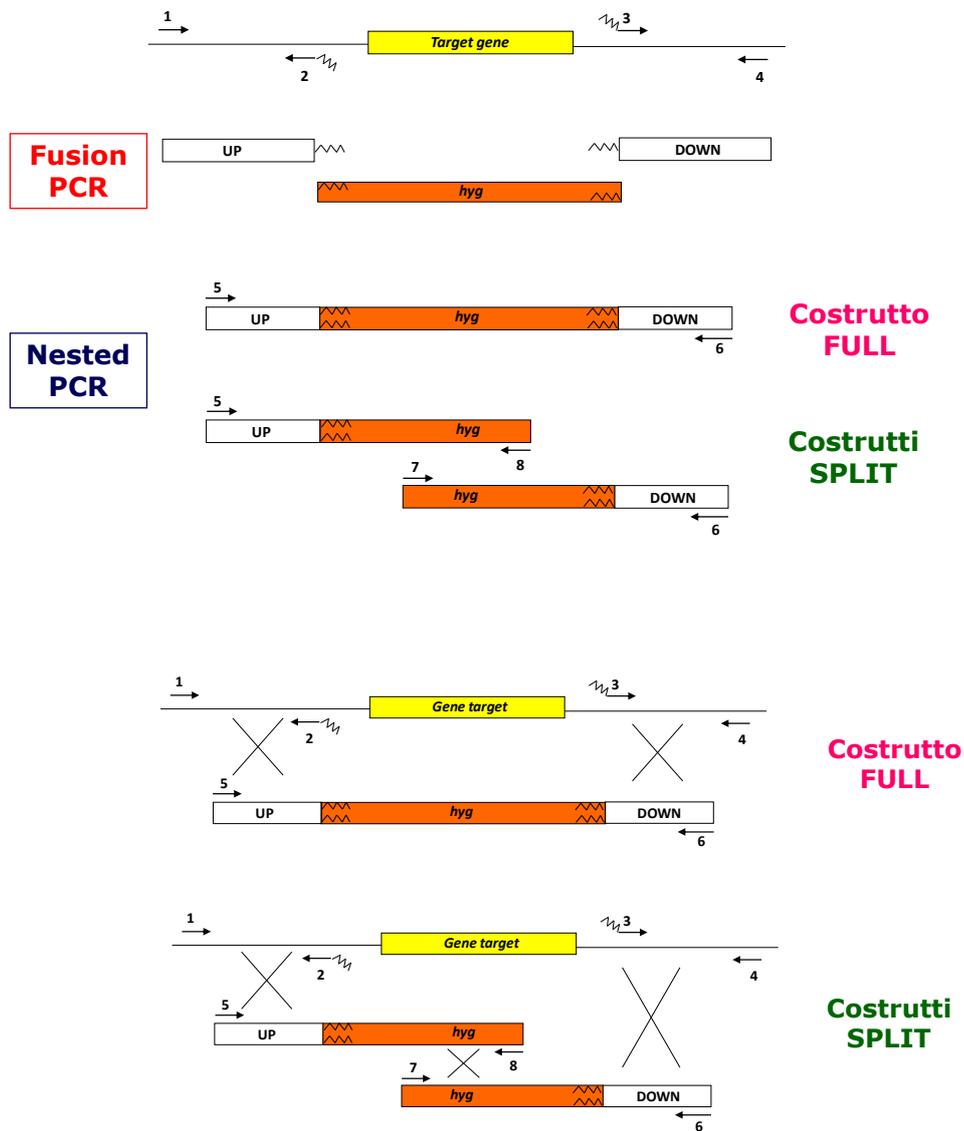


Fig. 5.1: I costrutti sono stati utilizzati per trasformare i protoplasti di *F. graminearum*. La distruzione del gene target è stata ottenuta per ricombinazione omologa.

La PCR è stata eseguita in un volume di 50 μ L contenenti:

- 1 μ L di primer for
- 1 μ L di primer rev
- 1,5 μ L di prodotto "fusion"
- 25 μ L di REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with $MgCl_2$

- 21,5 μL di H_2O sterile

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

- 95 °C: 30 sec
- 57-53 °C: 30 sec
- 72 °C: 3 min (SPLIT-marker), 4 min (FULL)

Sono state provate temperature di annealing diverse per ogni costrutto, ma è stato osservato su gel agarosio 1%, che sia i costrutti SPLIT che il costrutto FULL hanno una resa migliore di amplificato alla temperatura di appaiamento di 53 °C .

Gli amplificati sono stati poi tagliati da gel e purificati con il kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) come già descritto nel paragrafo 5.1.2.

In seguito una successiva corsa elettroforetica ha consentito di stimare una concentrazione di circa 7,5 ng/ μL per il costrutto SPLIT1 (amplificato con primer NESTfor e HYGrev), 9 ng/ μL per il costrutto SPLIT2 (amplificato con primer HYGfor e NESTrev) e infine 7 ng/ μL per il costrutto FULL (amplificato con primer NESTfor e NESTrev).

5.2 Clonaggio dei costrutti nel vettore plasmidico e trasformazione del fungo

5.2.1 Integrazione dei costrutti tramite reazione di ligasi

Il clonaggio degli inserti FULL, SPLIT1 e SPLIT2 in vettori plasmidici pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, USA) è facilitato dalla presenza, in ogni costrutto, di estremità coesive di adenine create dalla Taq polimerasi durante la PCR. Ogni vettore pGEM-T Easy presenta:

- un gene marker di resistenza all'ampicillina;
- un sito multiplo di clonaggio all'interno del gene lacZ;
- siti unici di restrizione;
- gene lacZ codificante per una β -galattosidasi;
- una timina ad ogni estremità 3' del vettore linearizzato per consentire l'integrazione dell'inserto.

L'inserimento dei costrutti nel vettore già linearizzato è mediato dall'enzima DNA ligasi (Promega Corporation, Madison, USA), mantenendo un rapporto 3:1 inserto-vettore.

Il volume totale delle reazioni è stato di 15 μ L per i costrutti SPLIT e 20 μ L per il costrutto FULL.

Ogni miscela conteneva:

- 0,5 μ L di pGEM-T Easy (stock 50 ng/ μ L)
- 8 μ L (7,5 ng/ μ L) di inserto SPLIT1/ 12 μ L (9 ng/ μ L) di inserto SPLIT2/ 16,5 μ L (7 ng/ μ L) di inserto FULL
- 1 μ L di DNA ligasi
- 1,5 μ L di Ligation Buffer 10X (SPLIT-marker)/ 2 μ L di Ligation Buffer 10X (FULL)
- H₂O sterile a volume

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

5.2.2 Trasformazione batterica di *E.coli* e piastramento

Le cellule competenti di *Escherichia coli* (DH5 α), conservate a -80 °C, sono state trasformate con la miscela di ligasi seguendo il procedimento dello shock termico (42 °C per 50 sec), per favorire l'integrazione del plasmide nelle cellule. Le cellule sono poi state coltivate in 900 μ L di LB-Broth liquido (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA), privo di antibiotico per sviluppare resistenza all'ampicillina, per 1,5 h a 37 °C e in agitazione a 150 rpm. In seguito 100 μ L di sospensione batterica sono stati distribuiti su piastre Petri di LB-Broth solido (LB Broth liquido + 1,5% Bacto-Agar [Difco Laboratories, Detroit, USA]), contenenti 100 μ L/mL di ampicillina e 40 μ L di X-Gal (stock 25 ng/ μ L), precedentemente piastrati. Le cellule piastrate sono quindi state incubate

overnight a 37 °C, permettendo solo a quelle contenenti il vettore pGEM-T Easy di formare una colonia bianca o blu; queste ultime però verranno escluse perché prive di inserto. In particolare, il costrutto tende ad inserirsi nel vettore interrompendo il gene lacZ che codifica per la β-galattosidasi, enzima che utilizzando il substrato X-Gal produce una colorazione blu delle colonie.

Osservando le piastre è stato quindi possibile selezionare numerose colonie per ogni costrutto, e successivamente testarle con PCR, per verificare l'avvenuta trasformazione. Sono stati però utilizzati i primer pUC/M13 forward e reverse, che si legano alle estremità del sito di policlونaggio (tab. 5.3).

Tabella 5.3: Primer per verificare la trasformazione batterica	
pUC/M13 forward	GTAAAACGACGGCCAG
pUC/M13 reverse	CAGGAAACAG CTATGAC

Le miscele di PCR di 20 µL, contenevano:

- 1 µL di primer pUC/M13 forward
- 1 µL di primer pUC/M13 reverse
- 10 µL di REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂
- stampo fornito da un prelievo di cellule batteriche delle singole colonie bianche
- 10 µL di H₂O sterile

Mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% è stato possibile individuare alcune colonie trasformate, perché visibile per ognuna una banda dell'altezza dell'inserto integrato nel vettore. Per ogni campione è stata poi selezionata una colonia da incubare in LB-Broth liquido overnight a 37 °C in agitazione, per favorirne la crescita.

5.2.3 Estrazione DNA plasmidico e digestione con enzimi di restrizione

Dopo una crescita di circa 16 ore, dalle colonie trasformate con il costrutto SPLIT1, SPLIT2 e FULL è stato estratto il DNA plasmidico con il kit Nucleobond PC 100 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany).

Ogni campione è stato centrifugato a 4.800 rpm per 15min a 4 °C, poi il pellet delle cellule batteriche è stato risospeso in 4 mL di Buffer S1 + Rnase A e vortexato. In successione alla sospensione, sono stati aggiunti 4 mL di Buffer S2 e, dopo incubazione per 2-3 min alla temperatura di 18-25 °C 4 mL di Buffer S3, con successiva incubazione in ghiaccio per 5 min. La sospensione è

stata poi centrifugata a 8.000 rpm per 30 min e filtrata con un “Nucleobond Folder Filter” per eliminare i residui di precipitato rimasti. Dopo equilibratura con Buffer N₂ le 3 miscele sono state caricate in colonnine Nucleobond AX100. Dopo il legame del DNA plasmidico alla colonnina, si è proceduto con successivi lavaggi delle colonnine con 10 mL di Buffer N₃. I DNA plasmidici sono stati quindi eluiti con 5 mL di Buffer N₅. Ad ogni campione sono stati infine aggiunti 3,5 mL di isopropanolo per precipitare il DNA. Dopo centrifugazione a 9000 rpm per 30 min, il pellet è stato lavato con 2 mL di EtOH 70%. Dopo ulteriore centrifugazione a 8500 rpm per 15 min, il pellet ottenuto da ogni campione è stato asciugato e risospeso in 500 µL di H₂O deionizzata.

I campioni di DNA plasmidico purificati sono stati digeriti con enzimi di restrizione specifici (*ApaI* e *SalI*), al fine di isolare il costrutto di partenza dal vettore pGEM-T Easy. La reazione è avvenuta in un volume totale di 700 µL in cui sono presenti rispettivamente:

- 100 µL di DNA plasmidico SPLIT1/ 200 µL di DNA plasmidico SPLIT2 / 250 µL di DNA plasmidico FULL
- 5 µL di *ApaI* (10 U/µL)
- 5 µL di *SalI* (10 U/µL)
- 70 µL di Buffer A 10X
- 70 µL di Buffer D 10X
- 7 µL di BSA 100X
- H₂O fino a volume finale di 700 µL

La miscela è stata incubata a 37 °C overnight.

Una corsa elettroforetica su gel agarosio 1 % ha permesso di controllare la digestione e quantificare più precisamente i campioni digeriti: 70 ng/µL del costrutto FULL, 23 ng/µL e 46 ng/µL rispettivamente dei costrutti SPLIT1 e SPLIT2. Le miscele di digestione sono state precipitate mediante aggiunta di un egual volume di isopropanolo. I campioni sono stati successivamente centrifugati per 15 min a 13.200 rpm e i pellet ottenuti sono stati risospesi in 40 µL di H₂O sterile per l'inserto FULL e 20 µL di H₂O sterile rispettivamente per i costrutti SPLIT1 e SPLIT2. Per la successiva trasformazione sono stati utilizzati per tutti i campioni solo 20 µL di DNA plasmidico digerito.

5.2.4 Protoplasting del fungo *Fusarium graminearum*

I protoplasti di *F. graminearum*, cellule prive di parete cellulare, sono stati ottenuti dal micelio cresciuto da conidi inizialmente conservati a -80 °C. 1x10⁶ conidi del fungo sono stati inoculati in 100 mL di terreno di coltura YEPD (0,3 g estratto di lievito, 10,0 g Bacto peptone, 20,0 g D-

glucosio) e incubati overnight a temperatura ambiente e in agitazione a 150 rpm, per favorire la crescita del micelio. Il micelio è stato filtrato e circa 1 g è stato lavato con acqua sterile, asciugato e poi aggiunto a 20 mL di una soluzione enzimatica (2,5 g driselasi, 0,5 g enzima di lisi, 1,2 M KCl) per degradare la parete cellulare fungina. La sospensione è stata incubata per circa 2 h a 30 °C e in agitazione a 80 rpm. I protoplasti ottenuti sono stati filtrati con filtri da 100 µm e 40 µm e centrifugati per 10 min a 2.200 rpm a temperatura ambiente, quindi lavati con 10 mL di STC-Co (20% saccarosio, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM CaCl₂). I protoplasti sono stati centrifugati nuovamente e risospesi in STC-Co ad una concentrazione di 1x10⁸/mL.

5.2.5 Trasformazione dei protoplasti

A 200 µL di protoplasti (2x10⁷ protoplasti) sono stati aggiunti 40 µL di DNA plasmidico digerito con *ApaI* e *Sall* e la miscela, dopo essere stata mescolata dolcemente, è stata incubata per 20 min a temperatura ambiente.

La soluzione è stata incubata per ulteriori 20 min in presenza di 1 mL di PEG-Co (40% PEG4000, 60% STC) dopo aver mescolato per favorire l'entrata dei costrutti FULL e SPLIT nelle cellule. Si sono poi aggiunti 5 mL di TB3 (200 g saccarosio, 3 g estratto di lievito, 3 g caseina idrolizzata acida) e la miscela è stata incubata per 30 min in agitazione a 100 rpm a temperatura ambiente. Infine ad ogni sospensione sono stati aggiunti 10 mL di TB3 agarizzato (TB3 con affinità di 1,5% Agar) privo di antibiotico, e si è proceduto con la piastratura, per garantire la rigenerazione delle pareti cellulari. Dopo crescita overnight, le cellule con parete cellulare riformata sono state ricoperte con un egual volume di TB3-Agar, contenente una doppia quantità di antibiotico igromicina B (400 µg/mL), per selezionare i mutanti con integrato il costrutto.

5.2.6 Selezione e piastramento dei mutanti

È stato preparato 1 litro di terreno "CM_{complete} medium" liquido, costituito da:

- 10 mL di soluzione A (100 g/L Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O) sterilfiltrata
- 10 mL di soluzione B (20 g/L KH₂PO₄; 25 g/L MgSO₄ x 7 H₂O; 15 g/L NaCl, pH 5.3) sterilfiltrata
- 900 mL di H₂O autoclavata
- 10 mL di "Yeast-Casein-Mix" (1 g estratto di lievito, 0,5 g caseina idrolizzata acida, 0,5 g caseina idrolizzata enzimaticamente) autoclavato
- 10 g di glucosio in 50 mL di H₂O sterilfiltrata

- 1 mL di MNS (60 mg/L H_3BO_3 ; 320 mg/L $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$; 13 mg/L KI; 60 mg/L $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 51 mg/L $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$; 5,48 g/L $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 932 mg/L $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; infine aggiunti 2 mL cloroformio per sterilizzare soluzione)

I mutanti FULL e SPLIT, cresciuti nelle piastre di TB3 agarizzato con antibiotico, sono stati trasferiti in piastine contenenti terreno di coltura “ $\text{CM}_{\text{complete}}$ solido” ($\text{CM}_{\text{complete}}$ medium + 1,5% Agar granulato) addizionato con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dell’antibiotico igromicina B. Le piastre sono state mantenute a 28 °C overnight per controllare l’effettiva resistenza dei mutanti.

5.3 Analisi dei mutanti

5.3.1 Estrazione DNA genomico ed analisi PCR

Per l'analisi dei mutanti ottenuti, si è proceduto con un protocollo rapido di estrazione del DNA genomico dai campioni selezionati e dal fungo *F. graminearum wild-type*. Si preleva un po' di micelio dai mutanti cresciuti nelle piastrine e lo si mescola in 50 µL di TE (Tris-EDTA). Le eppendorf vengono poste per 50 sec in microonde alla massima potenza e dopo aver ripetuto il trattamento e aver lasciato 5 min a temperatura ambiente, le miscele sono state centrifugate per 5 min a 13.200 rpm e utilizzate come stampo in una serie di PCR, in cui sono stati utilizzati primer specifici per il gene Hyg e per il gene Fgsg_11487 codificante la xilanasi da distruggere (tab.5.4).

La reazione avviene in un volume finale di 20 µL contenenti:

- 0,5 µL (10 ng/ µL) di primer forward
- 0,5 µL (10 ng/ µL) di primer reverse
- 1 µL di DNA genomico
- 10 µL di REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (SIGMA)
- 8 µL di H₂O sterile

Il ciclo di PCR utilizzato, ripetuto per 35 volte, è il seguente:

- 95 °C: 30 sec (fusion)
- 55-51 °C: 30 sec (annealing rispettivamente dei primer dell'igromicina e della xilanasi)
- 72 °C: 1 min (elongation)

Hyg- PRBfor	AAAGTGCCGATAAACATAAC
Hyg-PRBrev	AGAGTGATGCTTTGAGAGAG
Fgsg_11487 XYLfor	CATCAAGGACAAGACCCAG
Fgsg_11487 XYLrev	CACCAGTGGAAGCCATCT

5.3.2 Preparazione delle sonde e marcatura mediante PCR

Per evidenziare i frammenti d'interesse si procede con la marcatura non radioattiva delle due sonde specifiche per il gene della xilanasi Xyl e per il gene dell'igromicina Hyg mediante PCR; per la prima sonda è stato utilizzato come stampo il DNA genomico del *F. graminearum*, mentre per la

seconda il plasmide contenente il gene per la resistenza all'igromicina, aggiungendo i rispettivi primer (tab. 5.4). La marcatura è stata ottenuta mediante l'incorporazione negli amplificati di un uracile (dUTP) coniugato con la digossigenina (lipide steroideo). La miscela di reazione di 100 μ L totali è così composta:

- 1 μ L (100 ng/ μ L) di DNA stampo
- 58 μ L H₂O sterile
- 10 μ L di tampone 10X
- 6 μ L MgCl₂ (stock 25 mM)
- 5 μ L dATP, 5 μ L dGTP, 5 μ L dCTP (stock 1 mM)
- 4 μ L dTTP (stock 1 mM)
- 1 μ L dUTP-digossigenina (stock 1 mM)
- 2 μ L di ciascun primer (50 ng)
- 1 μ L Taq-polimerasi (5 U)

L'amplificazione è avvenuta ripetendo per 35 volte il seguente ciclo:

- 94 °C: 1 min (fusion)
- 55-51 °C: 1 min (annealing rispettivamente delle sonde Hyg e Xyl)
- 72 °C: 2 min (elongation)

Le sonde sono state poi purificate in colonnina con il kit Wizard SV GEL and PCR Clean UP System (PROMEGA), quantificate 25 ng/ μ L su gel agarosio 1%, e conservate a -20 °C fino al momento dell'uso.

5.3.3 Estrazione DNA genomico e digestione

Il protocollo utilizzato per l'estrazione di DNA genomico dai campioni SPLIT 3,4,13 e dal fungo *WT* consente di ottenere elevate quantità di DNA.

Circa 200-400 mg di micelio di ogni campione sono pestellati in azoto liquido e mischiati con 2 mL di CTAB caldo (2% CTAB, 100 mM TrisHCl pH 8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% PVP) + 20 μ L di β -mercaptoetanol ed incubati per 1 h a 65 °C. Dopo l'aggiunta di 2 mL di cloroformio-alcool isoamilico 24:1, la miscela è stata mescolata ed incubata nuovamente per 1 h in ghiaccio in agitazione a 160 rpm; in seguito si è centrifugato a 9.000 rpm per 10-15 min. Recuperata la fase acquosa, il DNA è stato precipitato con 2 mL di isopropanolo freddo e 200 μ L di Sodio acetato 3 M pH=5,2, incubando a -20 °C per 30 min e infine centrifugando a 9.000 rpm per 10 min. Lasciato asciugare il pellet in pompa-vuoto per 15-20 min, il DNA è stato risospeso in 500 μ L di TE (Tris-EDTA) con l'aggiunta di 5 μ L di RnaseA (2 mg/ml) e successiva incubazione a 37 °C per 20-30

min. In seguito è stata fatta una corsa elettroforetica per verificare l'avvenuta estrazione del DNA dei campioni.

Dopo l'estrazione del DNA genomico, i tre campioni SPLIT 3,4,13 e anche il *WT* di controllo sono stati digeriti con l'enzima di restrizione *HindIII*, selezionato in quanto taglia nel frammento DOWN e all'esterno del costrutto. Il volume totale della reazione di digestione è di 600 µL e contiene:

- 150 µL/ 200 µL di DNA genomico (rispettivamente dei campioni SPLIT 3,4 e SPLIT 13,WT)
- 60 µL di buffer 10X
- 5 µL di *HindIII* (10 U/ µL)
- 6 µL di BSA (100X)
- H₂O sterile fino a 600 µL

Dopo incubazione overnight a 37 °C, l'avvenuta digestione è stata verificata mediante corsa elettroforetica su gel agarosio 1%.

5.3.4 Elettroforesi su gel agarosio e Southern blot

È stato preparato un gel grande di agarosio (70 mL di TAE + 0,7 g di agarosio) senza EtBr in 500 mL di tampone TAE (0,8 mM Tris, 0,4 mM Acido acetico, 0,04 mM EDTA pH=8). Prima di caricare, i DNA digeriti sono stati incubati a 65 °C per 5 min e poi è stata fatta una corsa elettroforetica di 4 h a voltaggio di 80 V. Il gel è stato in seguito immerso prima in una soluzione contenente etidio-bromuro, per poter osservare il DNA digerito. Il gel è stato poi posto in agitazione in una soluzione denaturante (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) per 45 min, per permettere la denaturazione del DNA e successivamente per altri 45 min in una soluzione neutralizzante (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 1 M pH=8), che riporta il pH a valori simili a quello del tampone di riferimento. Il DNA è stato quindi trasferito per capillarità dal gel ad una membrana di nylon carica positivamente, con cui forma legami idrogeno, ponti salini e interazioni idrofobiche, utilizzando come tampone di trasferimento SSC 10X (175,3 g/L NaCl, 88,2 g/L sodio citrato pH=7). Dopo 12-16 ore, la membrana è stata lavata per 10 min in SSC 2X, quindi asciugata all'aria. Il DNA è stato fissato sulla membrana tramite cottura in stufa a 80 °C.

Il filtro è stato poi incubato per 3 h a 65 °C in 20 mL di soluzione di pre-ibridazione (N-lauril sarcosina 0,1%; SDS 0,02%; SSC 5X; blocking reagent 0,5 %) per evitare appaiamenti aspecifici DNA-sonda. Quindi si è proceduto con l'ibridazione delle sonde Hyg e Xyl che, dopo essere state denaturate a 100 °C per 5 min e raffreddate in ghiaccio per 1 min, sono state diluite nella soluzione di pre-ibridazione (circa 5 ng/cm² di filtro). Il filtro è stato poi incubato con le sonde overnight in

agitazione a 65 °C, per consentirne l'ibridazione specifica. In seguito sono stati eseguiti lavaggi ad alta stringenza: 2 lavaggi da 25 mL con una soluzione contenente SSC 2X e SDS 0,1 % a 65 °C per 15 min e altri 2 lavaggi a 65 °C per 30 min con una soluzione contenente SSC 0,1X e SDS 0,1%.

È stato poi effettuato il rilevamento immunologico, mediante il quale i frammenti di DNA ibridati producono una reazione chemioluminescente che impressiona un lastra autoradiografica. In particolare il filtro è prima stato lavato con 50 mL di un tampone di lavaggio (Maleic Acid Buffer 1X [acido maleico 50 mM, NaCl 75 mM]; Tween 20, 0,3% [v/v]) per 5 min a temperatura ambiente, poi incubato in agitazione per 1 h in 50 mL di una "Blocking solution" (Maleic Acid Buffer 1X, blocking reagent 1 % [w/v]). Alla soluzione è stato poi aggiunto l'anticorpo anti-digossigenina coniugato con la fosfatasi alcalina, diluito 1:15000 (=3,3 µL). Dopo l'incubazione in agitazione per 30 min a temperatura ambiente sono stati effettuati due lavaggi di 15 min con tampone di lavaggio per rimuovere l'anticorpo non legato. Il filtro infine, è stato incubato per altri 2-5 min in tampone di rilevamento (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM) in cui è stato diluito 1:100 il CDP-Star, substrato della reazione chemioluminescente che interagisce con l'enzima. Il filtro è stato quindi avvolto in una pellicola di cellophane trasparente ed incubato al buio per circa 10 min, rimuovendo prima eventuali bolle d'aria. La membrana è stata successivamente esposta per circa 2 h, sempre al buio, ad una lastra autoradiografica, la quale è stata poi sviluppata mediante rapidi lavaggi di un paio di minuti in una soluzione di sviluppo (Kodak (SIGMA) Aldrich) e poi in una soluzione di fissaggio (Kodak (SIGMA) Aldrich).

6. RISULTATI

6.1 Preparazione del costrutto per il knock-out genico

6.1.1 Amplificazione delle regioni fiancheggianti UP e DOWN

Per ottenere le regioni a monte (UP) e a valle (DOWN) del gene d'interesse si sono utilizzate le rispettive coppie di primer Fgsg_11487 UP e Fgsg_11487 DOWN, effettuando l'amplificazione con temperature di annealing di 53 °C per il prodotto UP e di 55 °C per il prodotto DOWN (tab. 5.1). L'amplificazione delle due sequenze fiancheggianti il gene Fgsg_11487 Xyl è necessario per ottenere un costrutto in grado di distruggere il gene. I primer Fgsg_11487 UPprev e Fgsg_11487 DOWNfor contengono inoltre una regione di 29 basi non appaiabili, sfruttate poi per la fusione del gene Hyg.

Grazie ad una successiva corsa elettroforetica su gel agarosio 1 %, è stato possibile rilevare la presenza dei due amplificati, lunghi entrambi circa 800 bp (Fig. 6.1).

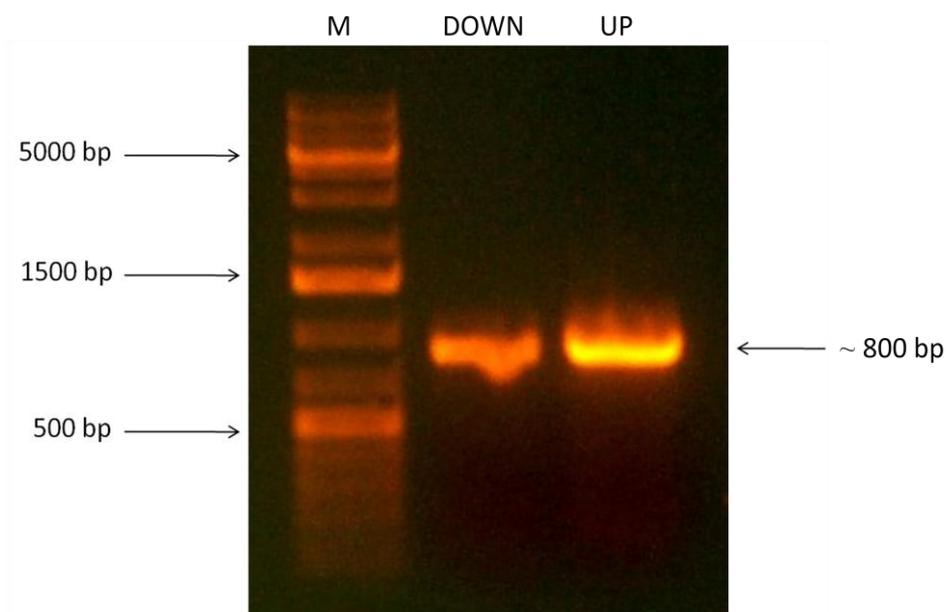


Fig. 6.1: Corsa elettroforetica su gel agarosio 1 % dei prodotti PCR UP e DOWN; sono stati caricati in ciascun pozzetto 10 μ L di prodotto di amplificazione. Corsia M = marker 1 kb DNA ladder, Fermentas.

6.1.2 PCR “fusion”

Mediante PCR “fusion” gli amplificati sono stati fusi con il gene di resistenza all’igromicina (Hyg), necessario per poter selezionare i mutanti in una fase successiva. Per l’amplificazione si sono sfruttate le code di 29 basi delle due regioni UP e DOWN.

Per aumentare notevolmente la sensibilità e specificità della PCR è stata eseguita poi un’amplificazione di tipo “nested”.

6.1.3 PCR “nested”

Il prodotto della PCR “fusion” è stato amplificato sia con primer Fgsg_11487 NESTfor e Fgsg_11487 NESTrev per ottenere l’intero costrutto (FULL), sia utilizzando alternativamente uno dei primer Fgsg_11487 NESTfor o Fgsg_11487 NESTrev con un primer interno specifico per il gene Hyg, per ottenere i due costrutti split-marker (SPLIT1 e SPLIT2) (tab. 5.2). I primer interni specifici per il gene Hyg sono stati disegnati in modo che i costrutti SPLIT1 e SPLIT2 possedessero una regione sovrapponibile di circa 1000 bp. In questa tecnica i primer non si associano alle estremità del prodotto di fusione, ma a regioni poco più interne per aumentare la specificità degli appaiamenti.

La temperatura di annealing migliore per le reazioni di amplificazione è risultata essere di 53 °C. La successiva corsa elettroforetica su gel agarosio 1 % ha permesso di verificare la presenza degli amplificati SPLIT1 e SPLIT2, rispettivamente di 2235 bp e 2234 bp (Fig. 6.2 e Fig. 6.3), e di un amplificato FULL di 3446 bp (Fig. 6.4). In questo ultimo caso su gel è visibile anche una banda di prodotto aspecifico dovuto ad integrazioni multiple. Il prodotto di amplificazione delle dimensioni attese è stato quindi estratto da gel e purificato per il clonaggio.

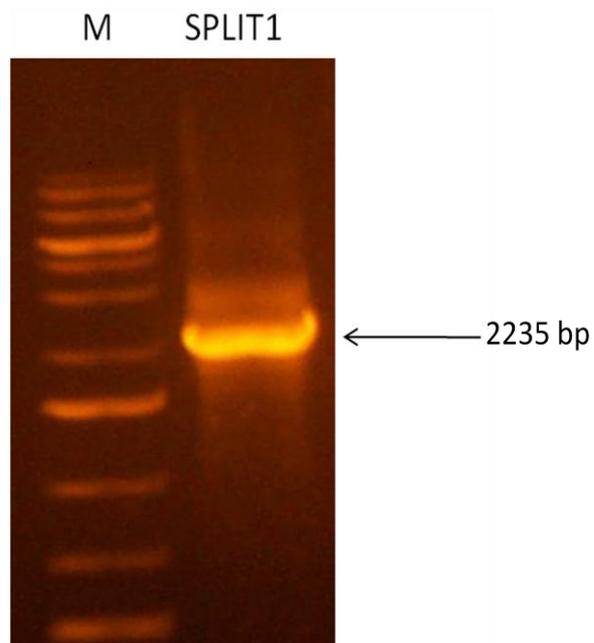


Fig. 6.2: Corsa elettroforetica su gel agarosio 1% del prodotto di amplificazione “*nested*” SPLIT1, ottenuto impiegando i primer Fgsg_11487 NESTfor e Hyg-PRBrev. Nel pozzetto sono stati caricati 50 μ L di reazione PCR per la successiva excisione della banda da gel. Corsia M = marker 1 kb DNA ladder, Fermentas.

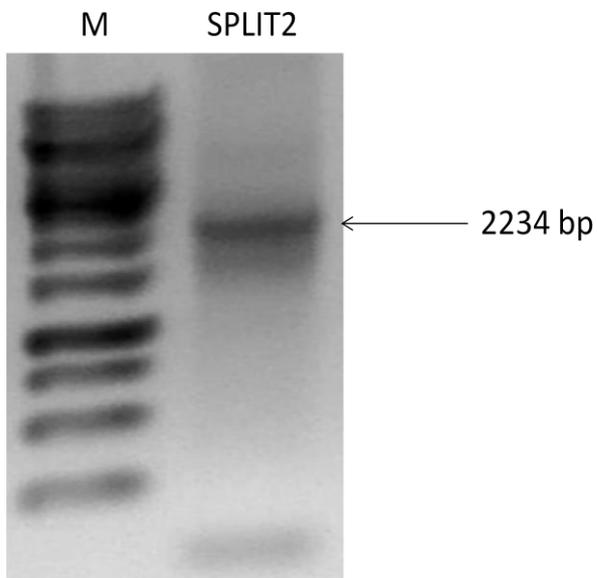


Fig. 6.3: Corsa elettroforetica su gel agarosio 1% del prodotto di amplificazione “*nested*” SPLIT2, ottenuto impiegando i primer Hyg-PRBfor e Fgsg_11487 NESTrev. Nel pozzetto sono stati caricati 28 μ L di reazione PCR per la successiva excisione della banda da gel. Corsia M = marker 1 kb DNA ladder, Fermentas.

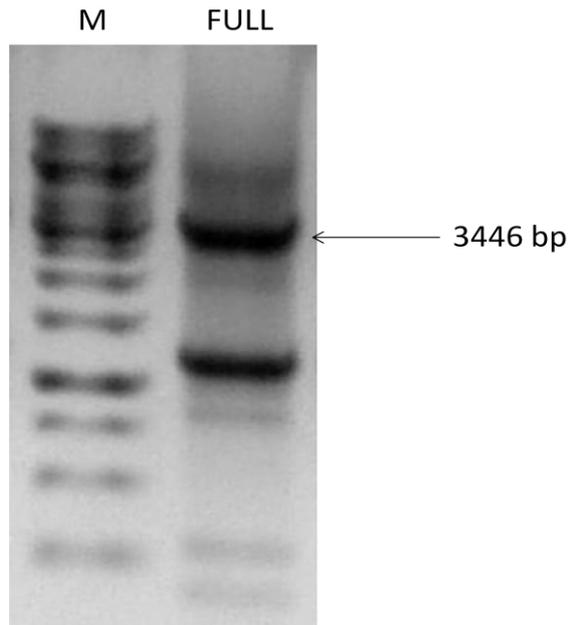


Fig. 6.4: Corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% del prodotto di amplificazione “*nested*” FULL, ottenuto con i primer Fgsg_11487 NESTfor e Fgsg_11487 NESTrev. Nel pozzetto sono stati caricati tutti i 50 μ L di reazione PCR per la successiva excisione della banda da gel. Corsia M = marker 1 kb DNA ladder, Fermentas.

6.1.4 Clonaggio dei costrutti nel vettore pGEM-T Easy

Gli amplificati FULL, SPLIT1 e SPLIT2 sono stati clonati nel vettore plasmidico pGEM-T Easy attraverso una reazione di ligasi con rapporto 3:1 inserto-vettore, per essere poi moltiplicati in cellule batteriche competenti. Ogni amplificato possiede estremità coesive di adenine create dalla Taq polimerasi durante la PCR, sfruttate per l’integrazione degli inserti nel vettore linearizzato che presenta ad ogni estremità 3’ una timina (Fig. 6.5).

Il vettore pGEM-T Easy presenta inoltre un gene marker, che conferisce alla cellula resistenza all’antibiotico ampicillina e un gene lacZ codificante per una β -galattosidasi. In presenza del substrato X-GAL, la β -galattosidasi idrolizza il substrato determinando la formazione di colonie blu. Se avviene l’evento di integrazione, si ha l’interruzione di lacZ; di conseguenza i mutanti trasformati non sono in grado di svolgere l’attività enzimatica dipendente da questo gene e si formano colonie bianche (Fig. 6.5).

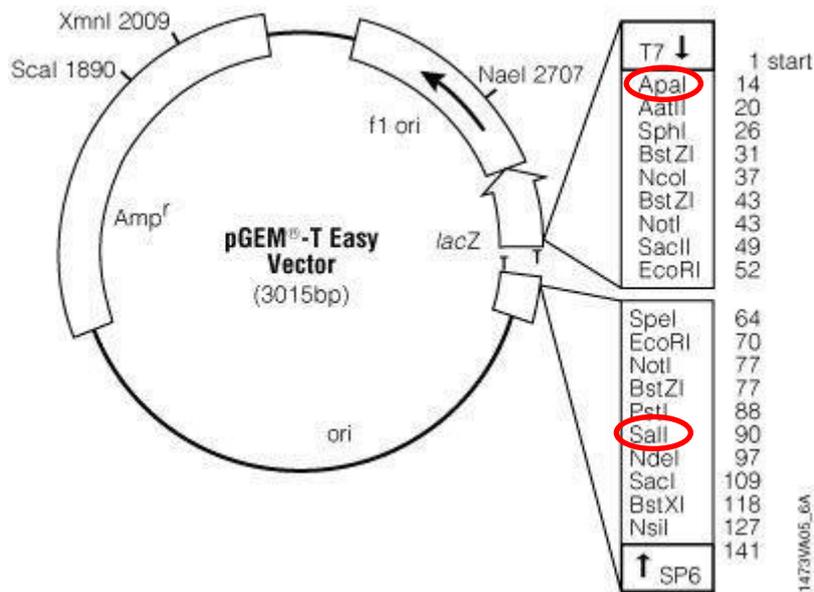


Fig. 6.5: Rappresentazione del vettore plasmidico pGEM-T Easy in cui sono indicati i siti di restrizione impiegati successivamente per excidere il costrutto (*Apal* e *SalI*).

Le colonie bianche trasformate selezionate sono state poi testate con PCR per verificare la presenza dei tre inserti utilizzando i primer pUC/ M13 forward e reverse, che si legano alle estremità del sito di policlonaggio del plasmide (tab. 5.3) (Fig. 6.6; 6.7; 6.8). Tre colonie (SPLIT1 n° 4, SPLIT2 n° 7 e FULL n° 18) sono state selezionate e allevate in 50 mL di terreno di coltura LB liquido, in agitazione a 37 °C overnight, dalle quali successivamente è stato estratto il DNA plasmidico.

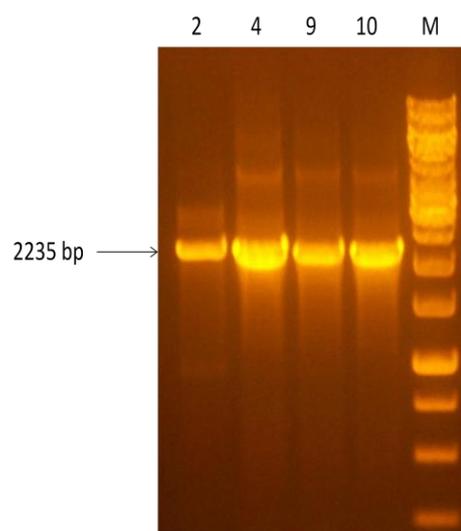


Fig. 6.6: Colonie batteriche trasformate con il costrutto SPLIT1. Corsia M = marker 1 kb DNA ladder, Fermentas; corsie 2-4-9-10 = pozzetti caricati con 10 µl di prodotto di amplificazione delle colonie batteriche analizzate.

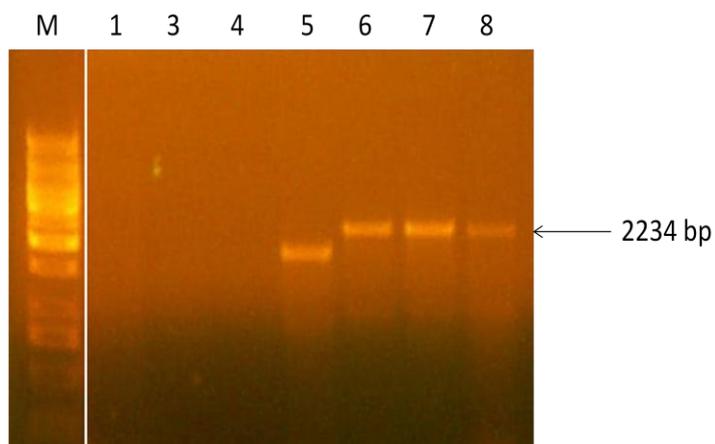


Fig. 6.7: Colonie batteriche trasformate con il costrutto SPLIT2. Corsia M = marker 1 kb DNA ladder, Fermentas; corsie 1-3-4-5-6-7-8 = pozzetti caricati con 10 μ l di prodotto di amplificazione delle colonie batteriche analizzate. Solo le colonie n° 6-7-8 hanno integrato il costrutto.

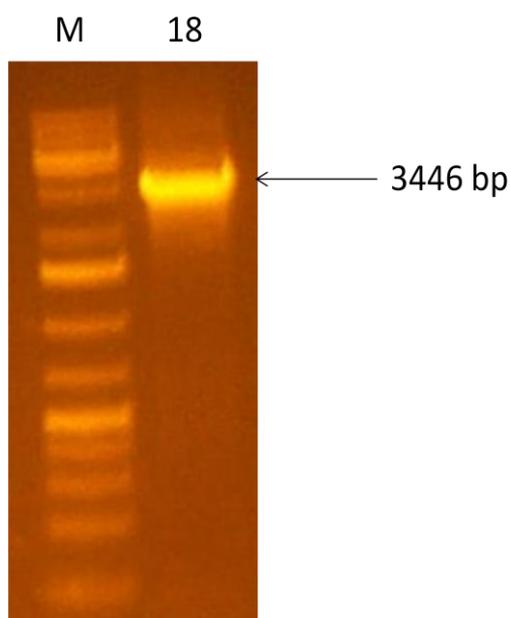


Fig. 6.8: Colonia batterica trasformata con il costrutto FULL. Corsia M = marker 1 kb DNA ladder, Fermentas; corsia 18 = pozzetto caricato con 10 μ l di prodotto di amplificazione della colonia batterica testata.

6.1.5 Digestione ed isolamento del costrutto

Poiché l'evento di integrazione nel genoma del fungo è facilitato se il costrutto è linearizzato, per excidere ogni inserto dal proprio vettore pGEM-T Easy, sono stati usati gli enzimi di restrizione *ApaI* e *SalI* che andavano a tagliare a monte e a valle del frammento di interesse. La successiva

corsa elettroforetica su gel di agarosio 1 % ha consentito di confermare la correttezza dei costrutti ottenuti (dato non mostrato).

6.2 Trasformazione del fungo *F. graminearum*

6.2.1 Selezione dei mutanti trasformati ed analisi PCR

La trasformazione dei protoplasti ottenuti mediante digestione delle pareti cellulari del micelio del fungo con i costrutti contenenti il gene marker Hyg, ha permesso di ottenere 20 colonie resistenti all'igromicina con il costrutto FULL e 15 colonie resistenti con i costrutti SPLIT1 e SPLIT2, successivamente trasferiti in altre piastrine di terreno di coltura solido, per verificare l'effettiva resistenza di questi isolati fungini.

Per valutare l'effettiva distruzione del gene Fgsg_11487, il DNA genomico estratto dai vari mutanti è stato utilizzato come stampo in una serie di reazioni PCR in cui sono stati usati primer specifici per il gene Fgsg_11487 e per il gene Hyg. Dopo una corsa elettroforetica su gel agarosio 1 %, solo nei funghi trasformati con il costrutto SPLIT (SPLIT 3-4-13) si è osservata l'assenza di amplificato del gene Xyl e il prodotto di amplificazione del gene Hyg (Fig. 6.9). Nel controllo negativo (DNA genomico del fungo *WT*) si è evidenziata solo la banda corrispondente al gene Xyl (dato non mostrato).

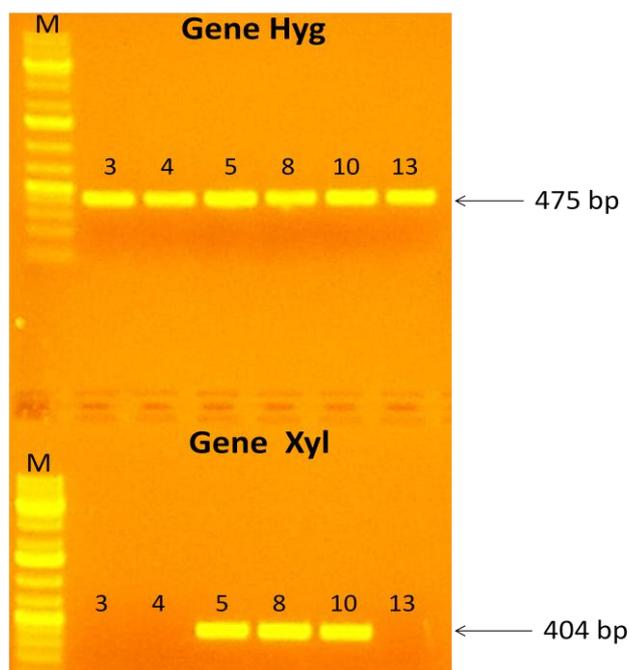


Fig. 6.9: Risultato dei test PCR sulle colonie fungine monoconidiali trasformate. Solo nelle colonie SPLIT n° 3-4-13 si osserva l'assenza del gene Fgsg_11487 codificante la xilanasasi, mentre il gene marker di selezione Hyg è presente in tutte le colonie testate. Corsia M = marker 1 kb DNA ladder, Fermentas; corsie 3-4-5-8-10-13 = pozzetti caricati con 10 µl di prodotto di amplificazione delle colonie batteriche analizzate.

6.2.2 Southern blot

Le tre colonie SPLIT 3-4-13 selezionate dalle analisi precedenti sono state sottoposte all'analisi Southern blot. Questa tecnica di ibridazione in situ permette di verificare la precisa sostituzione del gene Xyl con il gene marker Hyg e di individuare possibili integrazioni multiple del costrutto.

Per l'analisi Southern è stato selezionato l'enzima di restrizione *Hind* III, utilizzato per digerire i DNA genomici precedentemente estratti; ci attendiamo che il gene Xyl ibridi dando una banda di circa 3200 bp, mentre il gene Hyg se integrato correttamente al posto del gene Xyl, dovrebbe trovarsi in una banda di circa 3700 bp.

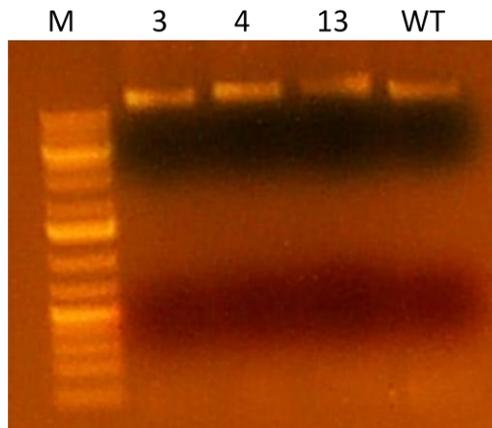


Fig 6.10: Estrazione DNA genomico dai ceppi di *Fusarium graminearum* wild-type e mutanti. Corsia M = marker 1 kb DNA ladder, Fermentas; corsie 3-4-13-WT = pozzetti caricati con 10 μ l di prodotto di digestione delle colonie batteriche analizzate.

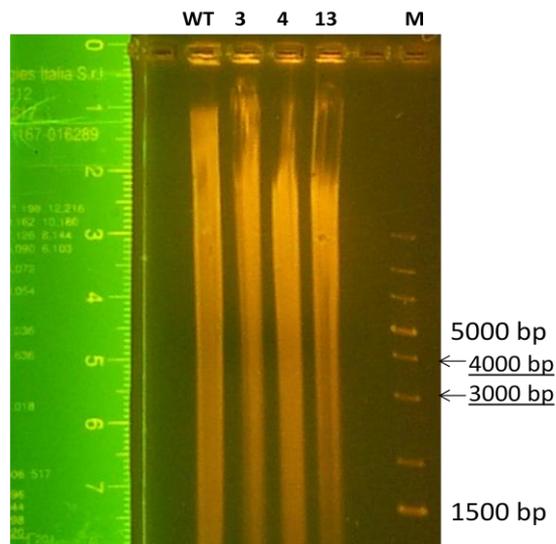


Fig 6.11: Digestione del DNA genomico con l'enzima di restrizione *Hind* III. Corsia M = marker 1 kb DNA ladder, Fermentas; corsie 3-4-13-WT = pozzetti caricati con 20 μ l di DNA genomico digerito.

Il filtro è stato ibridato con due sonde marcate differenti: una sonda specifica per il gene Fgsg_11487 e una sonda specifica per il gene marker di selezione Hyg. Il risultato ottenuto ha permesso di dimostrare che solo uno dei mutanti analizzati (SPLIT 13) era trasformato correttamente perché non presentava il segnale di ibridazione corrispondente alla xilanasi, mentre gli altri campioni erano falsi positivi (Fig. 6.12 A).

Il mutante *SPLIT* 13 presentava inoltre il segnale di ibridazione corrispondente al gene *Hyg* integrato correttamente al posto della xilanasi (banda a 3710 bp), tuttavia erano visibili altre bande che rappresentano integrazioni ectopiche multiple del costrutto (Fig. 6.12 B).

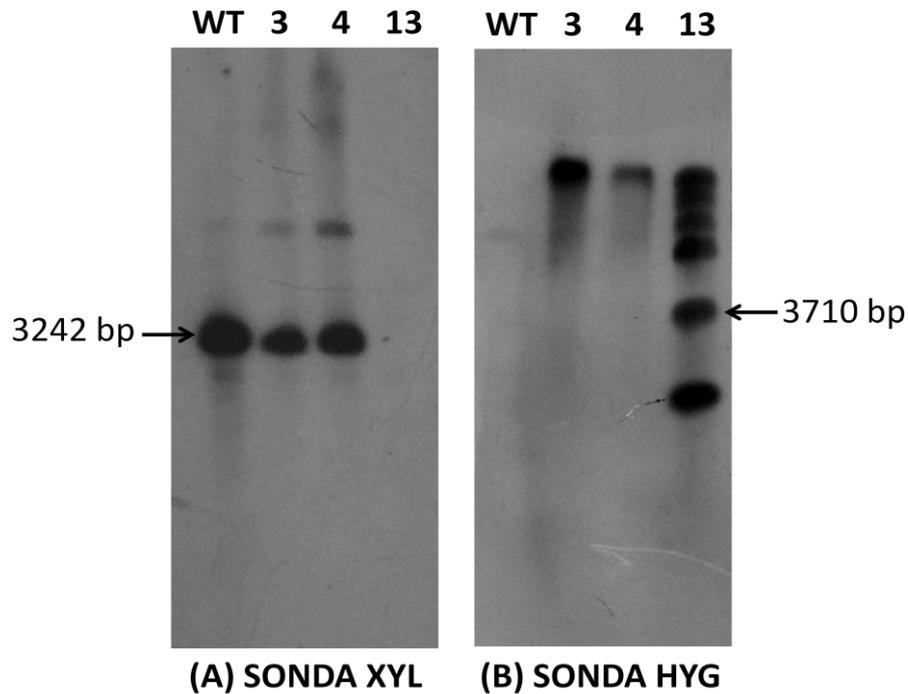


Fig. 6.12: (A) Ibridazione con la sonda marcata Xyl dei ceppi *WT* e *SPLIT* 3-4-13. Solamente nel mutante *SPLIT* 13 è avvenuta la corretta trasformazione, in quanto il gene codificante la xilanasi è assente. (B) Ibridazione con la sonda marcata *Hyg* dei ceppi *WT* e *SPLIT* 3-4-13. Tutti e tre i mutanti hanno integrato il gene marker *Hyg*, tuttavia solo il mutante *SPLIT* 13 presenta un'integrazione corretta al posto della xilanasi (banda a 3710 bp); nel mutante sono inoltre presenti altre integrazioni ectopiche del costrutto.

7. DISCUSSIONE E PROSPETTIVE FUTURE

Recenti studi di trascrittomico e di proteomica (Güldener et al., 2006; Hatsh et al., 2006; Paper et al., 2007) hanno permesso di identificare endo- β -1,4-xilanasi di *Fusarium graminearum* putativamente coinvolte nelle prime fasi del processo infettivo della pianta ospite frumento. In particolare alcuni geni codificanti endo-xilanasi sono attivamente trascritti nelle spighe di frumento dopo 72-96 ore dall'infezione (Güldener et al., 2006), e le corrispondenti proteine sono state rilevate nei tessuti colonizzati dal fungo già dopo 3 giorni (Paper et al., 2007). Dati di analisi di espressione ottenuti nel laboratorio dove ho svolto la tesi hanno permesso di verificare che uno dei geni identificati nei lavori precedentemente citati, il gene Fgsg_11487, è uno dei più espressi nelle spighe di frumento infette. Il lavoro svolto in questa tesi si è quindi concentrato sul knock-out sito-specifico di questo gene target per poterne in futuro verificare il ruolo nel processo infettivo. I risultati ottenuti hanno permesso di constatare che solamente in un mutante (SPLIT 13) è avvenuta la corretta trasformazione, con la distruzione del gene Fgsg_11487 mediante evento di ricombinazione omologa, e l'integrazione del gene marker di selezione. L'ottenimento di un mutante vitale con delezione del gene d'interesse ha confermato che queste xilanasi non hanno nessun ruolo essenziale nel regolare le funzioni vitali del fungo *F. graminearum*, altrimenti avrebbe causato la morte delle cellule fungine.

Da analisi Southern, risulta inoltre che il mutante SPLIT 13, oltre al segnale di ibridazione corrispondente al gene Hyg integrato al posto del gene Xyl, mostra altre bande di ibridazione che rappresentano integrazioni ectopiche del costrutto. Questi eventi multipli possono dipendere dall'integrazione di un solo frammento (SPLIT1 o SPLIT2) che non determinerebbe di per se una resistenza all'antibiotico, o da un errato appaiamento di entrambi i frammenti in un punto diverso del genoma.

Per verificare l'effetto del knock-out di queste xilanasi sulla virulenza del mutante potranno essere svolte in futuro prove d'infezione sul frumento. Infettando ad esempio spighe di frumento con spore prodotte dal mutante, si potrebbe verificare se vi è una riduzione della colonizzazione delle spighe nel mutante rispetto al *wild-type*. Questo significherebbe che questa endo- β -1,4-xilanasi è un fattore di virulenza di *F. graminearum*. Se non dovesse manifestarsi riduzione di virulenza del mutante nei confronti dell'ospite, si potrebbe concludere invece che la distruzione del singolo gene non influenza particolarmente il processo infettivo. Tuttavia nel genoma di *F. graminearum* sono presenti numerosi geni codificanti putative endo-xilanasi che potrebbero contribuire a degradare lo xilano e determinare una compensazione dell'attività xilanasi in mutanti con un singolo gene inattivato, garantendo la completa patogenicità del fungo. Anche nel fungo *Magnaporthe oryzae*,

patogeno di frumento, orzo e riso, sono stati individuati geni endoxilanasici potenzialmente coinvolti nel processo infettivo che sono stati sottoposti, in alternativa alla distruzione genica, ad un “silenziamiento genico post-trascrizionale” (Nguyen et al., 2011). L’evento di regolazione “knock-down” (KD) di un gruppo di geni codificanti xilanasasi è innescato da un RNAi artificiale che contiene una serie di regioni aventi sequenza perfettamente complementare ad ogni mRNA bersaglio. Un’analisi RT-PCR quantitativa ha rivelato in seguito che i livelli di trascritto di tutti i geni endoxilanasici espressi in *M. oryzae* sono risultati significativamente ridotti nei mutanti KD. Sebbene il fungo non abbia completamente perso la sua patogenicità, si è osservata una riduzione di virulenza dei mutanti durante l’infezione di foglie di frumento e orzo correlata ai livelli di knock-down dei trascritti e alla ridotta attività enzimatica misurata nei mutanti KD (Nguyen et al., 2011). Si può quindi concludere che il silenziamiento genico può essere una valida alternativa alla distruzione genica quando nel genoma sono presenti più geni codificanti la stessa attività enzimatica, e per questo motivo la strategia di RNAi potrebbe essere impiegata anche nel fungo *F. graminearum* per ridurre l’attività enzimatica di tutti i geni endoxilanasici e verificarne il contributo nel processo infettivo.

8. BIBLIOGRAFIA

- ❖ Biely P., (1985). Microbial xylanotic systems. Trends Biotechnol **3**: 286-290.
- ❖ Brito N., Espino J.J. and Gonzalez C., (2006). The endo-b-1,4-xylanase Xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*. Mol Plant Microbe Interact **19**: 25-32.
- ❖ Collins T., Gerday C. and Feller G., (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiology Reviews **29**: 3-23.
- ❖ Cooper R.M., Rankin B., (1978). Cell wall-degrading enzymes of vascular wilt fungi. II. Properties and modes of action of polysaccharidases of *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Physiol Plant Pathol **13**:101-134.
- ❖ Goswami R.S. and Kistler H.C., (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Mol. Plant Pathol **5(6)**: 515-525.
- ❖ Güldener U., Seong K.Y., Boddu J., Cho S., Trail F., Xu J.-R., Adam G., Mewes H.-W., Muehlbauer G.J. and Kistler H.C., (2006). Development of a *Fusarium graminearum* Affimetrix Gene Chip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta. Fungal Genetics and Biology **43**: 316-325.
- ❖ Hatsch D., Phalip V., Petkovski E. and Jeltsch J. M., (2006). *Fusarium graminearum* on plant cell wall: no fewer than 30 xylanases genes transcribed. Biochemical and Biophysical Research Communications **345**: 959-966.
- ❖ Kikot G.E., Hours R.A. and Alconada T.M., (2009). Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*. Journal of Basic Microbiology **49**: 231-241.
- ❖ McMullen M., Jones R. and Gallenberg D., (1997). Scab of Wheat and Barley: a re-emerging disease of devastating impact. Plant Disease **81**: 1340-1348.
- ❖ Nganje W.E., Bangsund D.A., Leistritz F.L., Wilson W.W. and Tiapo N.M., (2002). Estimating the economic impact of a crop disease: the case of *Fusarium head blight* in U.S. wheat and barley. National *Fusarium Head Blight* Forum Proceedings. East Lansing: Michigan State University pp. 275-281.
- ❖ Nguyen Q.B., Kadotani N., Kasahara S., Tosa Y., Mayama S., and Nakayashiki H., (2008). Systemic functional analysis of calcium signaling proteins in the genome of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a highthroughput RNA silencing system. Mol Microbiol **68**: 1348-1365.

- ❖ Noda J., Brito N. and González C., (2010). The *Botrytis cinerea* xylanase Xyn11A contributes to virulence with its necrotizing activity, not with its catalytic activity. *BMC Plant Biology* **10**: 38.
- ❖ Paper J.M., Scott-Craig J.S., Adhikari N.D., Cuomo C.A. and Walton J.D., (2007). Comparative proteomics of extracellular proteins *in vitro* and *in planta* from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Proteomics* **7**: 3171-3183.
- ❖ Walton J.D., (1994). Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol* **104**: 1113-1118.
- ❖ Wanyoike M.W., 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.
- ❖ Wong K.K.Y., Tan L.U.L. and Saddler J.N., (1988). Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews* **52**: 305-317.