



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE

Dipartimento di TERRITORIO E SISTEMI AGRO-FORESTALI

Corso di laurea in Biotecnologie Agrarie

Analisi di espressione di geni codificanti laccasi del fungo patogeno
Botrytis cinerea durante l'infezione di acini d'uva

Relatore

Prof. Luca Sella

Laureanda

Cristina Azzolini

Matricola n.

618419

SOMMARIO

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	5
2. SCOPO DELLA TESI	8
3. MATERIALE E METODI	10
3.1.Coltura di <i>Botrytis cinerea</i>	10
3.2.Inoculazione degli acini d'uva con <i>Botrytis cinerea</i>	10
3.3.Raccolta dei campioni infettati	10
3.4.Estrazione RNA dai campioni infettati	11
3.5.Quantificazione RNA tramite spettrofotometro	12
3.6.Quantificazione RNA tramite gel elettroforesi	12
3.7.Preparazione cDNA	14
3.8.REAL-TIME PCR	15
4. RISULTATI	18
4.1.Infezione di acini d'uva per estrazione RNA	18
4.2.Analisi dell'espressione dei geni codificanti laccasi su acini d'uva	21
4.2.1.Analisi dell'espressione dei geni codificanti laccasi su acini non feriti	21
4.2.2.Analisi dell'espressione dei geni codificanti laccasi su acini feriti	23
5. DISCUSSIONE	27
6. BIBLIOGRAFIA	30

RIASSUNTO

Botrytis cinerea è un fungo patogeno necrotrofico che colonizza i tessuti epigei di più di duecento specie di piante, alcune delle quali economicamente importanti, quali la vite, causando la malattia nota come muffa grigia.

Questo fungo, colonizzando il tessuto delle piante ospiti, rilascia enzimi e metaboliti in grado di attaccare e uccidere le cellule vegetali, fino alla completa macerazione dei tessuti.

Tra i tanti enzimi che vengono secreti da *Botrytis cinerea* durante l'infezione, la laccasi è un enzima in grado di detossificare il trans-resveratrolo, una fitoalessina antimicrobica prodotta naturalmente dalle piante in risposta ad attacco indotto da agenti patogeni, quali batteri o funghi.

Questo enzima potrebbe quindi svolgere un ruolo importante nel processo infettivo. Tuttavia non è stato ancora dimostrato se le laccasi sono secrete durante l'infezione di acini d'uva. Sono stati così presi in considerazione 3 geni codificanti laccasi, precedentemente caratterizzati. L'espressione di questi geni è stata dimostrata in frutti di pomodoro e foglie di arachidi; tuttavia la loro espressione durante l'infezione di acini d'uva non è stata ancora studiata.

Acini feriti e sani sono stati quindi inoculati con micelio di *Botrytis cinerea* e si è estratto l'RNA dai tessuti infetti a vari tempi. Dall'RNA si è ottenuto il cDNA grazie a trascrittasi inversa, e infine l'espressione dei tre geni laccasi è stata studiata tramite l'uso di REAL-TIME PCR, confrontandola con l'espressione di un gene di riferimento, la beta-tubulina del fungo.

L'espressione dei geni codificanti laccasi è risultata intensificarsi nel momento in cui il fungo entra in contatto con la polpa dell'uva; poiché i polifenoli sono più abbondanti all'interno dell'acino, le laccasi potrebbero svolgere un ruolo di detossificazione. Tra i geni analizzati, uno è risultato il più espresso durante la colonizzazione dell'acino d'uva, sia in acini non feriti, che in quelli feriti.

In quest'ultimi l'espressione relativa di questo gene raggiunge un massimo di espressione già dopo due giorni dall'inoculo.

ABSTRACT

Botrytis cinerea is a necrotrophic pathogenic fungus that colonizes epigeans tissues of more than two hundred plant species, some of which economically important, like grapevine, causing the disease known as grey mold. This fungus, colonizing the tissues of the host plants, releases enzymes and metabolites that attack and kill plant cells until complete tissue maceration.

Among the many enzymes that are secreted by *Botrytis cinerea* during infection, laccase is an enzyme able to detoxify the trans-resveratrol, an antimicrobial phytoalexin naturally produced by plants in response to attack induced by pathogens, such as bacteria or fungi. This enzyme could therefore play an important role in the infectious process.

However whether laccases are secreted during infection of grapes is not yet established. Three laccase genes, previously characterized, were evaluated in this study. The expression of these genes has been demonstrated in tomato fruits and peanut leaves; however their expression during infection of grape berries has not been studied yet.

Wounded and healthy grapes were then inoculated with mycelia of *Botrytis cinerea* and the RNA was extracted from infected tissues at various times. The cDNA was obtained from the extracted RNA through reverse transcriptase, and the expression of the three laccase genes was studied by REAL-TIME PCR, comparing their level of expression with the one of a reference gene, the fungal beta-tubulin.

The expression of the laccase genes encoding increases when the fungus comes into contact with the grape pulp; since the polyphenols are more abundant inside the grape laccases, may therefore play a detoxifying role. Among the genes analyzed, one was the most expressed during the colonization of the grape in both wounded and intact grapes. In wounded grapes the relative expression of this gene reaches a maximum already 48 hours after inoculation.

1. INTRODUZIONE

Botrytis cinerea è un importante fungo patogeno necrotrofico ubiquitario responsabile di marciumi e muffa grigia in più di 200 specie di piante (Shah et al., 2012). La vite è uno dei più importanti e conosciuti ospiti di questo fungo patogeno; le notizie relative alla sua presenza in vigneto risalgono per lo meno al medioevo, anche se studi dettagliati sulla malattia sono stati fatti solo a partire dal 1800 (Belli et al., 2011).

Il micelio del fungo è costituito da ife settate di color brunoastro, il cui diametro varia considerevolmente in funzione del substrato di crescita (Gessler et al., 1985). A partire dall'autunno e sino ad inverno inoltrato, il fungo forma in gran quantità, sui nuovi tralci, gli sclerozi, piccoli corpiccioli nerastri, duri, visibili ad occhio nudo, aderenti al substrato o posti internamente ai tessuti corticali (Nair et al., 1987). Assieme al micelio, annidato nello spessore del ritidoma, gli sclerozi costituiscono le forme svernanti del parassita. In primavera gli sclerozi rimasti sui tralci dopo la potatura o presenti sui sarmenti caduti a terra sviluppano un micelio che differenzia rami conidiofori su cui si sviluppano i conidi. Le spore del micete, inizialmente globose assumono forma ovoidale a maturità e la colorazione grigia dei conidiofori conferisce il tipico aspetto grigiastro alle colonie sporulanti (Belli et al., 2011).

I conidi prodotti dal fungo vengono diffusi dal vento e dalla pioggia (Jarvis et al., 1962); la massima produzione si ha verso la fine di maggio-prima decade di giugno (a cavallo della fioritura) e in autunno in prossimità della vendemmia (vi è una stretta correlazione tra piogge e produzione di conidi) e sono in grado di infettare diversi organi della vite, provocando sintomi molto diversi tra loro (Corbaz, 1872).

Le infezioni di acini lesionati comportano lo sviluppo di una sporulazione grigiastria dall'invasatura in avanti, o in alternativa ciuffi di rami conidiofori compaiono sulla bacca marcescente ma apparentemente ancora intatta. Nei giovani acini il micelio rimane confinato in piccole zone imbrunite all'apice stilare o in corrispondenza dell'inserimento degli organi fiorali sul pedicello. Sulle varietà bianche l'imbrunimento della bacca è antecedente alla manifestazione del marciume, mentre il viraggio di colore non è così evidente sulle varietà rosse (Belli et al., 2011).

Le infezioni a carico dei giovani germogli danno luogo alla comparsa di aree brunastre, che si ricoprono di un'abbondante sporulazione grigiastra se l'umidità relativa permane su valori elevati (ottimale 90%); infatti l'infezione botritica si manifesta con andamenti climatici umidi e piovosi. Sulle foglie, sempre durante il periodo primaverile, è possibile osservare lesioni più o meno ampie di colore bruno, localizzate in genere nelle zone marginali della foglia o comunque nelle aree dove più a lungo rimane l'umettazione.

Le infiorescenze possono essere colonizzate già prima della fioritura, specialmente in concomitanza con gli attacchi su foglia e in conseguenza dell'infezione imbruniscono e possono disseccare, mentre molto più frequentemente l'infezione avviene su fiore ormai aperto e sui residui fiorali, dove il sintomo osservato è una necrosi più o meno estesa (Belli et al., 2011).

In tutti i tessuti il percorso del micelio è nella maggior parte dei casi intercellulare e l'infezione è mediata da numerosi enzimi extracellulari e metaboliti secondari prodotti dal fungo (Belli et al., 2011). Ciascuno di questi composti gioca un ruolo fondamentale nei differenti stadi del processo di infezione; consentono al fungo di invadere il tessuto ospite, uccidere le cellule ed eventualmente convertire quest'ultime in biomassa fungina (Elad et al., 2007). Alcuni di questi enzimi e metaboliti agiscono extracellularmente alla zona di contatto superficiale oppure nel tessuto ospite a distanza dall'ifa crescente. In particolare le cutinasi, le lipasi e alcuni enzimi che degradano la parete cellulare possono facilitare la penetrazione della superficie ospite (Commènil et al., 1997), mentre tossine, ossalato e specie reattive dell'ossigeno possono contribuire ad uccidere le cellule ospiti (Elad et al., 2007).

Parecchi enzimi che degradano la parete cellulare contribuiscono anche alla conversione del tessuto ospite in biomassa fungine; ad esempio la produzione di enzimi pectolitici consente al patogeno di degradare la lamella mediana, determinando scollamento cellulare con conseguente marciume.

Il fungo produce inoltre altri enzimi coinvolti nella patogenesi, come le laccasi e le proteasi; quest'ultime appartengono alla classe delle idrolasi, enzimi in grado di catalizzare la rottura del legame peptidico tra il gruppo amminico e il gruppo carbossilico delle proteine attraverso l'utilizzo di una molecola di acqua e vengono prodotte dal fungo per degradare eventuali proteine difensive o proteine di parete, e per ottenere fonte azotata (Movahedi et al., 1990).

Le laccasi invece rappresentano una interessante famiglia di enzimi caratterizzati da un'ampia specificità di substrato (Slomczynski et al., 1995); appartengono al gruppo delle ossidasi, e sono glicoproteine sia monomeriche che multimeriche che catalizzano l'ossidazione di un vasto gruppo di o- e p- diossifenoli trasformandoli nei chinoni corrispondenti. Contengono 4 atomi di rame, di cui 2 conferiscono alla proteina nativa una colorazione blu.

Durante l'infezione di uva il fungo produce attività laccasica che detossifica sostanze polifenoliche come il trans-resveratrolo, molecola ad azione antimicrobica abbondantemente presente nella polpa degli acini d'uva (Favaron et al., 2009); oltre a facilitare l'infezione fungina, l'attività laccasica porta ad una conseguente perdita di qualità sia nei vini rossi che bianchi.

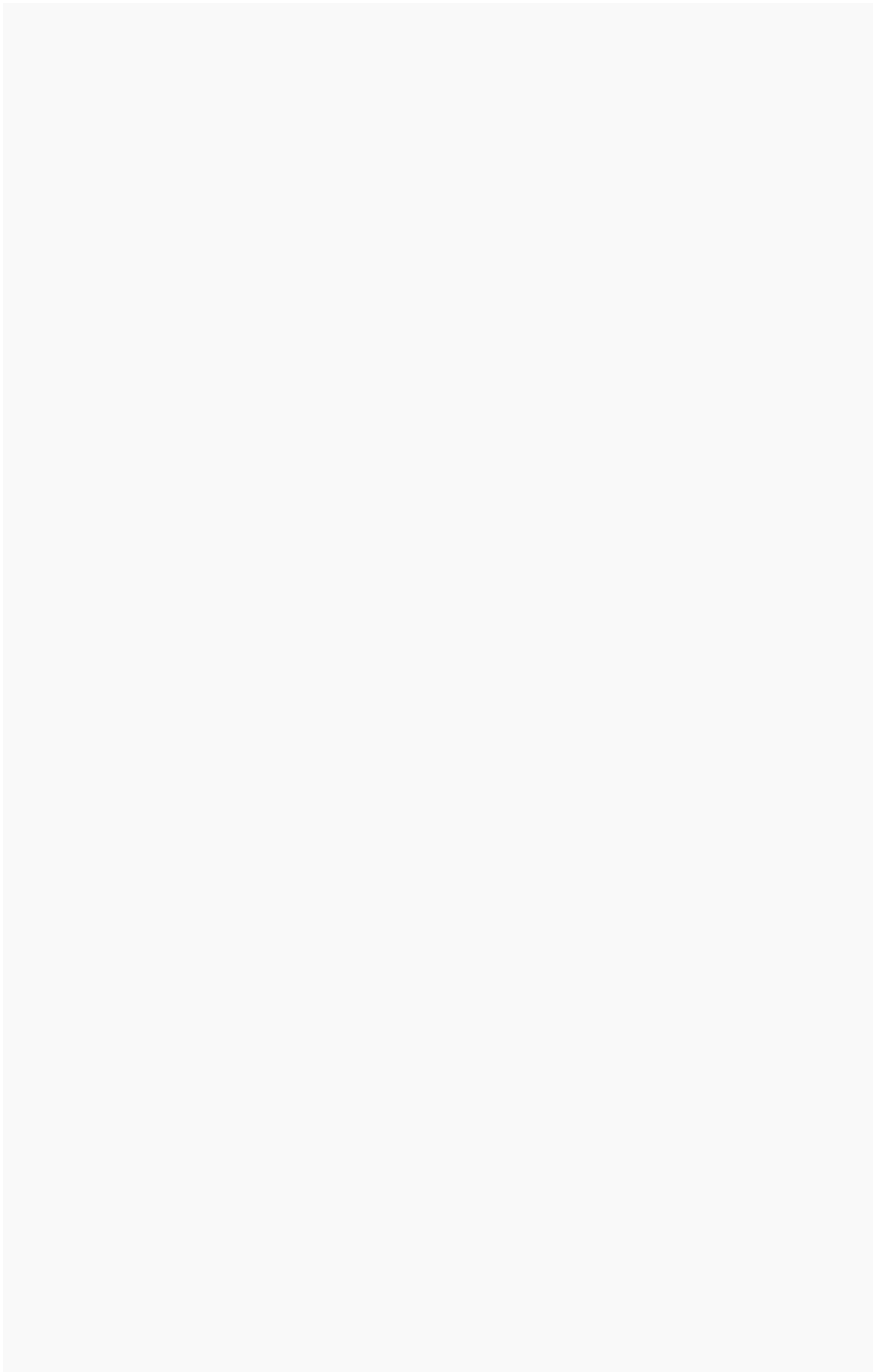
Nel genoma di *Botrytis cinerea* sono presenti circa 12 geni codificanti laccasi, tre dei quali sono stati clonati. Le tre laccasi codificate, denominate LAC1, LAC2 e LAC3 (codice BC1G_00138, BC1G_08553 e BC1G_10329 del *Botrytis cinerea* Database www.broadinstitute.org/annotation/genome/botrytis_cinerea) sono state caratterizzate ed è stata studiata l'espressione dei rispettivi geni codificanti durante l'infezione di *Arachis hypogaea* e pomodoro. Un'analisi Northern Blot ha consentito di dimostrare che il gene *lac2* è espresso durante l'infezione di foglie di arachide, mentre il trascritto del gene *lac1* non è stato rilevato (Schouten et al., 2002). Uno studio di proteomica ha dimostrato che LAC2 e LAC3 sono secrete da *Botrytis cinerea* durante l'infezione di frutti di pomodoro; in particolare LAC2 era secreta in pomodori maturi e a maturazione inibita, mentre LAC3 solamente nei pomodori maturi (Shah et al., 2012).

La soppressione mediante knock-out dei geni *lac1* e *lac2* non ha provocato riduzioni di virulenza rilevabili su foglie di specie ospiti quali vite, arachide, pomodoro e fagiolo (Schouten et al., 2002), dimostrando quindi che LAC1 e LAC2 non sono importanti fattori di virulenza nell'infezione di questi tessuti.

2. SCOPO DELLA TESI

In questo lavoro di tesi i 3 geni codificanti laccasi (BC1G_00138, BC1G_08553, BC1G_10329) finora caratterizzati sono stati selezionati per studiarne l'espressione durante l'infezione su acini d'uva feriti e non feriti. Infatti questi tessuti sono particolarmente ricchi in polifenoli ad attività antimicrobica quali resveratrolo e tannini, e gli enzimi codificati dai geni laccasi potrebbero svolgere un ruolo nella loro detossificazione. Inoltre l'espressione dei geni codificanti laccasi non è mai stata verificata su buccia e/o polpa di acino d'uva.

I livelli di espressione dei tre geni è stata valutata mediante REAL-TIME PCR, a diversi tempi dall'infezione.



3. MATERIALI E METODI

3.1. Coltura di *Botrytis cinerea*

Il fungo *Botrytis cinerea* è stato fatto crescere in vitro su di una piastra contenente 12 ml di terreno: agarosio 0.8% (w/v), acido poligaratturonico [PGA 1% (w/v)] e tampone sodio acetato 50 mM a pH 4.6.

3.2. Inoculazione degli acini d'uva con *Botrytis cinerea*

I grappoli d'uva bianca cv. Malvasia sono stati prima lavati con alcol etilico per 5 minuti, e successivamente a gruppi di trenta riposti in recipienti di vetro, lavati anch'essi con alcol etilico e coperti con carta bianca sterile inumidita. A metà degli acini è stata effettuata una ferita con ago. L'inoculazione è stata eseguita deportando tondelli di agar (\emptyset 3 mm) contenenti il micelio del fungo *Botrytis cinerea* su bucce di acino sano o sulle ferite. I recipienti sono stati poi annaffiati con acqua sterile DEPC (Dietilpirocarbonato) e ricoperti con carta domopack per mantenere elevati livelli di umidità.

3.3. Raccolta dei campioni infettati

La raccolta dei campioni infettati è stata eseguita recuperando il tessuto dalla buccia attorno al tondello di agar, facendo attenzione a rimuovere il pezzetto di agar. A 1, 2, 3, e 4 giorni dall'inoculo sono stati recuperati 60 acini, di cui 30 feriti e 30 non feriti. Ogni provetta conteneva una quantità di campione pari a 0.4 g. Le provette sono state congelate in azoto liquido e successivamente conservate nel freezer a -80 °C.

3.4. Estrazione RNA dai campioni infettati

Ciascun campione di tessuto infetto è stato poi utilizzato per l'estrazione dell'RNA tramite "RNasy PLANT MINI KIT". Per la preparazione di 50 ml di tampone di estrazione sono stati utilizzati:

- 1.81 g Tris HCl pH=8
- 0.46 g EDTA
- 5.84 g NaCl
- 1 g CTAB
- H₂O DEPC (Dietilpirocarbonato)

Dopo autoclavatura sono stati aggiunti:

- 1 g PVPP
- 50 µl spermidine trihydrochloride (di 50%)

L'utilizzo di EDTA, DEPC e il mantenimento delle eppendorf in ghiaccio durante le fasi di estrazione sono serviti per minimizzare la problematica della contaminazione da RNasi, enzimi particolarmente potenti perché funzionano senza necessità di alcun cofattore e sono attivi entro un ampio range di pH, la cui struttura proteica secondaria può ricostituirsi anche dopo trattamento con agenti denaturanti, oltre che resistere a bolliture prolungate, alla sterilizzazione in autoclave. Il tampone di estrazione è stato riscaldato e portato a 65 °C di temperatura. Sono stati omogeneizzati 0.4 g di tessuto in azoto liquido, fino a renderlo una polvere fine, a cui poi sono stati aggiunti 4 ml di tampone di estrazione e 80 µl di β-mercaptoetanol, agente riducente che inattiva le RNasi, e successivamente si è incubato per 10 minuti a 65 °C, agitando il campione ogni 2 minuti. E' stato poi aggiunto un volume uguale di cloroformio:isoamilalcol (24:1) per denaturare le restanti proteine, e centrifugato a 5500 rpm per 15 minuti a 4 °C, per poi prelevare la fase acquosa. Questo procedimento è stato ripetuto una seconda volta, per ottenere la massima resa. In seguito è stato aggiunto 0.1 volume di sodio acetato (3M pH 5.2) e 0.6 volumi di isopropanolo freddo per la precipitazione degli acidi nucleici; il campione è

stato poi incubato per 30 minuti a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e centrifugato a 5500 rpm per 30 minuti a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 1 ml TE (Tris HCl pH 8 ed EDTA) a cui sono stati aggiunti 0,3 volumi di LiCl (8M) per la precipitazione specifica dell'RNA. Il campione è stato incubato overnight a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, trasferito in un eppendorf di 1.5 ml, centrifugato a 13000 rpm per 30 minuti a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, lavato con 70% (v/v) etanolo freddo e nuovamente centrifugato alla stessa velocità. Il pellet è stato poi risospeso in 40 μl di H_2O DEPC (Dietilpirocarbonato).

3.5. Quantificazione RNA tramite spettrofotometro

Conclusa l'estrazione è stata verificata la concentrazione di RNA ottenuta tramite l'utilizzo dello spettrofotometro, strumento che consente di valutare l'estrazione di acidi nucleici sia qualitativamente che quantitativamente. Alla lunghezza d'onda di 260 nm si ha la massima assorbanza degli acidi nucleici e il rapporto A260/A280 (indice della contaminazione da proteine) deve avere un valore ottimale di 1.8-2.0. È stata quindi eseguita la lettura a 260 nm e 280 nm. L'esito dell'estrazione è risultato positivo, con un rapporto A260/A280 di 1.8 sia per i non feriti che per i feriti, e una concentrazione media di 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ per i non feriti, e 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ per i feriti.

3.6. Quantificazione RNA tramite gel elettroforesi

L'RNA è stato quantificato anche elettroforeticamente su gel di agarosio, che sfrutta la carica negativa dell'RNA per la separazione delle molecole in base al proprio peso molecolare. Per la preparazione del gel di agarosio 1% (w/v), 20 ml totali di soluzione contenevano:

- 19.6 ml di H_2O DEPC (Dietilpirocarbonato)
- 0.4 ml di TAE 50x
- 0.2 g di agarosio

Per la preparazione del tampone di corsa, su 200 ml totale di soluzione:

- 4 ml di TAE
- 196 ml di H₂O DEPC (Dietilpirocarbonato)

Per la preparazione dei campioni da caricare nei pozzetti:

- Un volume di RNA pari a 600 ng come calcolato tramite spettrofotometro
- 1 µl di colorante LB 10x
- La miscela è stata incubata a 65° C per 5 minuti e poi si è aggiunto 1 µl di Etidio Bromuro (0.1 µg/ml)

L'Etidio bromuro è una molecola che si intercala agli acidi nucleici ed emette fluorescenza quando eccitata dalla luce UV. Come risultato si sono osservate le bande di RNA ribosomiale che hanno consentito di verificare la corretta quantificazione dell'RNA.

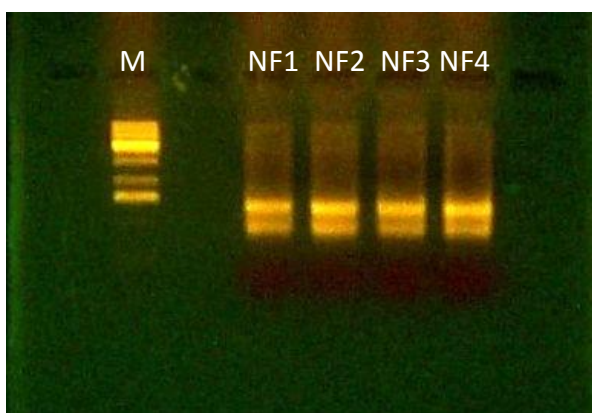


Figura A. Corsa elettroforetica di 600 ng di RNA estratto da acini non feriti e raccolti dopo 1 giorno (NF1), 2 giorni (NF2), 3 giorni (NF3) e 4 giorni (NF4). M: 3µl di marker 1kb (Fermentas). Il gel è stato fatto correre per circa 30 minuti a 80 V.

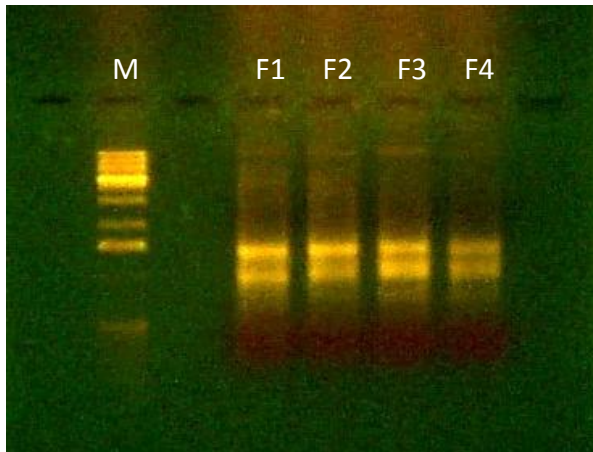


Figura B. Corsa elettroforetica di 600 ng di RNA estratto da acini feriti e raccolti dopo 1 giorno (F1), 2 giorni (F2), 3 giorni (F3) e 4 giorni (F4). M: 3 μ l di marker 1kb (Fermentas). Il gel è stato fatto correre per circa 30 minuti a 80 V.

3.7. Preparazione cDNA

L'RNA estratto e quantificato è stato poi trattato con DNasi, per rimuovere eventuali residui di DNA genomico: 8 μ l di RNA sono stati incubati a 37 °C per 30 minuti assieme ad 1 μ l di DNasi (Promega) e 1 μ l di Buffer 10x (Promega). Successivamente 1 μ l di "stop solution" è stato aggiunto alla reazione che è stata bloccata a 65 °C per 10 minuti. La *reverse transcriptase*-PCR (RT-PCR), che consente di sintetizzare il cDNA (DNA complementare) partendo da una miscela di RNA messaggeri, è stata eseguita utilizzando un mix di oligonucleotidi composto da 15/18 timine (*poliT*), capace di appaiarsi al 3' poliadenilato dell'RNA messaggero. In un primo momento i primers (2 μ l) sono stati miscelati con gli 11 μ l della soluzione contenente RNA trattato con DNasi, quindi sono stati incubati 5 minuti a 70 °C e lasciati per almeno 5 minuti in ghiaccio. Sono stati successivamente aggiunti i nucleotidi (2 μ l), un buffer (8 μ l della soluzione stock 5x, che determina l'ambiente chimico favorevole per la reazione), l'enzima reverse transcriptase (1.7 μ l) e H₂O (necessaria per raggiungere un volume finale di 40 μ l). Il ciclo di RT consiste nei seguenti step:

- 25 °C per 5 minuti (appaiamento primer)
- 42 °C per 60 minuti (allungamento)
- 70 °C per 15 minuti (inattivazione RT)

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

3.8. REAL-TIME PCR

Per l'amplificazione e la quantificazione del prodotto di amplificazione in tempo reale è stato utilizzato il metodo della Real-time PCR, utilizzando lo strumento Rotor-Gene Q 2plex (Qiuagen GmbH) .

20 µl totali di miscela di reazione contenevano:

- 3 µl di cDNA
- 1 µl di PRIMER FOR
- 1 µl di PRIMER REV
- 10 µl di MASTER MIX (2X Brilliant III Ultra-fast SYBR Green QPCR MasterMix)
- 5 µl H₂O

Il MasterMix contiene Mg²⁺, i nucleotidi dNTPs, e il SYBR Green, fluoroforo che si intercala alla doppia elica del DNA ed emette fluorescenza a 510 nm. Sono stati usati specifici primers REV e FOR per le laccasi e la beta-tubulina di *Botrytis cinerea* (gene di riferimento detto housekeeper che consente di normalizzare l'espressione del gene target) in grado di ibridizzare con il filamento di DNA stampo.

Primer	Sequenza	Tm (° C)	Amp prod
beta-tubulina (BC1G_00122.1)	Forward	GTCTCAAGATGTCCTCCACC	61.9
	Reverse	ACTCCATCTCGTCCATACCT	62.0
lac1 (BC1G_00138)	Forward	GTCCTAATCACCCCTATCCATCTC	61.5
	Reverse	ATTGTAAAGCCAAACCCTCAG	60.9
lac2 (BC1G_08553)	Forward	TTACCAACAATCTCCAACAC	58.0
	Reverse	CACCAACATCTTCATCATAGTC	58.9
	Forward	TGTA ACTCAATGTCCTATCGCT	61.3
	Reverse	CATCTTCATCATAGTCCGCAG	60.7
lac3 (BC1G_10329)	Forward	AGACATACACTTTCCAAGCGA	61.8
	Reverse	GTTGATAAGTCCATTGTACCTG	61.6

TABELLA 1: Sequenze nucleotidiche dei primer dei geni laccasi e beta-tubulina, con rispettive temperature di melting (Tm) e dimensione del prodotto di amplificazione. (I codici tra parentesi corrispondono alle sequenze dei geni nel Botrytis cinerea Database "BROAD INSTITUTE")

Per ogni gene laccasi e per la beta-tubulina sono state preparate 3 repliche per ogni cDNA. Inoltre è stato preparato anche un controllo negativo per ogni gene laccase e per la beta-tubulina non contenente cDNA. La Real Time PCR è stata eseguita ripetendo 40 volte il seguente ciclo:

- 15 sec a 95 °C
- 15 sec a 56 °C
- 40 sec a 72 °C

Il prodotto amplificato è stato poi quantificato tramite quantificazione relativa, usando il software Rotor-Gene 2.0.3.2 (Qiagen GmbH) per calcolare quanto i geni laccasi sono

espressi rispetto al gene di riferimento beta-tubulina, la cui espressione è posta uguale a 1. Inoltre tramite l'analisi di melting, che si ottiene alla fine dell'amplificazione innalzando la T da 55 °C a 95 °C e misurando il calo di fluorescenza dovuto alla separazione dei due filamenti di DNA stampo con conseguente dissociazione del fluoroforo, è stata verificata la specificità dei prodotti di amplificazione.

4. RISULTATI

4.1. Infezione di acini d'uva per estrazione RNA

Circa 240 acini d'uva sono stati infettati con un pezzetto di agar contenente il micelio di *Botrytis cinerea*. Di questi circa 120 acini d'uva sono stati prima feriti con un ago, cosicché il fungo potesse colonizzare direttamente la polpa d'uva contenente i polifenoli. Per verificare il livello di espressione dei geni laccasi di interesse si è proceduto con la raccolta del tessuto lesionato dopo 1,2,3, e 4 giorni, effettuando un taglio attorno attorno alla sezione di tessuto colonizzato dal fungo.

Dopo un giorno dall'inoculazione non si notano particolari sintomi dovuti all'infezione del fungo, sia negli acini feriti che non feriti. (Fig. 1)



Figura 1. Acini infettati da *Botrytis cinerea* dopo un giorno dall'inoculazione.

Al secondo giorno gli acini non feriti non presentano alcun sintomo visibile, mentre gli acini precedentemente feriti mostrano un lieve imbrunimento nella parte circostante la zona di contatto col fungo. (Fig. 2)

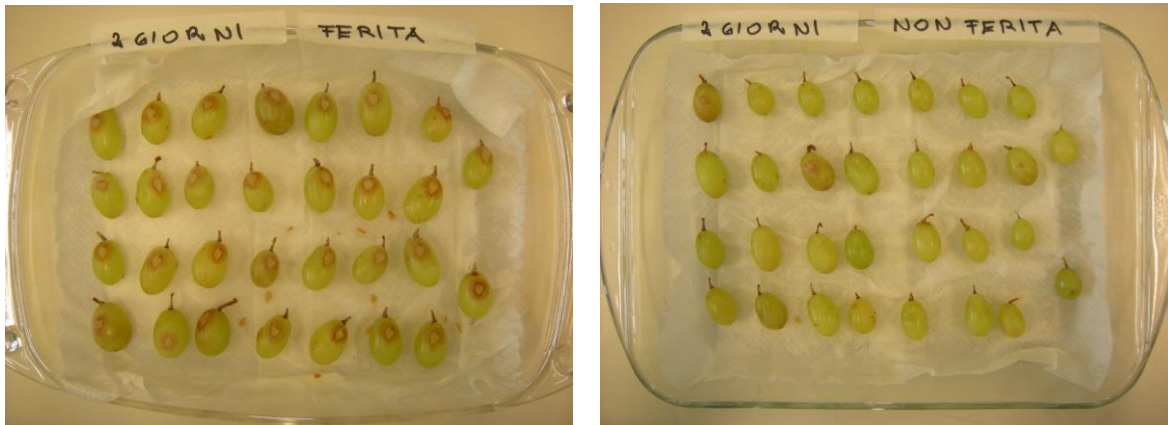


Figura 2. Acini infettati con *Botrytis cinerea* dopo due giorni dall'inoculazione.

Al terzo giorno solo su alcuni acini non feriti si nota lo sviluppo di colore brunastro attorno alla zona di infezione del fungo. Sugli acini feriti il sintomo causato dal fungo si espande oltre la zona di contatto. (Fig. 3)

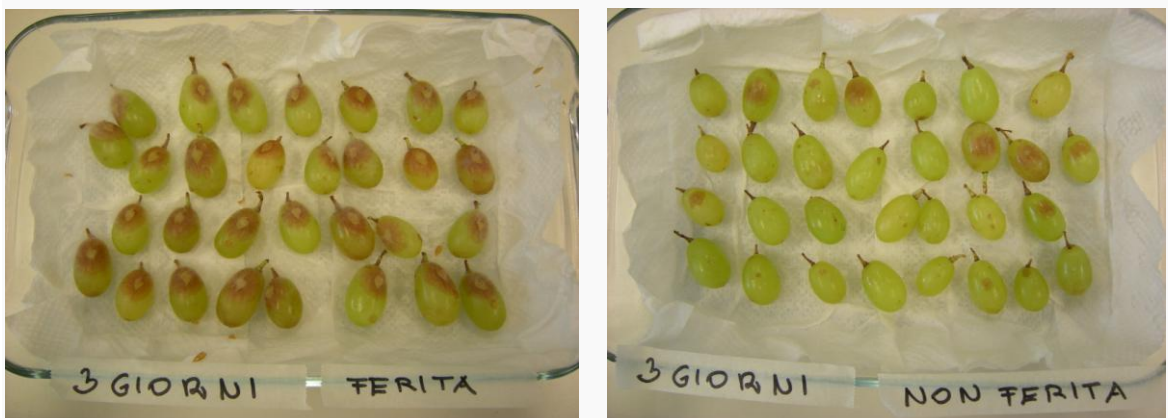


Figura 3. Acini infettati con *Botrytis cinerea* dopo tre giorni dall'inoculazione.

Dopo quattro giorni solo alcuni acini non feriti presentano macchie leggere di colore scuro, ma il sintomo non è ancora sviluppato. Negli acini feriti si osserva una colorazione brunastra su almeno metà buccia. (Fig. 4)



Figura 4. Acini infettati da *Botrytis cinerea* dopo quattro giorni dall'inoculazione.

4.2. Analisi dell'espressione dei geni codificanti laccasi su acini d'uva

4.2.1. Analisi dell'espressione dei geni codificanti laccasi su acini non feriti

Lo studio dell'espressione dei geni codificanti laccasi è stato eseguito tramite l'utilizzo della Real Time PCR, strumento che amplifica e contemporaneamente quantifica un tratto di DNA.

Negli acini non feriti e raccolti il primo giorno la beta-tubulina risulta essere espressa, quindi il fungo ha già iniziato a crescere sui tessuti inoculati. Per quanto riguarda l'espressione dei geni codificanti le laccasi, non si è osservata alcuna espressione. Anche l'analisi dell'RNA estratto da acini raccolti il secondo giorno non ha evidenziato alcuna variazione di espressione dei geni codificanti laccasi.

Solo dopo quattro giorni dall'inoculazione si è osservata una iniziale espressione del gene *lac2*, e seppur in misura minore una espressione del gene *lac1*. (Fig. 5 e Fig. 6)

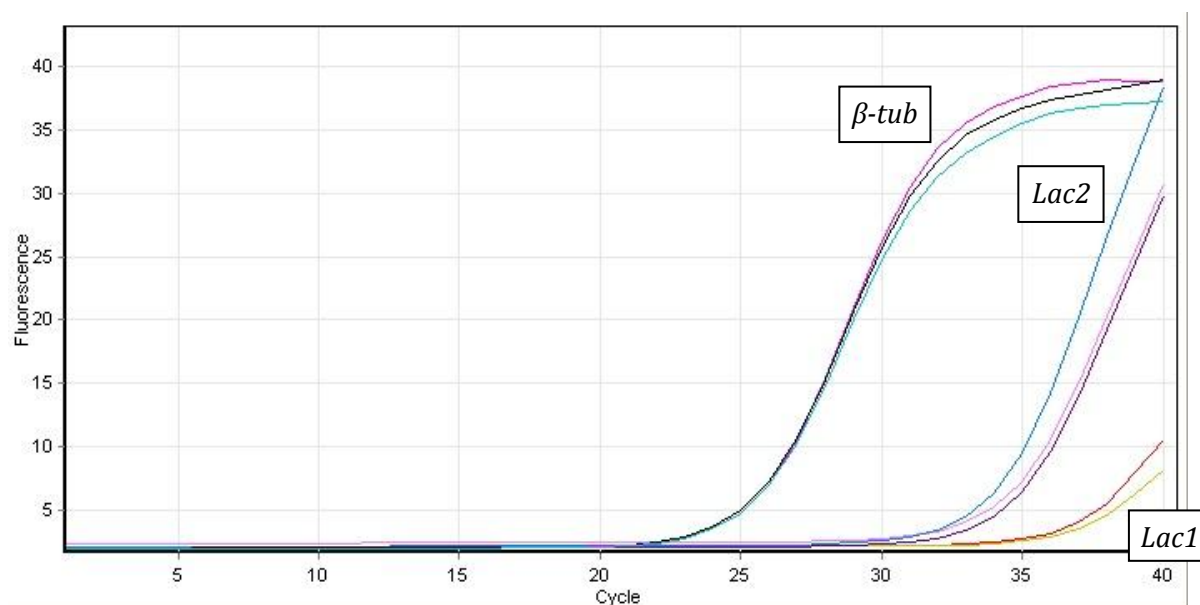


Figura 5. Amplificazione dei geni *lac1*, *lac2* e *lac3* su acini non feriti dopo quattro giorni dall'infezione. *B-tub*= gene beta-tubulina di *Botrytis cinerea* (Rotor-Gene Q, Qiagen)

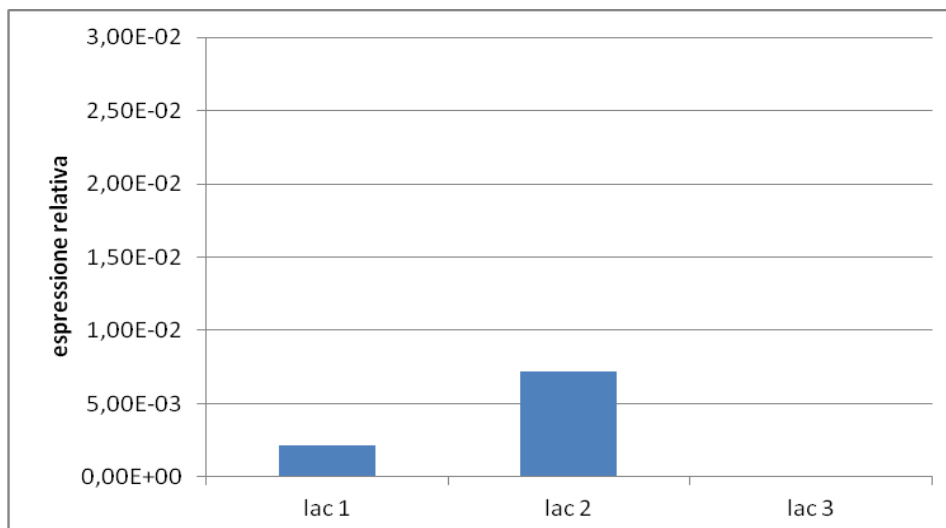


Figura 6. Espressione relativa dei geni lac1, lac2 e lac3 su acini non feriti dopo 4 giorni dall'inoculazione. L'espressione della beta-tubulina è stata posta uguale a 1. (L'espressione relativa è stata calcolata utilizzando il software Rotor-Gene 2.0.3.2, Qiagen GmbH)

Per verificare la specificità di amplificazione dei geni codificanti laccasi è stata utilizzata l'analisi di melting, facendo innalzare la T da 55 °C a 95 °C e misurando il calo di fluorescenza dovuto alla separazione dei due filamenti di DNA stampo con conseguente dissociazione del fluoroforo.(Fig. 7)

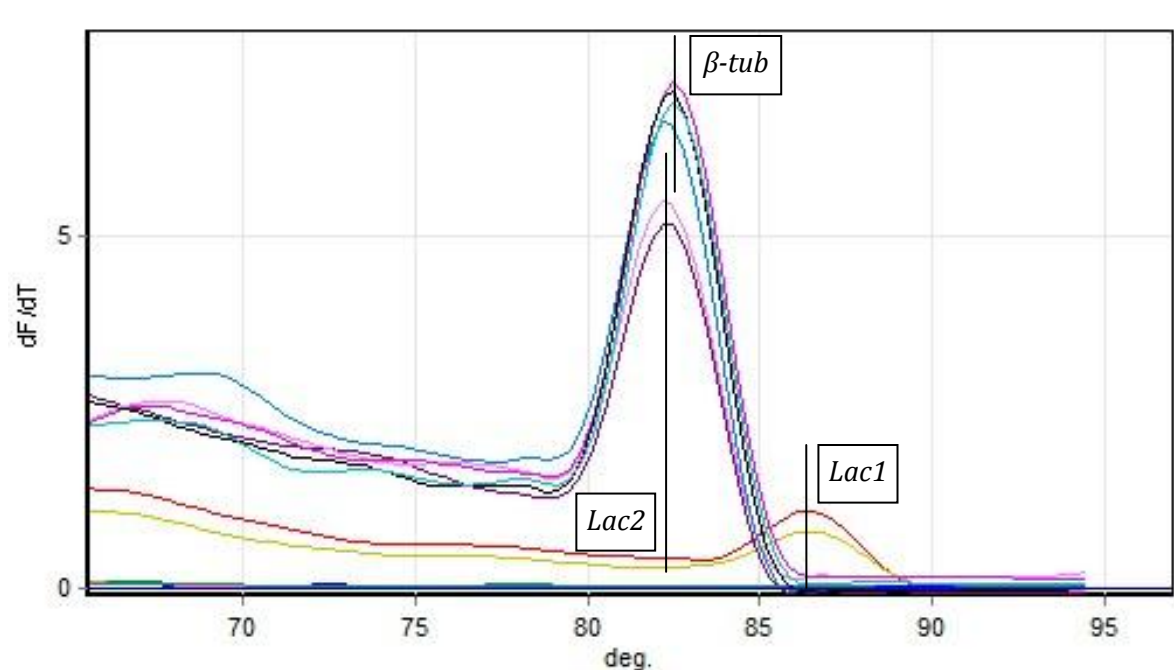


Figura 7. Analisi di melting dei prodotti di amplificazione ottenuti da acini non feriti e raccolti il quarto giorno. Tutte le curve dei geni analizzati sono ben allineate, indice di una buona specificità di amplificazione. (Rotor-Gene Q, Qiagen)

4.2.2. Analisi dell'espressione dei geni codificanti laccasi su acini feriti

Negli acini feriti e raccolti il primo giorno, oltre alla beta-tubulina, risultano essere debolmente espressi anche i geni *lac1* e *lac2* (Fig. 8 e Fig. 9), quest'ultima espressa quattro volte in più di *lac1*.

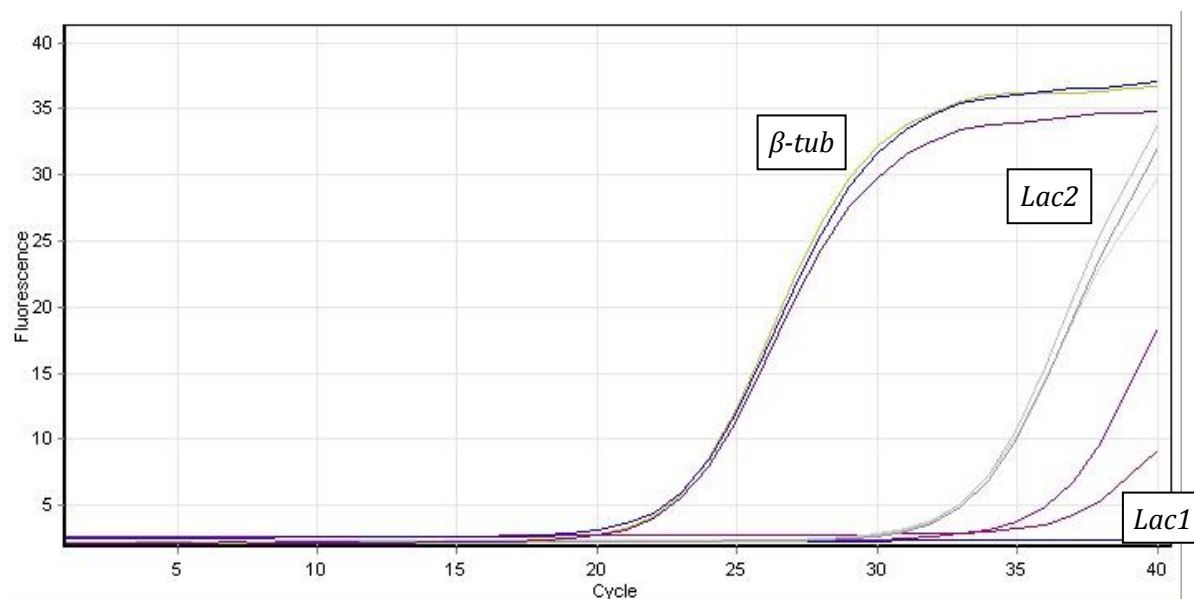


Figura 8. Amplificazione dei geni *lac1*, *lac2* e *lac3* su acini feriti dopo un giorno dall'infezione. (Rotor-Gene Q, Qiagen)

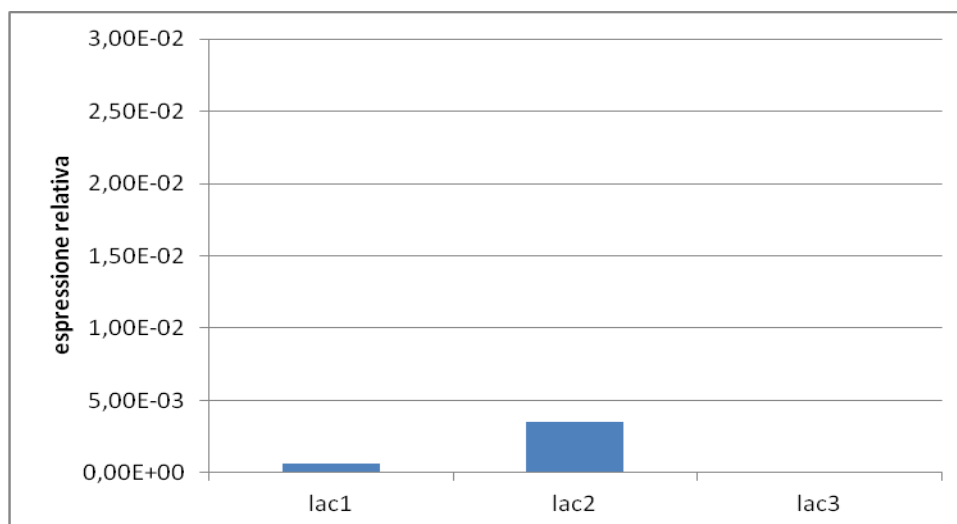


Figura 9. Espressione relativa dei geni *lac1*, *lac2*, e *lac3* su acini feriti dopo un giorno dall'inoculazione. L'espressione della beta-tubulina è stata posta uguale a 1. (L'espressione relativa è stata calcolata utilizzando il software Rotor-Gene 2.0.3.2, Qiagen GmbH)

Negli acini feriti raccolti il secondo giorno si è verificata una ulteriore induzione dell'espressione del gene *lac2*. L'espressione del gene *lac1* rimane costante rispetto al primo giorno e inizia a rilevarsi il trascritto del gene *lac3*. (Fig. 10 e Fig. 11)

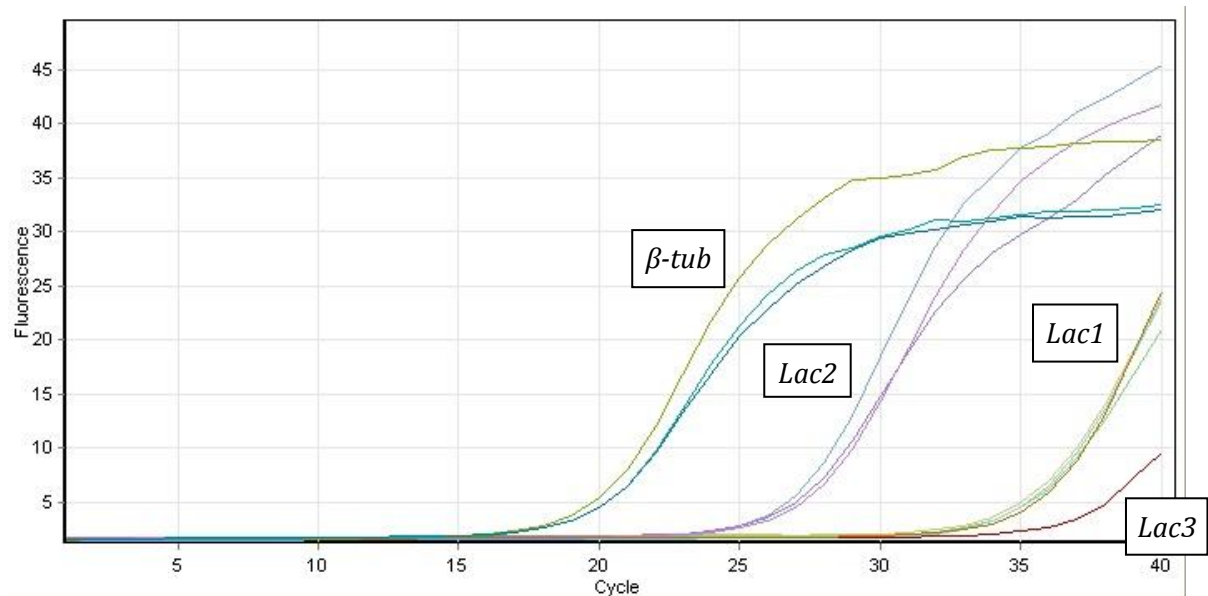


Figura 10. Amplificazione dei geni *lac1*, *lac2* e *lac3* su acini feriti dopo due giorni dall'infezione. (Rotor-Gene Q, Qiagen)

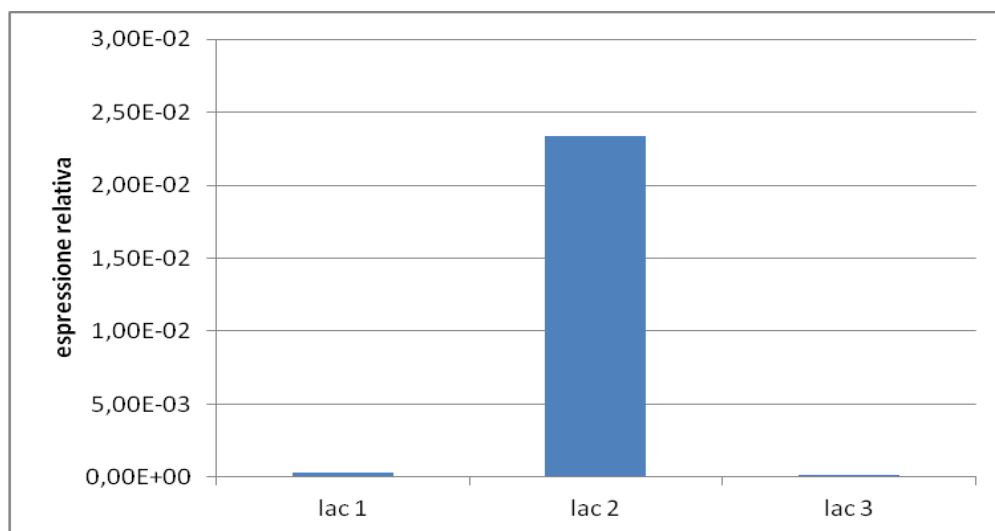


Figura 11. Espressione relativa dei geni *lac1*, *lac2* e *lac3* su acini feriti dopo 2 giorni dall'inoculazione. L'espressione della beta-tubulina è stata posta uguale a 1. (L'espressione relativa è stata calcolata utilizzando il software Rotor-Gene 2.0.3.2, Qiagen GmbH)

Dopo il quarto giorno dall'inoculazione, negli acini feriti il livello di espressione del gene *lac2* si è mantenuto costante, così come l'espressione del gene *lac1*, mentre si è riscontrato un lieve aumento del trascritto del gene *lac3*. (Fig. 12 e Fig. 13)

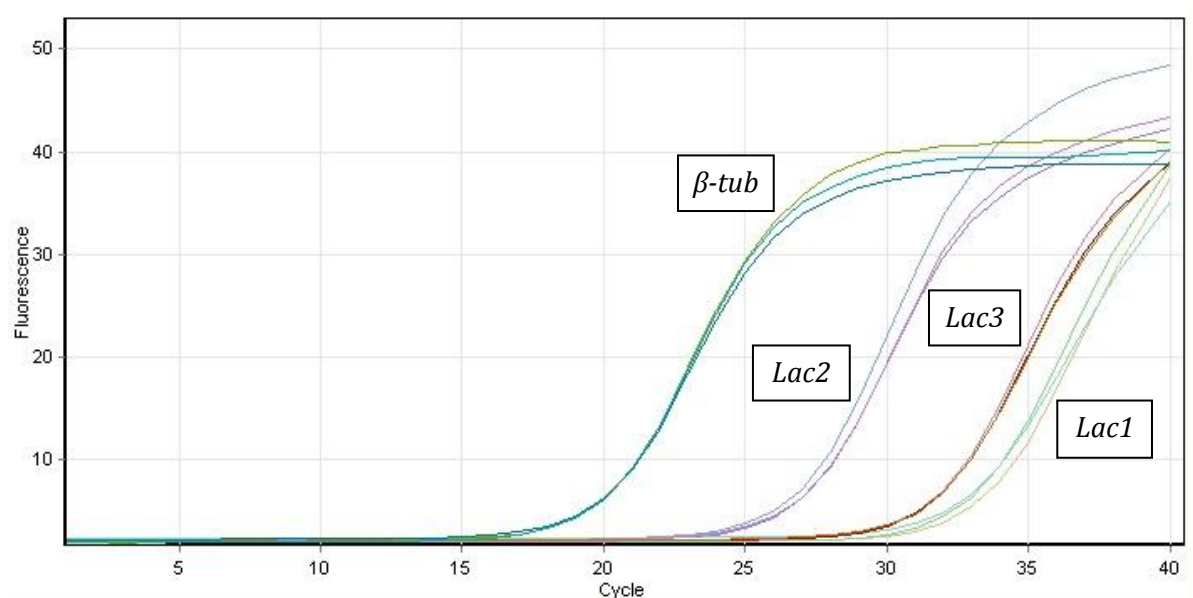


Figura 12. Amplificazione dei geni *lac1*, *lac2* e *lac3* su acini feriti dopo quattro giorni dall'infezione. (Rotor-Gene Q, Qiagen)

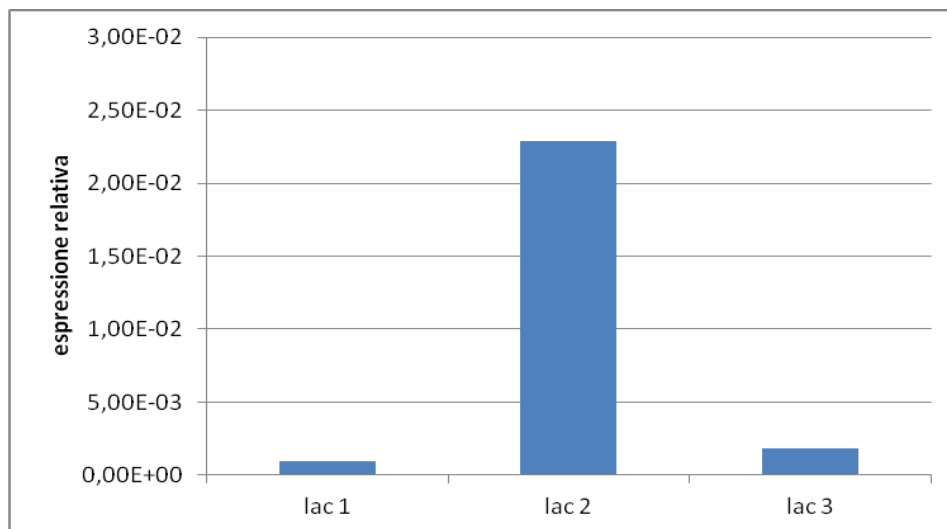


Figura 13. Espressione relativa di geni *lac1*, *lac2* e *lac3* su acini feriti dopo 4 giorni dall'inoculazione. L'espressione della beta-tubulina è stata posta uguale a 1. (L'espressione relativa è stata calcolata utilizzando il software Rotor-Gene 2.0.3.2, Qiagen GmbH)

Anche sugli acini feriti è stata verificata la specificità di amplificazione mediante analisi di melting. (Fig. 14)

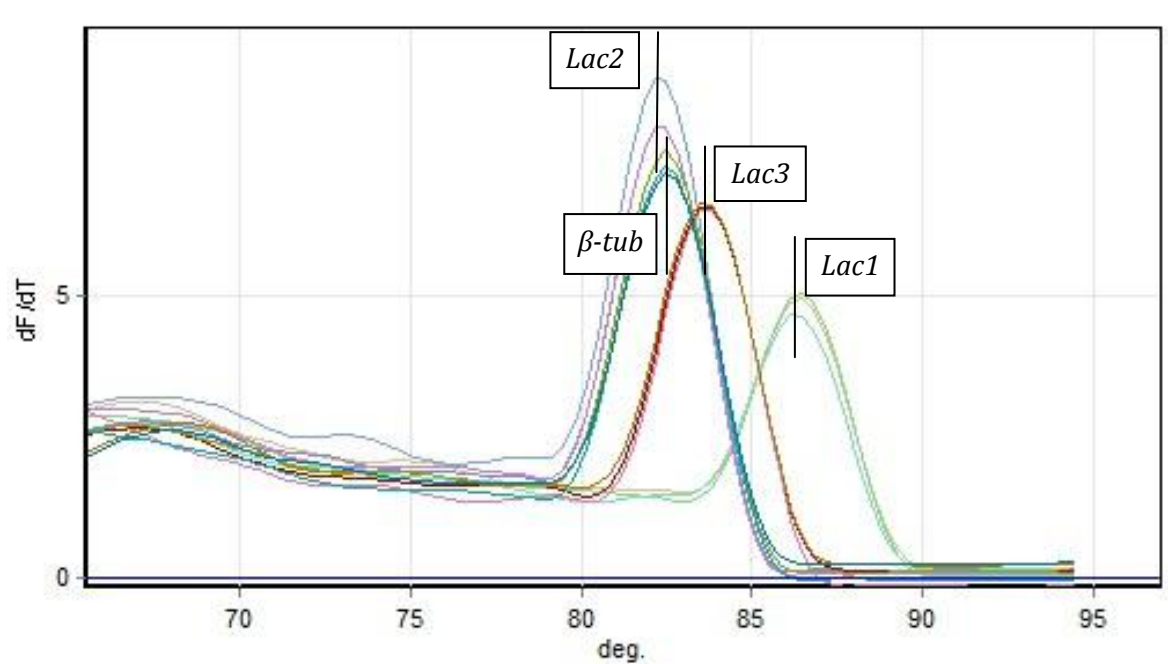


Figura 14. Analisi di melting dei prodotti di amplificazione ottenuti da acini feriti e raccolti il quarto giorno. Tutte le curve dei geni analizzati sono ben allineate, indice di una buona specificità di amplificazione. (Rotor-Gene Q, Qiagen)

5. DISCUSSIONE

Botrytis cinerea è un fungo patogeno necrotrofo in grado di colonizzare numerosi tessuti vegetali tra cui gli acini d'uva. All'interno della buccia il fungo si trova in un ambiente ricco in polifenoli e proteine di difesa (proteine PR) (Favaron et al., 2009) che hanno un potenziale effetto antimicrobico nei confronti di *Botrytis cinerea* (Timperio et al., 2012). Tra le fitoalessine, il resveratrolo si accumula nei tessuti infetti e può essere degradato da proteine fungine, in particolare le laccasi, la cui attività è coinvolta nella detossificazione del resveratrolo tramite ossidazione (Pezet et al., 1991, Sbaghi et al., 1996).

Nel genoma di *Botrytis cinerea* ci sono circa 12 geni codificanti laccasi, tre dei quali sono stati caratterizzati e la cui espressione è stata osservata durante l'infezione di frutti di pomodoro e foglie di arachide (Shouten et al., 2002 e Shah et al., 2012). Tuttavia l'espressione dei tre geni durante l'infezione di acini d'uva non è stata ancora caratterizzata.

Lo studio dell'espressione dei tre geni codificanti laccasi di *Botrytis cinerea* eseguito in questa tesi ha fornito una prospettiva sul loro profilo di espressione durante l'infezione di acini d'uva. L'espressione relativa dei geni *lac1*, *lac2* e *lac3* è stata valutata tramite REAL-TIME PCR rispetto al gene di riferimento beta-tubulina. L'analisi ha rivelato che l'espressione dei geni codificanti le laccasi si induce nel momento in cui il fungo si trova a contatto con la polpa d'uva: infatti l'espressione delle laccasi negli acini feriti è stata rilevata già dopo un giorno, mentre in quelli non feriti solo dopo quattro giorni dall'inoculazione, un intervallo di tempo presumibilmente necessario al fungo per entrare a contatto con la polpa dopo aver degradato la buccia. Da questi dati si può dedurre che il ruolo delle laccasi nel processo infettivo sia più tardivo rispetto agli enzimi degradativi.

Come atteso in base agli studi eseguiti su frutti di pomodori e foglie di arachide, dai dati è emerso inoltre che dei geni analizzati, *lac2* è il più espresso durante la colonizzazione di acini d'uva sia feriti che sani. In particolare dopo quattro giorni dall'inoculazione di acini non feriti, *lac2* è tre volte più espresso di *lac1*, mentre l'espressione di *lac3* non è stata rilevata. Negli acini feriti e raccolti dopo un giorno dall'inoculo, il livello di espressione di *lac2* è simile a quello misurato negli acini non feriti; una forte induzione dell'espressione di *lac2* è osservata a partire dal secondo giorno (circa quattro volte più trascritto rispetto

a 1 giorno), e la sua espressione rimane costante fino al quarto giorno. Inoltre, *lac1* si esprime a tutti i tempi analizzati anche se molto debolmente, mentre *lac3* si induce solamente al quarto giorno. Questi dati sono in accordo con l'osservazione che la trascrizione di *lac2* è fortemente indotta *in vitro* dalla presenza di resveratrolo e, in misura minore, da acido tannico (Schouten et al., 2002), sostanze polifenoliche abbondanti nell'acino d'uva, mentre il trascritto di *lac1* non è rilevato. Si può quindi ipotizzare che LAC2 svolga un ruolo preponderante nella detossificazione del resveratrolo dell'uva; inoltre l'osservazione che nell'acino d'uva siano espressi anche il gene *lac1* e, più tardivamente *lac3*, dimostra che *lac1* è probabilmente indotto da altre componenti contenute nella polpa dell'acino d'uva, e che le laccasi codificate da questi geni potrebbero contribuire al successo del processo infettivo.

6. BIBLIOGRAFIA

- **Belli G.**, Elementi di patologia vegetale, Piccin-Nuova Libreria, 2011, **12**(4.2): 312-316.
- **Commènil P., Brunet L, and Audran J.C.**, The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease, *Journal of Experimental Botany*, 1997, **48**: 1599-1607.
- **Corbaz R.**, Etudes des spores fungiques captées dans l'air, *Phytopathol*, 1972, **74**: 318-328.
- **Favaron F., Lucchetta M., Odorizzi S., Pais da Cunha A.T., and Sella L.**, The role of grape Polyphenols on *Trans*-Resveratrol activity against *Botrytis cinerea* and of fungal laccase on the solubility of putative grape Pr Proteins, *Journal of Plant Pathology*, 2009, **91**(3): 579-588.
- **Gessler A., and Jermini M.**, Role of flower infections of grape by *Botrytis cinerea* and consequences for the spraying schedule, *Quad. Vitic. Enol. Univ. Torino*, 1985, **9**: 245-250.
- **Jarvis W.R.**, The dispersal of spores of *Botrytis cinerea* Fr. In a raspberry plantation, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 1962, **45**: 449-559.
- **Kars I., and van Kan J.A.L.**, *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Springer, 2007, 99-118.
- **Movahedi S., and Heale J.B.**, The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea*, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1990, **36**: 303-324.
- **Nair N.G., and Nadtotchei A.**, Sclerotia of *Botrytis* as a source of primary inoculums for bunch rot of grapes in New South Wales, Australia. *J. Phytopathol*, 1987, **119**: 42-51.
- **Pezet R.**, Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*, Fr. *FEMS Microbiology Letters*, **167**(2): 203-208.

- **Pezet R., Pont V., and Hoang-Van K.**, Evidence for detoxification of pterostilbene and resveratrol by laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*, *Physiol Mol Plant Pathol*, 1991, **39**: 441-450.
- **Schouten A., Wagemakers L., Stefanato F.L., van der Kaaij R.M., and van Kan J.A.L.**, Resveratrol acts as a natural antifungicide and induces self-intoxication by a specific laccase, *Molecular Microbiology*, 2002, **43**(4): 883-894.
- **Shah P., Powell A.L.T., Orlando R., Bergmann C., and Gutierrez-Sanchez G.**, Proteomic Analysis of Ripening Tomato Fruit Infected by *Botrytis cinerea*, *J. Proteome Res.*, 2012, **11**: 2178–2192.
- **Sbaghi M., Jeandet P., Bessis R., Leroux P.**, Degradation of stilbene phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines, *Plant Pathology*, 1996, **45**: 139-144.
- **Slomczynski D., Nakas J.P., and Tanenbaum S.W.**, Production and Characterization of Laccase from *Botrytis cinerea*, *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(3): 907–912.
- **Timperio A.M., D'alessandro A., Fagioni M., Magro P., Zolla L.**, Production of the phytoalexins trans-resveratrol and delta-viniferin in two economy-relevant grape cultivars upon infection with *Botrytis cinerea* in field conditions, *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, **50**: 65 e 71.