

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**

**Dottorato di Ricerca
in Agrobiologia e Agrochimica
XVII Ciclo**

**FACOLTÀ DI AGRARIA
SETTORE PATOLOGIA VEGETALE**

***Geni potenzialmente coinvolti nell'interazione
Trichoderma-pianta e/o agente patogeno***

Tutore:

Ch.mo Prof. *Matteo Lorito*

Dottorando:

Stefania Lanzuise

Co – Tutore

Ch.mo Prof. *Felice Scala*

Coordinatore

Ch.mo Prof. *Antonio Violante*

Anno Accademico 2004-2005

INDICE

1. Introduzione	1
1.1 Lotta biologica	1
1.1.1 Contenimento della popolazione patogena	2
1.1.2 Resistenza della pianta ospite	3
1.1.3 Impiego di agenti di lotta biologica	8
1.2 Strategie applicate per lo studio di meccanismi di biocontrollo	14
1.3 Interazione pianta microrganismi	19
1.3.1 Interazione pianta microrganismi benefici	19
1.3.2 Interazione pianta patogeno	22
1.3.2.1 Geni di resistenza e geni di avirulenza	24
1.3.2.2 Percezione di prodotti dei geni Avr da genotipi di piante resistenti	28
1.3.3 Interazione <i>Cladosporium fulvum</i> – pomodoro come sistema modello	29
1.3.3.1 Elicitori “Razza-specifici” e “Non Razza-specifici” di <i>C. fulvum</i> .	32
1.4 <i>Trichoderma</i> come agente antagonista	36
1.4.1 Interazione <i>Trichoderma</i> patogeno	40
1.4.1.1 Trasportatori ABC	43
1.4.1.2 Caratteristiche strutturali e funzionali dei trasportatori ABC	44
1.4.1.3 Trasportatori ABC nei funghi filamentosi	46
1.4.2 Interazione <i>Trichoderma</i> pianta	49
1.5 Interazione complessa pianta-patogeno-antagonista: <i>Trichoderma come sistema moderno</i>	54
1.6 Scopo della tesi	57
2. Materiali e Metodi	59
2.1 Ceppi utilizzati	59
2.2 Piante utilizzate	60
2.3 Condizioni di crescita	60
2.4 Vettori utilizzati	62

2.5	Costruzione del vettore pURA4E	65
2.5.1	Amplificazione tramite PCR del gene AVR4 e AVR4-ech42	67
2.5.2	Clonaggio del gene AVR4 e AVR4-ech42	70
2.5.2.1	Eliminazione del gel	70
2.5.2.2	Ligazione nei vettori plasmidici	70
2.5.2.3	Elettroporazione in cellule di <i>E. Coli</i>	71
2.5.2.4	Estrazione del DNA plasmidico	73
2.6	Trasformazione di <i>Agrobacterium tumefacens</i>	74
2.7	Trasformazione di <i>Trichoderma</i>	74
2.7.1	Trasformazione di Protoplasti	74
2.7.2	Trasformazione mediata da <i>A. tumefacens</i>	76
2.8	Caratterizzazione genetica dei trasformanti	77
2.8.1	Estrazione del DNA di <i>Trichoderma</i>	77
2.8.2	Analisi Southern blotting	78
2.8.3	Estrazione dell'RNA di <i>Trichoderma</i>	80
2.8.4	Analisi northern blotting	80
2.7	Caratterizzazione Biochimica dei trasformanti	81
2.9.1	Preparazione delle Frazioni Proteiche da filtrati Colturali e da Micelio	81
2.9.2	SDS-PAGE	82
2.9.3	Analisi enzimatica di Glucanasi e Chitinasi	83
2.8	Caratterizzazione Fisiologica dei trasformanti	86
2.10.1	Saggi di competizione in <i>Vitro</i>	86
2.10.2	Saggi in <i>Vivo</i> con linee di Pomodoro	86
2.10.3	Microiniezione di filtrati Colturali in Piante	87
2.10.4	Estrazione di Fitoalessine da Foglia	87
2.11	Sequenziamento di Proteine	88
2.12	Purificazione dell'mRNA	88
2.13	Clonaggio del gene <i>hytra1</i> tramite PCR-RACE 3'	89

2.14	Clonaggio dei geni codificati per trasportatori ABC in <i>Trichoderma</i> spp	91
2.14.1	Amplificazione tramite PCR di frammenti genici codificati per trasportatori ABC	91
2.14.2	Eliminazione delle bande da gel eligazione nel vettore plasmidico pGEM-T Easy	92
2.14.3	Elettroforazione in cellule di <i>E. Coli</i> ed estrazione del DNA plasmidico	93
2.14.4	Sequenziamento ed analisi Blastx	93
2.15	Caratterizzazione molecolare per Tabc2	94
2.15.1	Analisi Southern blotting	94
2.15.2	Screening di libreria genomica	95
2.15.2.1	Determinazione del titolo della libreria	96
2.15.2.2	Screening della libreria	97
2.15.2.3	Estrazione del DNA dal lisato fagico	98
2.15.2.4	Analisi di restrizione del DNA fagico	99
2.16	Studi di Espressione	99
2.16.1	Condizioni di crescita	100
2.16.2	Estrazione di RNA	101
2.16.3	RT-PCR	101
2.16.4	Analisi northern blotting	101
3.	Risultati	102
3.1	Ottenimento dei trasformanti di <i>Trichoderma</i> spp	102
3.2	Caratterizzazione genetico-molecolare dei trasformanti	104
3.2.1	Analisi mediante PCR	104
3.2.2	Analisi Southern blotting	105
3.2.3	Analisi northern blotting	106
3.3	Caratterizzazione biochimica dei trasformanti	107
3.3.1	Analisi enzimatica dei trasformanti	109
3.4	Caratterizzazione fisiologica dei trasformanti	113
3.4.1	Saggi di competizione in <i>Vitro</i>	113

3.4.2	Saggi in <i>Vivo</i> con diverse linee di pomodoro	117
3.4.3	Microiniezione di filtrati Colturali in Pianta	121
3.4.4	Induzione di fitoalessine	122
3.5	Ricerca di geni Avr-like in <i>Trichoderma</i>	125
3.6	Isolamento dei frammenti genici Tabc1, Tabc2, Tabc3, Tabc4 codificanti per nuovi trasportatori ABC in <i>Trichoderma</i> spp	131
3.7	Studio delle omologie di sequenza dei frammenti genici Tabc1, Tabc2, Tabc3, Tabc4	132
3.8	Caratterizzazione genetico-molecolare di Tabc2	140
3.8.1	Southern blotting	140
3.8.2	Screening di una libreria genomica	141
3.8.3	Analisi della sequenza nucleotidica	142
3.8.4	Analisi della sequenza amminoacidica di Tabc2	144
3.8.5	Analisi di restrizione della sequenza nucleotidica di Tabc2	154
3.9	Studi di espressione	157
3.9.1	Effetti del trattamento con fungicidi	157
3.9.2	Effetti del trattamento con micelio di funghi patogeni e loro metaboliti secondari	159
4.	Discussione	164
5.	Bibliografia	183
6.	Ringraziamenti	210

1. INTRODUZIONE

La ricerca di metodi alternativi alla lotta chimica ai patogeni delle piante ha avuto negli ultimi anni un notevole impulso. La maggiore sensibilità dell'opinione pubblica alle problematiche di inquinamento ambientale, l'emergenza di popolazioni di organismi patogeni resistenti ai pesticidi chimici, la revoca dell'autorizzazione all'impiego di alcuni composti chimici, e non ultimo la sempre più crescente attenzione da parte di produttori e consumatori alla salubrità dei prodotti alimentari, ha stimolato la ricerca su strategie alternative da utilizzare per un'agricoltura sostenibile. L'impiego di microrganismi per la lotta biologica o in programmi di lotta integrata è stato esplorato già da un ventennio contro un vasto numero di patogeni di colture di interesse economico, come possibile alternativa ai presidi fitosanitari.

1.1 Lotta Biologica

Si definisce *lotta biologica* o *biocontrollo* “l'utilizzo di organismi naturali o modificati, di geni o prodotti genici, atti a ridurre gli effetti degli organismi indesiderati, e per favorire quelli utili all'uomo, alle coltivazioni, agli animali e ai microrganismi simbiotici”, includendo in questa definizione anche le pratiche di lotta agronomica e l'applicazione delle recenti tecniche di biologia molecolare per lo sviluppo di nuove biotecnologie (Accademia Nazionale della Scienza degli Stati Uniti -NAS, 1987).

L'obiettivo principale del controllo biologico è la riduzione, tramite uno o più organismi, della densità di inoculo o delle capacità patogeniche di un parassita, nel suo stato attivo o dormiente, riduzione che si verifica naturalmente o mediante la

manipolazione dei fattori ambientali, della pianta ospite, di un antagonista, oppure mediante l'introduzione massiva di uno o più antagonisti (Cook e Baker, 1982).

Il controllo biologico si realizza essenzialmente attraverso tre strategie principali:

1. contenimento della popolazione patogena mediante interventi sul suolo o sull'ambiente;
2. sfruttamento della resistenza della pianta ospite;
3. esclusione dell'infezione con l'uso di microrganismi antagonisti (Gabriel e Cook, 1991).

1.1.1 Contenimento della popolazione patogena mediante interventi sul suolo o sull'ambiente

Alcuni suoli sono naturalmente soppressivi per importanti agenti patogeni quali ad esempio *Fusarium oxysporum*, *Pythium debaryum*, *Phytophthora cinnamoni*, *Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis f. sp. tritici* (Agrios, 1998).

In tali suoli, la virulenza del patogeno viene attenuata o addirittura annullata, e la malattia risulta del tutto assente o appena manifesta (Cook e Baker, 1982).

La repressività di un suolo è legata sia a componenti abiotiche, quali la struttura e la composizione chimico-fisica del suolo, che biotiche. Queste ultime dipendono, in larga misura, dalla competizione tra i diversi microrganismi che popolano il terreno e, soprattutto dalla presenza di microrganismi antagonisti noti per la loro azione di biocontrollo. Tra questi ricordiamo funghi appartenenti ai generi *Trichoderma*, *Penicillium*, *Sporidesmium* e batteri appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Bacillus* e

Streptomyces. Ad esempio in un suolo colombiano soppressivo per la *R. solani* sono stati trovati alti livelli di *Trichoderma* spp. (10^8 propaguli/g di terreno rispetto a 10^3 propaguli/g normalmente presenti nei terreni conduttivi) (Chet e Baker, 1981). E' stato anche dimostrato che tuberi di patata cresciuti in suoli ammendati con terreni contenenti un ceppo di *Streptomyces*, antagonista di *Streptomyces scabies*, agente della scabbia comune dei tuberi di patata, sono risultati sostanzialmente liberi dal patogeno (Liu *et al.*, 1995).

In alcuni casi, è stato dimostrato che la presenza di alcuni organismi antagonisti svolge un ruolo fondamentale nella repressività del terreno, infatti, alla loro eliminazione corrisponde, la perdita di tale caratteristica. (Chet e Baker, 1981).

La repressività di un suolo può anche essere trasferita da un terreno all'altro: mescolando, ad esempio, una piccola quantità di terreno repressivo con uno non repressivo, si ottiene una riduzione di fitopatie causate da *F. oxysporum*, *P. cinnamomi* e *R. solani* ed altri patogeni fungini (Cook e Baker, 1983).

Accanto a tali azioni di trasferimento della repressività e di valorizzazione della popolazione microbica antagonista, le comuni pratiche agronomiche, quali la solarizzazione, la rotazione colturale, l'ammendamento, possono costituire un altrettanto efficace metodo di controllo delle malattie.

1.1.2 Resistenza della pianta ospite

Le piante sono costantemente minacciate da un vasto numero di potenziali microrganismi patogeni, inclusi batteri, funghi, virus e nematodi. Esse, pertanto, hanno sviluppato complessi meccanismi

di difesa per riconoscere e prevenire l'invasione degli agenti dannosi e contrastare l'insorgenza delle malattie.

Sostanzialmente le piante possono difendersi dalle malattie parassitarie tollerandole o bloccandone l'agente. La tolleranza è intesa come la capacità della pianta di sopportare la malattia, senza compromettere la produzione, e/o il patogeno, senza presentare evidenti manifestazioni di esso. La resistenza si identifica invece, con la capacità, da parte della pianta, di contrastare il parassita.

I meccanismi che determinano la resistenza possono essere di natura meccanica e biochimica e possono essere pre-esistenti all'infezione o indotti dal processo infettivo.

La resistenza meccanica pre-infezionale è legata alla presenza di strutture morfologiche, proprie della pianta, capaci di contrastare l'adesione, la penetrazione o la colonizzazione del patogeno. Ai fini della resistenza meccanica pre-infezionale, possono svolgere un ruolo di primaria importanza alcuni fattori quali lo spessore della cuticola e delle pareti cellulari, la presenza di tessuti sclerenchimatici e di strati suberizzati e lignificati, il contenuto in cera, la fuoriuscita di essudati, la presenza di tricomi e la struttura degli stomi.

Le difese di natura biochimica pre-infezionali sono legate al rilascio di essudati fungitossici e di sostanze ad attività antifungina, sintetizzate precedentemente al tentativo di infezione. Tra questi ritroviamo composti fenolici (acido caffeico, acido clorogenico, catecolo), glucosidi (saponine, glucosidi fenolici e cianogenici), lattoni insaturi, composti solforati, glucosinolati, accomunati dal fatto di essere prodotti del metabolismo secondario.

Ad ogni modo, la resistenza agli invasori potenzialmente aggressivi dipende dalla capacità di erigere delle difese attive post-

infezionali. In una pianta si possono verificare modificazioni morfologiche e strutturali, indotte dall'infezione, che impediscono o rallentano la penetrazione del patogeno (difese meccaniche post-infezionali), quali produzione di ormoni da ferita e di suberina, formazione di tulle o di gomme contenenti tannini, ispessimenti delle pareti sollecitate dal patogeno.

Le difese biochimiche post-infezionali sono legate invece alla secrezione di sostanze assenti prima dell'infezione oppure, presenti in quantità ridotte, come ad esempio i fenoli (attivi nella forma ossidata dalle fenolasi, fenolossidasi, perossidasi e polifenolossidasi), le fitoalessine, i sesquiterpeni, i ROS (specie reattive dell'ossigeno), le proteine PR (pathogenesis related proteins = proteine correlate alla patogenesi) ecc. I ROS, che si accumulano durante le reazioni incompatibili, possono distruggere le membrane cellulari, producendo perossidi lipidici e, nello stesso tempo, favorire reazioni che rafforzano le pareti cellulari. Hanno un ruolo diretto come molecole antimicrobiche e come molecole segnale per attivare la reazione di ipersensibilità e la ISR (resistenza sistemica indotta).

Le proteine PR sono proteine vegetali indotte da stress biotici e abiotici: esse si accumulano sia a livello intracellulare che negli spazi intercellulari, e comprendono enzimi (glucanasi, proteasi, perossidasi) inibitori di proteasi, proteine ricche in glicina o cisteina, osmotine e taumatine. Molte di esse hanno spiccata attività antimicrobica ad azione sinergica. Nell'ambito di questa famiglia di proteine risultano essere particolarmente interessanti chitinasi e glucanasi, enzimi che catalizzano rispettivamente l'idrolisi della chitina e dei β -glucani, principali costituenti della parete della maggior parte dei funghi fitopatogeni. Si ritiene che questi enzimi

siano responsabili della lisi dell'apice ifale, con conseguente inibizione della crescita fungina e del rilascio di sostanze che elicitano le risposte di difesa della pianta (Sahai e Manocha, 1993).

Una caratteristica comune della resistenza alle malattie è la risposta ipersensibile nella zona di infezione, caratterizzata da una morte rapida e localizzata di cellule al sito di attacco, al fine di evitare l'accesso ai nutrienti e limitare la proliferazione del patogeno. Tale reazione potrebbe essere considerata semplicemente un fenomeno di resistenza di tipo meccanico ma, in realtà, l'infezione viene bloccata anche nelle cellule lontane dal punto di attacco, poiché intervengono altri processi di resistenza biochimica post-infezionale. Infatti, a seguito di questa risposta localizzata, il tessuto distale la zona di infezione sviluppa una resistenza sistemica acquisita (SAR resistenza sistemica acquisita) nei confronti di successive infezioni da parte dello stesso o di altri patogeni. Questa "immunità" è caratterizzata dall'induzione di numerosi geni, spesso indicati come "geni SAR" e dall'attivazione di pathway metabolici di sintesi di svariati prodotti antimicrobici (es. fitoalessine) e produzione di proteine di difesa, incluse le proteine PR.

La SAR si verifica non solo quando la pianta è soggetta a infezioni patogene ma anche in seguito a disordini fisiologici, lesioni, o trattamenti con agenti chimici (acido salicilico, cloruro di mercurio, ossalato, acidi grassi insaturi o spermidina) (Harms, 1992). Può essere efficace contro diversi tipi di patogeni (batteri, funghi e virus) e, quando è attivata, può convertire l'interazione pianta-patogeno da compatibile ad incompatibile (Ryals *et al.*, 1996).

Negli ultimi anni, numerose linee di ricerca, basate sull'ottenimento di piante transgeniche, hanno mirato ad aumentare

Introduzione

la risposta di difesa della pianta, potenziandone l'arsenale antimicrobico oppure fornendole nuove armi di difesa contro l'attacco del patogeno. Tale strategia è stata possibile grazie all'uso di promotori, costitutivi od inducibili, per l'inserimento, in pianta, di geni di resistenza eterologhi od omologhi, isolati da altre piante o microrganismi, al fine di indurne i normali meccanismi di difesa localizzata o sistemica (Tab. 1).

<u>Gene codificante enzimi antimicrobici</u>	<u>Origine</u>	<u>attività/effetti</u>	<u>piante</u>
Chitinasi (chiA)	<i>Serratia marcescens</i>	Chitinasi antifungina. Resistenza a <i>Alternaria longipes</i> e <i>Rhizoctonia solani</i>	Tabacco
Chitinasi (chi1)	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Chitinasi coinvolta nell'autolisi. Resistenza a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Botrytis cinerea</i>	Tabacco
Endochitinasi (chit42)	<i>Trichoderma harzianum</i>	Chitinasi antifungina. Resistenza a <i>A. alternata</i> , <i>A. solani</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	Tabacco, patata, mela, petunia, uva
Chitinasi o Glucanasi	Varie piante	Resistenza a <i>R. solani</i> , <i>Phoma lingam</i> , <i>sclerotiorum</i> , <i>cinerea</i> , <i>P. infestans</i>	Patata, riso, tabacco, carota
Chitinasi+glucanasi	Riso, tabacco	Interazione sinergica. Resistenza a <i>Cercospora nicotinae</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	Tabacco, pomodoro
Lisozima	Umana, virus, e altri sorgenti	Attività litica sulle cellule del patogeno. Resistenza a vari batteri patogeni	Tabacco, patata
Enzimi che generano composti antimicrobici Glucosio-ossidasi	<i>Aspergillus niger</i>	Genera ROS e HR. Resistenza a <i>E. carotovora</i> , <i>P. infestans</i> . Resistenza a largo spettro produzione di fitoalessina.	Patata, pomodoro
Tossine e proteine di difesa tossina del cholera, subunità A	<i>Vibrio cholerae</i>	Antibatterico. Resistenza a <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tabaci</i>	Tabacco
Osmotica osmotina-like proteine che inattivano i ribosomi	Tabacco orzo, mais	Resistenza a <i>P. infestans</i> , <i>Pythium ultimum</i> resistenza a <i>R. solani</i>	Patata, tabacco

Tabella 1. Geni espressi in pianta che aumentano le risposte di difesa a patogeni (Lorito e Scala, 1999)

Introduzione

In questo campo uno degli approcci più innovativi è quello che mira ad alterare l'interazione molecolare ed i segnali di riconoscimento pianta-patogeno, al fine di ampliare il range di patogeni riconoscibili dalla pianta. Ciò si concretizza inserendo in pianta geni codificanti per fattori di avirulenza o per prodotti genici coinvolti nelle prime reazioni del riconoscimento (Tab. 2).

<u>gene codificante</u>	<u>origine</u>	<u>attività/effetto</u>	<u>pianta</u>
Avirulenza (avr9 info1)	<i>Cladosporium fulvum</i> <i>P. infestans</i>	Elicita HR. Resistenza a PVX	Tabacco, pomodoro
Virulenza (Ecp2)	<i>Cladosporium fulvum</i>	Elicita HR, resistenza a <i>C. fulvum</i>	Pomodoro
b-cryptogein	<i>cryptogea</i>	Elicita le risposte di difesa resistenza a largo spettro	Patata, tabacco
Batterio-opsina pompa protonica	<i>Halobacterium halobium</i>	Attiva SAR e LAR. Resistenza a virus, <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> e <i>P. infestans</i>	Tabacco e patata
Pecto liasi(PL3)	<i>Erwinia carotovora</i>	Attiva le risposte di difesa producendo elicitori da tessuti di pianta. Resistenza a <i>E. carotovora</i>	Patata
Oligo galatturonide liasi	<i>E. carotovora</i>	Degrada oligomero di zucchero in prodotti inattivi. Interferisce con i segnali e sopprime la patogenicità in patata nell'interazione con <i>E. carotovora</i>	Patata

Tabella 2: Geni microbici espressi in pianta, che attivano le risposte di difesa della pianta o proteggono dalle tossine patogene (Lorito e Scala, 1999).

1.1.3 Impiego di Agenti di Lotta Biologica

Sono stati individuati numerosi agenti di biocontrollo aventi azione antagonista, sia tra i funghi che tra batteri, virus, protozoi e nematodi capaci di ridurre l'incidenza di varie fitopatie e/o di favorire lo sviluppo della pianta (Tab. 3).

I meccanismi attraverso cui si esplica il controllo biologico sono molteplici ed includono l'inibizione del patogeno attraverso la produzione di composti antimicrobici (antibiosi); la competizione per nutrienti o siti di colonizzazione; l'inattivazione di fattori di germinabilità del patogeno presenti su semi o radici; l'inibizione di fattori di patogenicità, quali ad esempio tossine ed enzimi, prodotti e rilasciati dall'agente patogeno; il micoparassitismo attraverso la produzione di una vasta gamma di enzimi degradativi la parete cellulare. Altri meccanismi, per lo più indiretti, includono tutti quegli aspetti che producono variazioni morfologiche e biochimiche nella pianta ospite, a seguito dell'interazione con l'agente antagonista, aumentandone la tolleranza a stress biotici e abiotici. Inoltre, negli ultimi anni, è emersa la capacità di alcuni agenti antagonisti di modulare i meccanismi di difesa della pianta, inducendo l'attivazione della risposta ipersensibile (HR) e della resistenza sistemica indotta (ISR).

Nessuno di questi meccanismi esclude l'altro ed è anzi più frequente che l'agente di biocontrollo espliciti la sua attività antagonista impiegando i diversi metodi di azione contemporaneamente. Un esempio si ha nell'applicazione di un ceppo non patogeno di *Streptomyces* per contrastare *Streptomyces scabies*, agente della scabbia della patata (*Solanum tuberosum L.*) (Ryan and Kinkel, 1997). In questo caso, infatti, il controllo sembra essere realizzato sia attraverso la produzione di antibiotici che attraverso la competizione per i nutrienti presenti nella rizosfera. Largamente impiegato in frutticoltura è il ceppo modificato di *Agrobacterium radiobacter* K84, produttore dell'antibiotico agrocina 84, tossico per *A. tumefaciens*, agente dei tumori radicali in diverse piante arboree. Sebbene la produzione dell'agrocina 84 è

il meccanismo d'elezione nel processo di biocontrollo mediato da *Agrobacterium*, altri fattori giocano un ruolo importante, come la l'abilità di colonizzazione delle radici, la competizione per i nutrienti o per i siti attaccati e la produzione di agenti di inibizione addizionale (Peñalver *et al.*, 1994; Peñalver *et al.*, 1999 McClure *et al.*, 1998).

Tra le numerose sostanze antibiotiche che vengono prodotte da funghi e batteri alcune sono direttamente coinvolte nei meccanismi di controllo delle malattie delle piante. Ad esempio la gliovirina e la gliotossina prodotte da *Trichoderma virens* (Bisset 1991) sono attive contro *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* (Wilhite *et al.*, 1994), mentre la cheatomina prodotta dal genere *Chaetomium* è risultata responsabile del controllo di *Venturia inaequalis*, agente della ticchiolatura del melo (Davis *et al.*, 1992). È stato recentemente dimostrato (Bull *et al.*, 1998) che la siringomicina SR_E, una tossina capace di alterare le membrane plasmatiche, è il metabolita principale responsabile dell'attività di biocontrollo in *Pseudomonas syringae*, attivo ingrediente di diverse formulazioni di biofungicidi commercialmente disponibili.

La competizione per il ferro in *Pseudomonas* spp. è stata intensamente studiata ed è stato chiaramente dimostrato il ruolo di un sideroforo prodotto da diversi ceppi, nel controllo di diverse specie di *Pythium* e *Fusarium* (Loper e Buyer, 1991; Duijff *et al.*, 1993). I composti siderofori presentano una elevata affinità per il Fe³⁺, lo chelano, rendendolo indisponibile per gli altri organismi limitandone così la crescita e lo sviluppo.

Competizione per carbonio, azoto, ferro, sembrano essere associati al biocontrollo di *Fusarium* spp. da parte di ceppi non

patogeni di *Fusarium* e *Trichoderma spp.* (Mandeeel e Baker, 1991; Couteadier, 1992).

Molti studi hanno messo in evidenza una importante relazione tra incremento della colonizzazione della rizosfera da parte di ceppi non patogeni o ipovirulenti, e soppressione della malattia. Di fatti esiste una notevole diversità nelle popolazioni di funghi fitopatogeni per quanto riguarda il loro livello di virulenza. L'uso di ceppi ipovirulenti è di notevole impiego nelle metodologie di controllo biologico, data la capacità di tali ceppi di competere con quelli più virulenti nell'ecosistema pianta. Questo è risultato evidente per un ceppo ipovirulento di *Rhizoctonia solani*, particolarmente efficace nel controllare l'isolato patogeno di *R. solani* (Herr, 1995) e diverse altre specie di funghi inclusi *Phialophora spp.*, *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* (Kirk e Deacon, 1997; Shivanna *et al.*, 1996). Inoltre il ceppo non patogeno di *Fusarium oxysporum* è risultato efficace nel controllare il ceppo patogeno di *F. oxysporum* su una varietà di colture (Eparvier e Alabouvette, 1994).

Anche i funghi micorrizici sono interessanti candidati al controllo biologico in virtù della loro associazione obbligata con le radici. Essi infatti colonizzando l'apparato radicale possono impedire l'attacco del patogeno al sito di infezione. Recenti studi sulle interazioni pianta-funghi micorrizici suggeriscono altri importanti fattori implicati nel biocontrollo. Infatti è stato dimostrato che la formazione delle micorrizie stimola nella pianta una resistenza sistemica indotta (ISR) oltre a promuoverne la crescita e indurre importanti variazioni nella morfologia della radice (Pozo *et al.*, 2002).

Nel caso dei funghi, il ben conosciuto fenomeno del micoparassitismo sembra essere un meccanismo chiave nel processo di biocontrollo e prevede un' azione parassitaria diretta, da parte del fungo antagonista, ai danni del fungo patogeno.

Esempi di funghi iperparassiti sono numerose specie di *Trichoderma*, efficaci per il controllo di importanti funghi fitopatogeni quali *Botrytis spp.*, *Fusarium spp.*, *Pythium spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Sclerotinia spp.*

Il parassitismo di *Trichoderma* è un fenomeno di tipo necrotropico che conduce alla distruzione e morte del fungo ospite. In questo processo partecipano attivamente enzimi litici, quali chitinasi, glucanasi e proteasi, capaci di degradare la parete cellulare consentendo, quindi, la completa colonizzazione del fungo ospite (Elad *et al.*, 1982; Haran *et al.*, 1994).

Tra gli altri funghi micoparassitici ricordiamo quelli appartenenti ai generi *Chaetomium*, *Coniothirium*, *Gliocladium*, *Pythium* e *Fusarium* (Fig.1).

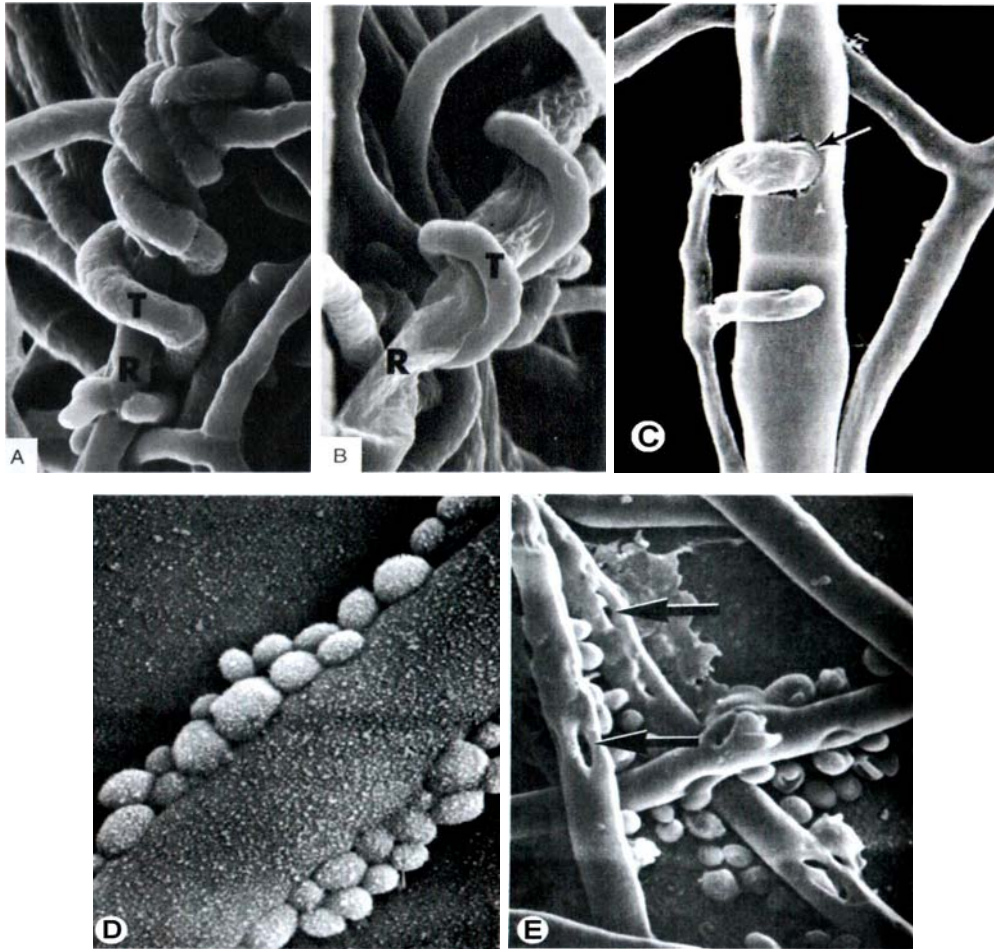


Fig. 1 Immagini al microscopio elettronico di alcuni esempi di micoparassitismo. (A) Effetto della parassitizzazione di *Trichoderma harzianum* (T) su *Rhizoctonia solani* (R) dopo 2 giorni e (B) dopo 6 giorni; (C) ifa di una specie non patogena di *Pythium* che penetra un'ifa di *Phytophthora*; (D) il lievito *Pichia guilliermondii* su un'ifa di *Botrytis* e (E) su un'ifa di *Penicillium*; (foto da Agrios, 1998).

Introduzione

Tabella 3: Esempi di microrganismi usati per il biocontrollo

Microrganismi	Composti o meccanismi	Patogeni controllati
<u>Batteri :</u>		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	diacetilfluoroglucinolo, cianuro di idrogeno	<i>Thielaviopsis basicola</i> , altri
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Oomicina e fioluteorina, siderofori	<i>Pythium ultimum</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Siderofori, fenazina-1- acido carbossilico, acido antranilico	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Pirolintrina	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Mucor piriformis</i>
<i>A. radiobacter</i> K84	Agrocina 84	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>Serratia marcescens</i>	Enzimi chitinolitici	Vari
<i>Enterobacter cloacae</i>	Inattivazione della germinazione	<i>Pythium ultimum</i>
<u>Funghi :</u>		
<i>Trichoderma virens</i>	Gliovirina, gliotossina	<i>Pythium ultimum</i>
<i>Trichoderma harzianum</i>	Peptaiboli	<i>Botrytis cinerea</i> , altri
<i>Trichoderma harzianum</i>	Competizione per i nutrienti e lo spazio	Vari
<i>Trichoderma spp.</i>	Micoparassitismo	Vari
<i>Verticillium biguttatum</i>	Micoparassitismo	<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Chaetomium globosum</i>	Micoparassitismo	<i>Alternaria spp.</i>
<i>Chaetomium globosum</i>	Chaetomina ed altri antibiotici	<i>Pythium ultimum</i> , batteri che colonizzano i semi
<i>Sporidesmium sclerotivorum</i>	Micoparassitismo	<i>Sclerotium spp.</i>

1.2 Strategie applicate per lo studio dei meccanismi di biocontrollo

L'applicazione delle moderne tecniche biochimiche e di biologia molecolare costituisce un importante strumento per la comprensione dei meccanismi che regolano i processi di biocontrollo. Tale comprensione risulta fondamentale per una corretta gestione dei microrganismi antagonisti in strategie di lotta biologica. Recenti studi hanno permesso di identificare geni e prodotti genici direttamente coinvolti nel controllo di importanti fitopatie. Grande enfasi è stata data alla caratterizzazione ed al clonaggio di geni codificanti per enzimi extracellulari quali chitinasi e glucanasi che rivestono enorme importanza nei meccanismi di biocontrollo. Diversi funghi antagonisti sono stati esaminati sotto questo aspetto ma il lavoro è stato focalizzato soprattutto sul genere *Trichoderma*.

La capacità di *Trichoderma spp.* di produrre enzimi degradativi della parete cellulare fungina (CWDEs: cell wall degrading enzymes) è nota da diverso tempo, ma solo recentemente il sistema chitinolitico è stato analizzato a fondo ed è stato studiato il ruolo di alcuni dei principali enzimi (Lorito, 1998).

Diversi geni, codificanti per tali molecole, sono stati clonati e caratterizzati e la produzione di mutanti difettivi o che sovraesprimono geni codificanti per essi, ha permesso l'acquisizione di fondamentali informazioni circa la loro funzione nel biocontrollo. Ad esempio, trasformanti di *T. longibrachiatum*, esprimenti copie multiple del gene *agl1*, codificante per una β -1,4 endoglucanasi (Migheli *et al.*, 1998) sono risultati più efficienti, rispetto al ceppo selvatico, nel contrastare l'attacco di *Pythium*

ultimum su cetriolo, suggerendo il diretto coinvolgimento di questo enzima nel controllo di tale patogeno.

Similmente, trasformanti di *T. harzianum* che overproducono una proteinasi codificata dal gene *prb1* risultano più efficienti nel controllo del marciume al colletto sul cotone causato da *R. solani*.

La recente disponibilità di mutanti, in cui i promotori di geni coinvolti nel biocontrollo regolano l'espressione di geni "reporter" (green fluorescent protein = GFP), permettono di studiare l'induzione e di chiarire le modalità di attivazione per molti di essi (Inbar & Chet, 1991).

La "green fluorescent protein", codificata dal gene denominato *gfp* di *Aequorea victoria*, è un potente marcatore biologico che, diversamente da altri non richiede nessun substrato o cofattore addizionale per la rilevazione. Ogni singola cellula esprimente GFP può essere facilmente rilevata attraverso un microscopio a fluorescenza. Inoltre, la proteina GFP non è né invasiva né distruttiva e può quindi essere utilizzata nelle cellule viventi per monitorare l'espressione genica e la localizzazione di alcune proteine.

In *T. atroviride* l'espressione dei geni di biocontrollo *ech42* e *nag1* è stata associata a quella del gene "GFP" in un sistema "reporter". Per questo, il mutante sintetico del gene codificante per la "GFP" (SGFP-TYG; Sheen *et al.*, 1995) è stato espresso in *T. atroviride* (P1), sotto il controllo del promotore costitutivo *pki1* (piruvato chinasi di *T.reesei*) e dei promotori inducibili dell'endochitinasi *ech42* e dell'esochitinasi (N-acetilglucosaminidasi) *nag1* (Zeilinger *et al.*, 1999). L'utilizzo dei mutanti ottenuti, ha permesso di studiare il meccanismo di attivazione di questi enzimi in *Trichoderma* durante l'interazione

parassita-ospite (Kullinig *et al.*, 2000), consentendo anche di identificare molecole bioattive che elicitano l'espressione di geni coinvolti nel processo di biocontrollo (Zelinger *et al.*, 1999). A tale proposito è stato evidenziato che la digestione delle pareti cellulari di funghi fitopatogeni, con diverse combinazioni di enzimi chitinolitici e glucanolitici purificati da *Trichoderma*, rilascia prodotti che inducono l'espressione di geni quali *ech42* e *nag1* e conseguentemente l'attività micoparassitica in genere (Kubicek C.P. *et al.*, 2001). Le innumerevoli evidenze, relative all'importante ruolo che gli enzimi litici rivestono nel biocontrollo, hanno suggerito l'espressione, costitutiva o inducibile, dei geni che li codificano in altri agenti al fine di migliorarne l'attività antagonista. Così, recenti studi hanno mostrato una forte interazione sinergica tra gli enzimi degradativi la parete cellulare prodotti da *Trichoderma* e diversi agenti di biocontrollo, come ad esempio *Enterobacter cloacae* (Lorito *et al.*, 1993). Inoltre, è stato dimostrato che gli effetti degli antibiotici prodotti da *Pseudomonas* spp, su varie colture, possono essere potenziati dall'aggiunta di CWDEs di *Trichoderma* (Lorito *et al.*, 2000).

L'analisi conoscitiva del sistema antifungino di *Trichoderma* risulta di fondamentale importanza anche per le nuove strategie di trasformazione delle specie vegetali di importanza agronomica. Gli enormi avanzamenti nelle tecnologie per l'identificazione, l'isolamento, ed il trasferimento genico hanno, di fatto, consentito l'espressione in pianta di geni esogeni utili nel miglioramento della resistenza a varie fitopatie, con minimi effetti sulle proprietà intrinseche delle colture vegetali. Molto spesso si realizza l'inserimento di geni che risultano assenti in pianta o più potenti in

attività biologica, rispetto ai loro equivalenti presenti nel genoma vegetale.

Ad esempio, geni codificanti chitinasi vegetali sono stati impiegati, per molto tempo, per la trasformazione di diverse colture ottenendo però livelli inadeguati di resistenza a malattie. La recente espressione di chitinasi fungine in pianta sembra aver superato con successo i limiti delle chitinasi vegetali, sia nel livello che nello spettro di resistenza a patogeni fungini. Ad esempio, Lorito *et al.* (1998) hanno effettuato la trasformazione di piante di tabacco e di patata, con il gene dell'endochitinasi CHIT42 del fungo di biocontrollo *T. harzianum* aumentando la capacità di biocontrollo delle due specie vegetali, nei confronti di importanti patogeni terricoli e fogliari come *R. solani*, *B. cinerea*, *A. solani* e *A. alternata*. L'enorme successo ottenuto può essere dovuto al fatto che le chitinasi di funghi micoparassitici, a differenza di quelle di origine vegetale, sono capaci di lisare, non solo l'estremità ifale dove la chitina non è ancora completamente cristallizzata, ma anche le pareti delle ife mature, dei conidi, delle clamidiospore e degli sclerozi dove la chitina raggiunge livelli di cristallizzazione maggiore ed è quindi più resistente alla digestione enzimatica.

Particolarmente interessante è il sinergismo osservato tra questi enzimi e alcuni fungicidi di sintesi, in special modo con i composti inibitori della sintesi degli steroli, quali fusilazolo e miconazolo, comunemente utilizzati per il controllo di diverse malattie fungine. In alcuni casi, il livello di sinergismo risulta particolarmente elevato, suggerendo l'applicazione di queste interazioni tra composti, sia per migliorare la resistenza alle malattie delle piante (Woo *et al.*, 1999) che per la produzione di nuovi formulati anticrittogamici (Lorito *et al.*, 1994). Interazioni

fortemente sinergiche nell'attività antifungina sono state trovate con numerosi altri composti, comprese alcune fosfolipasi e diverse proteine PR tra cui l'osmotina (Lorito *et al.*, 1996 b).

L'applicazione delle nuove strategie di ingegneria genetica ed il progressivo avanzamento nella comprensione delle basi molecolari che regolano i meccanismi di biocontrollo possono fornire nuovi approcci per il miglioramento dell'attività antagonistica di questi funghi. Recentemente, ad esempio, è stato ottenuto un significativo miglioramento dell'attività di biocontrollo di *T. atroviride* ceppo P1, attraverso l'espressione eterologa del gene *gox* di *Aspergillus niger*, codificante per una glucosio ossidasi, sotto il controllo del promotore inducibile *nag1* di *Trichoderma* stesso (Lorito *et al.*, 2001).

Diversi studi hanno dimostrato che la glucosio ossidasi è coinvolta nel controllo di diversi batteri e funghi e sembra avere un ruolo attivo nei meccanismi di biocontrollo in *Talaromyces flavus* (Mach *et al.*, 1999), oltre ad indurre meccanismi di difesa in pianta.

I ceppi trasformanti che mostrano un'alta attività GOX mostrano un incremento dell'attività di biocontrollo nei confronti di *R. solani*, *B. cinerea*, *P. ultimum*, *S. sclerotiorum*. Inoltre, studi preliminari suggeriscono l'induzione di resistenza sistemica in piante di fagiolo, i cui semi sono stati trattati con spore dei trasformanti GOX (Lorito *et al.*, 2001).

Il perossido di idrogeno ed altre specie reattive dell'ossigeno sembrano avere diversi ruoli nelle risposte di difesa della pianta, come, ad esempio, quello di indurre la reazione di ipersensibilità (HR) (Lamb e Dixon, 1997), di esercitare un'attività antimicrobica diretta, di diffondere il segnale in pianta per l'attivazione dei geni di

difesa vegetali e di rinforzare la parete della cellula vegetale (Bolwell, 1999).

1.3 INTERAZIONE PIANTA-MICRORGANISMI

Il successo del controllo biologico richiede non solo lo studio del potenziale agente antagonista, ma anche la conoscenza delle complesse interazioni ecologiche che si instaurano tra la pianta, l'agente patogeno, la microflora naturale e l'ambiente in genere. L'interazione della pianta con la comunità microbica del suolo, ad esempio, è un'importante componente dell'ecosistema. Molti microrganismi terricoli, infatti, esercitano una funzione benefica per la pianta: essi sostengono la decomposizione e la mineralizzazione dei residui organici, facilitano l'assorbimento dei nutrienti, promuovono la crescita, fissano l'azoto, e possono proteggere le piante dall'attacco dei patogeni.

1.3.1 Interazione pianta-microrganismi benefici

Tra le componenti radicali e le popolazioni microbiche presenti nella rizosfera possono instaurarsi molteplici tipi di interazioni tra cui quelle simbiotiche. Si definisce simbiosi, l'interazione tra due differenti forme viventi che può assumere un carattere reciprocamente od unilateralmente positivo e/o negativo o non avere ripercussione alcuna sulle due specie. La simbiosi mutualistica è quel tipo di associazione tra due organismi, necessaria alla sopravvivenza di entrambi, e dalla quale entrambi ricavano un reciproco vantaggio. Invece la proto-cooperazione è pur

sempre un'associazione dalla quale entrambi i contraenti ottengono un vantaggio ma che non risulta necessaria alla loro sopravvivenza.

Popolazioni batteriche e fungine presenti nella rizosfera possono realizzare tutte e due i tipi di interazione con le aree radicali. Per esempio, i funghi micorrizici, sia AM (endomycorricce arbuscolari) che ECM (ectomicorricce) od i batteri azotofissatori (rizobi), instaurano delle simbiosi mutualistiche con le radici, ottenendo dalla pianta un flusso costante di substrati carboniosi e cedendo in cambio, i primi un più efficace assorbimento di nutrienti dal suolo, soprattutto quando vi sono stati di carenza trofica, ed i secondi parte dell'azoto atmosferico "fissato" in composti organici. In entrambe questi tipi di associazioni le cellule radicali e microbiche entrano in intimo contatto stabilendo reciproche relazioni chimiche e fisiche. Ad esempio le specie di *Rhizobium* infettano e formano noduli su ospiti specifici tra le leguminose attraverso un complicato processo che sembra coinvolgere alcune molecole di riconoscimento prodotte dalla pianta ospite, tipo lectine, e la connessione del batterio con i siti specifici dei peli radicali. Dopo l'attacco microbico, il pelo radicale si avvolge e viene penetrato dal batterio il quale induce la formazione di un filamento di infezione. I batteri si moltiplicano all'interno delle cellule ospiti e si sviluppano in forme rigonfie e ramificate dette batteroidi che possono ridurre l'azoto atmosferico ad ammonio. A completamento di questo processo, vengono prodotte delle proteine nodulari specifiche dell'ospite, come la leghemoglobina e la nodulina (Lee *et al.*, 1995; Oldroyd e Long, 2003).

Un fenomeno invece, estremamente frequente tra piante prative, arbustive ed arboree, è rappresentato dallo sviluppo di associazioni micorriziche. Ciò soprattutto per il notevole

incremento che i funghi (sia AM che ECM) conferiscono alle radici nell'assunzione di nutrienti, quando questi sono presenti in condizioni limitanti, e quindi in concentrazioni che potrebbero produrre stress e disfunzioni alle componenti simbiotiche vegetali. La presenza della rete fungina che si sviluppa tutt'intorno al volume radicale e tra radici contigue, produce un ulteriore ambiente definito "micorrizosfera", soprattutto nel caso dei funghi ECM caratterizzati da una fitta e complessa rete di ife extraradicali. Inoltre essendo i funghi sede di un intensa attività di traslocazione di composti fotosintetizzati da parte delle piante, ed avendo, soprattutto i funghi ECM un turnover molto elevato, influenzano la distribuzione delle popolazioni microbiche che tendono ad addensarsi intorno ad essi piuttosto che alle radici (Fogel ed Hunt 1979). Questo processo comporta quindi una sorta di protezione delle aree radicali dall'attacco di microrganismi patogeni terricoli come nematodi, funghi e batteri fitopatogeni (Harley e Smith, 1983). È stato dimostrato, inoltre, che la formazione delle micorrize induce nella pianta una resistenza sistemica (ISR) (Pozo *et al.*, 2002).

In altre circostanze, tra microflora e radici possono stabilirsi delle interazioni indirette, senza contiguità o compenetrazione fisica. È il caso di quelle popolazioni microbiche presenti nella rizosfera che rilasciano agenti chelanti dei nutrienti sottraendoli ad altre popolazioni di microrganismi e veicolandoli, preferenzialmente, verso le aree radicali, oppure di batteri che rilasciano sostanze, prevalentemente ormoni, capaci di stimolare il metabolismo delle cellule radicali. Particolarmente interessante è l'interazione realizzata con la pianta dai PGPR (plant-growth-promoting rhizobacteria), ovvero batteri benefici non simbiotici che popolano la rizosfera; con questo termine vengono comunemente

indicati batteri appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Serratia*, *Azospirillum* e *Bacillus*. I PGPR interagiscono con la pianta conferendo caratteristiche positive all'ospite, in particolare un aumento della crescita delle radici e dell'intera pianta e l'inibizione di alcuni patogeni vegetali presenti nel suolo, ma non sono capaci di infettare e invaderne i tessuti.

Il vantaggio di tali popolazioni è quello di usufruire del flusso di composti carboniosi associato alla rizodeposizione, dovendo comunque competere, per esso, con tutti gli altri microrganismi che colonizzano la rizosfera. Alcuni componenti della microflora che popolano la rizosfera producono, infatti antibiotici che ostacolano la colonizzazione radicale ad opera di specie parassite, impedendo un danno strutturale e funzionale delle radici.

Altri funghi benefici che popolano la rizosfera sono i funghi decompositori, i quali sono in grado di metabolizzare e degradare residui vegetali, contribuendo pertanto al riciclo dei nutrienti. Essi metabolizzano rapidamente i contenuti cellulari, completando il loro ciclo biologico entro pochi giorni dalla morte della pianta. Alcuni funghi decompositori sono in grado di metabolizzare anche composti vegetali molto resistenti, come le emicellulose e la cellulosa (Alexander, 1971).

1.3.2 Interazione pianta-patogeno

Una delle più comuni forme di resistenza esibita da ogni specie di pianta contro centinaia di potenziali patogeni è “la resistenza del non ospite”. Questa forma di resistenza prescinde dallo specifico riconoscimento dell'agente patogeno e sembra dipendere da un complesso controllo genetico, coinvolgendo una molteplicità di

fattori di difesa non specifici, sia costitutivi che inducibili, considerati come parte della resistenza “basale” della pianta. “La resistenza del non ospite” è diversa dalla “resistenza dell’ospite” che è espressa da un genotipo di una pianta, appartenente ad una specie ospite, normalmente suscettibile ad una data razza di microrganismi patogeni. In questo caso, la pianta riconosce specificamente l’agente patogeno e attiva tutta una serie di meccanismi di difesa che inducono alla resistenza.

La resistenza dell’ospite è spesso controllata da un singolo gene di resistenza (*R*) il cui prodotto interagisce direttamente od indirettamente con un elicitore specifico del patogeno, codificato da un gene definito di avirulenza (*avr*) (Hammond-Kosack and Jones, 1996). In questo caso, l’interazione tra pianta ospite (resistente) e patogeno risulta incompatibile. Se i geni *R* e/o *Avr* sono assenti o non funzionali, l’interazione tra l’ospite (resistente) e il patogeno (virulento) è compatibile, e determina sviluppo della malattia.

La resistenza dell’ospite è stata spiegata da Flor (1942; 1971) con la teoria gene-per-gene secondo la quale, nelle interazioni incompatibili, per ciascun gene che conferisce virulenza (patogenicità) al patogeno c’è un corrispettivo gene di resistenza, nella pianta ospite, che conferisce resistenza al patogeno, e viceversa. In questo caso, il gene di virulenza diventa un gene di “avirulenza”, perché la sua presenza impedisce lo sviluppo della malattia. Il riconoscimento, diretto od indiretto, del prodotto di un gene di avirulenza del patogeno (*Avr*), da parte del prodotto di un corrispettivo gene di resistenza di pianta (*R*), è la causa dell’attivazione dei meccanismi di resistenza dell’ospite.

Questo riconoscimento può essere associato alla reazione di ipersensibilità (HR), che consiste in una rapida morte delle cellule

dell'ospite localizzata presso il sito di penetrazione del patogeno. Questo processo presenta delle analogie con quello della morte cellulare programmata nei mammiferi (PCD) (Heath, 2000).

L'HR è anche associata all'induzione di risposte di difesa generalizzate, come lignificazione, rinforzamento della parete cellulare, deposizione di callosio, accumulo di fitoalessine e trascrizione di geni che codificano per proteine PR, che prevengono l'ulteriore diffusione del patogeno (Lamb, 1994).

1.3.2.1 Geni di resistenza e geni di avirulenza

Diverse proteine, codificate dai geni di resistenza sono state clonate da differenti specie di piante (*Arabidopsis*, lino, riso, tabacco e pomodoro) e possono conferire resistenza contro virus, batteri, funghi e nematodi (Takken and Joosten, 2000). Tali proteine presentano molti caratteri comuni e possono essere classificate, in base ai domini strutturali e alla localizzazione citoplasmatica, in sei classi principali (Hammond-Kosack *et al.*, 1997).

Tre di queste classi sono caratterizzate da sequenze ripetute, ricche in leucina (LRRs) domini, questi, coinvolti nell'interazione proteina-proteina. Diverse evidenze inducono a credere che queste regioni siano i principali fattori implicati nella specificità del riconoscimento del patogeno (Martin, 1999).

Una prima classe di proteine LRRs, probabilmente quella che racchiude la maggior parte delle proteine codificate dai geni finora clonati, può essere suddivisa ulteriormente in due subclassi. Queste ultime hanno entrambe localizzazione citoplasmatica e un sito di legame per i nucleotidi (NB)-LRRs ma si differenziano per la presenza all'N-terminale o di un dominio TIR (TIR-NB-LRR), che

presenta omologia di sequenza con il recettore *Toll* di *Drosophila* e con il recettore dell'*interleuchina-1* di mammifero, o di un dominio "coiled-coil" (CC-NB-LRR) che, probabilmente, contribuisce alla dimerizzazione delle proteine (Hammond-Kosack and Jones, 1997). Sia le proteine TIR-NB-LRR che CC-NB-LRR, conferiscono resistenza ad una larga varietà di patogeni inclusi virus, batteri, funghi, nematodi ed insetti.

Le altre due classi di proteine LRRs sono legate alla membrana plasmatica da un'ancora transmembrana (LRRs-TM) e presentano i domini LRRs localizzati a livello extracitoplasmatico. Le due classi si differenziano per la presenza, in una di esse, di un residuo chinamico localizzato nel citoplasma (LRRs-TM-Kinase). Le proteine LRRs-TM, sono coinvolte nella resistenza a funghi e nematodi; ne sono un esempio le proteine Cf di pomodoro che conferiscono resistenza ai ceppi di *Cladosporium fluvum* recanti i corrispondenti geni *avr* (Joosten and De Wit, 1999).

Le LRR-TM-Kinasi conferiscono resistenza ai batteri. Ad esempio la proteina del riso Xa21 conferisce resistenza a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Song *et al.*, 1995).

Una classe distinta di proteine citoplasmatiche è stata identificata in pomodoro. Si tratta del prodotto del primo gene di resistenza clonato *pto* che conferisce resistenza nei confronti di *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, recante il corrispondente gene *AvrPto*. Pto è membro di una piccola famiglia di proteine serine-treonine-chinasi che include anche la proteina chinasi Fen. Le proteine Pto e Fen per essere attive richiedono l'intervento della proteina PRF che, analogamente alle proteine di resistenza appartenenti alla prima classe, presenta una regione LRRs e un dominio NB.

La quinta classe di proteine di resistenza è invece rappresentata dal prodotto del gene *RPW8* di *Arabidopsis*. Si tratta di una piccola proteina di membrana, con un dominio citoplasmatico di tipo “coiled-coil”, e conferisce resistenza a *Erysiphe cichoracearum* (fig. 2) (Xiao *et al.*, 2001b)

Alla sesta classe appartengono le proteine codificate dai geni di resistenza *Ve* di pomodoro, che conferiscono resistenza a *Verticillium dhalie* (Kawchuk *et al.*, 2001). I due geni correlati, *Ve1* e *Ve2*, codificano per glicoproteine transmembrana contenenti un dominio LRR extracellulare e, o un dominio a cerniera di leucina (LZ) o una sequenza peptidica Pro-Glu-Ser-Thr (PEST). Il dominio LZ può facilitare la dimerizzazione delle proteine, attraverso la formazione di strutture “coiled-coil”, mentre la sequenza PEST è spesso implicata nella compartimentalizzazione delle proteine.

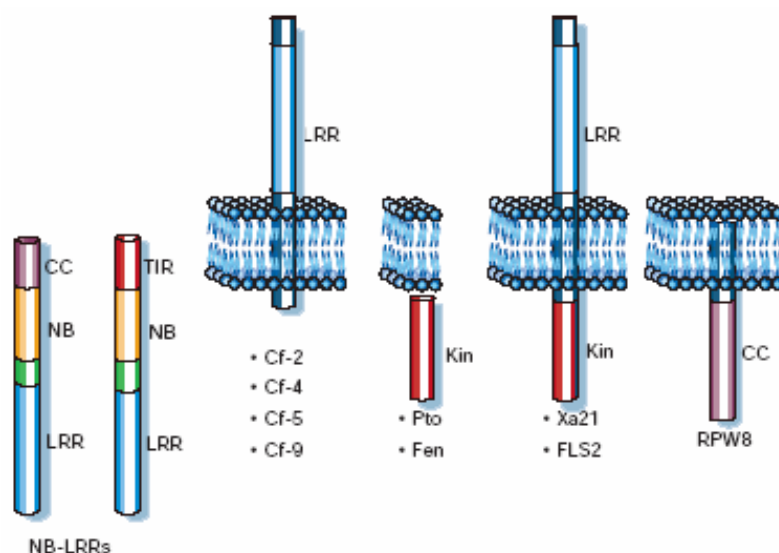


Fig. 2. Rappresentazione della localizzazione e della struttura di cinque classi di proteine codificate da geni di resistenza in pianta.

L'omologia nella sequenza e nell'architettura strutturale delle proteine codificate dai geni di resistenza, suggerisce che queste,

oltre alla funzione implicata nei meccanismi di difesa, possono svolgere altre importanti funzioni. È stato ipotizzato che esse possano essere direttamente coinvolte nella regolazione di diversi processi fisiologici. In particolare, l'omologia di sequenza dei geni di R, suggerisce che i loro prodotti rappresentano versatili co-recettori molecolari di diversi ligandi come monomeri, dimeri o eteromeri, assumendo una funzione analoga a quella verificata nei mammiferi per i recettori dei fattori di crescita (Heldin, 1995).

Diversamente dalle proteine di resistenza, i prodotti dei geni di avirulenza presentano poche caratteristiche comuni (Van 't Slot e Knogge, 2002).

Il fatto che molti geni *Avr* siano mantenuti in una popolazione di organismi patogeni, suggerisce che i loro prodotti in aggiunta al ruolo di fattori di avirulenza abbiano una funzione benefica per il patogeno stesso. È ormai opinione comune che i prodotti dei geni *Avr* siano “bifunzionali” e svolgano un ruolo nella virulenza del patogeno (Gabriel, 1999; Kjemtrup *et al.*, 2000; Van 't Slot e Knogge, 2002; White *et al.*, 2000). Le proteine AVR possono intergere con specifiche molecole della pianta, definite “target di virulenza”, che possono, ad esempio, essere implicate nel metabolismo o nei meccanismi di difesa della pianta. Da questa interazione potrebbe risultare la soppressione dei meccanismi di difesa nell'ospite o un miglioramento nella disponibilità di nutrienti per il patogeno (Van der Biezen a Jones, 1998).

Tuttavia, una chiara funzione biologica di questi elicitori proteici è stata determinata solo per un numero limitato di essi (Laugè and De Witt, 1998; Van't Slot and Knogge, 2002). Il gene *Avr-pita*, del fungo *Magnaporthe grisea*, codifica per una metalloproteasi (Orbach *et al.*, 2000), mentre la proteina di

avirulenza NIP1 di *Rhynchosporium secalis* stimola l'attività H⁺-ATPasi durante il processo patogenetico (Welvesiep *et al.*, 1993). Per il gene *Avr9* è stata ipotizzata una possibile funzione nel metabolismo dell'azoto (Van den Ackerveken *et al.*, 1994).

1.3.2.2 Percezione dei prodotti dei geni *Avr* da genotipi di piante resistenti

Il modello recettore-ligando che prevede una diretta interazione tra i geni di resistenza e quelli di avirulenza, riflette la più semplice interpretazione della teoria gene-per-gene proposta da Flor (1942). Tuttavia, la diretta interazione fisica è stata solo dimostrata per *Pto* di pomodoro e *AvrPto* di *Pseudomonas syringae* (Tang *et al.*, 1996) e per *Pita* di riso e *Avr-Pita* di *M. grisea* (Jia *et al.*, 2000). In ogni caso, l'attivazione dei meccanismi di difesa mediati da *Pto* richiede il coinvolgimento della proteina NB-LRRs codificata dal gene *Prf* (Salmeron *et al.*, 1996). Per cui, l'intervento di un co-recettore sembra essere fondamentale per mediare pathways di traduzione del segnale che attivano le risposte di difesa. L'interazione tra proteine di resistenza (R) e co-recettori potrebbe anche essere richiesta per formare complessi che mediano il riconoscimento dei prodotti dei geni *Avr* (Bonas *et al.*, 2002).

Alcuni studi inoltre, dimostrano che l'attività metalloproteasica di *AVR-Pita* è richiesta per la sua diretta interazione con *Pita*, suggerendo un modello proteasi-dipendente per l'induzione dei meccanismi di difesa (Jia *et al.*, 2000). Probabilmente *Pita* contiene dei siti di taglio specifici per una digestione proteolitica, a seguito della quale, si hanno variazioni conformazionali che generano un recettore attivo, o in alternativa il rilascio di peptidi che elicitano i meccanismi di difesa.

Un'altra possibilità, relativa ai meccanismi di percezione indiretta dei prodotti dei geni *Avr* da parte delle proteine di resistenza, è "l'ipotesi di guardia". Questa propone che il terzo componente richiesto per la percezione delle proteine AVR sia rappresentato dal target di virulenza delle proteine stesse. Il legame delle proteine AVR con il proprio target di virulenza, all'interno della cellula ospite, è percepito dalla corrispondente proteina R che fa da "sentinella" al target di virulenza. Un intrigante aspetto dell'"ipotesi di guardia" è che il riconoscimento, da parte delle proteine R del prodotto del gene *Avr* con il suo target di virulenza, determina avirulenza (Van der Biezen, *et al.*, 1998).

Da questo modello ne segue che la "bifunzionalità" dei geni *Avr* è, in realtà, basata su un singolo evento biochimico che si divide in due differenti pathways: in presenza delle proteine R, il legame delle proteine AVR con il target di virulenza induce i meccanismi di difesa, mentre, in assenza delle proteine R, il suddetto legame determina suscettibilità al patogeno nella pianta ospite.

1.3.3 L'interazione Cladosporium fulvum-pomodoro come sistema modello

L'interazione tra il fungo biotrofico *Cladosporium fulvum* e pomodoro, il suo solo ospite noto, è un eccellente sistema modello per studiare le basi molecolari dell'interazione pianta-patogeno.

C. fulvum agente della cladosporiosi attacca principalmente le foglie di pomodoro, ma è frequente l'infezione anche su fiori e frutti. In condizioni di alta umidità i conidi del fungo germinano sulla superficie delle foglie e vi penetrano attraverso le aperture

stomatiche senza formare alcuna struttura specializzata tipo austori. Nell' interazione compatibile il fungo colonizza l'intero spazio apoplastico delle cellule del mesofillo assumendo i nutrienti attraverso le ife che restano comunque intercellulari. Dopo poche settimane dalla penetrazione i conidiofori emergono dagli stomi producendo numerosi conidi che possono ripetere il processo infettivo.

In una interazione incompatibile la crescita del fungo è arrestata dall'attivazione della risposta ipersensibile a seguito del riconoscimento da parte della pianta di elicitori razza-specifici secreti dal fungo nello spazio apoplastico; il riconoscimento di questi elicitori segue il modello gene-per-gene (Joosten e De Wit, 1999).

Nel pomodoro i geni di resistenza *Cf*, e precisamente *Cf-2*, *Cf-4*, *Hcr9-4E*, e *Cf-9* conferiscono resistenza ai ceppi di *C. fulvum* che portano il corrispondente gene di avirulenza, *Avr2*, *Avr4*, *Avr4E*, e *Avr9*, rispettivamente. Nel genoma della pianta i geni *Cf* sono presenti su due cromosomi diversi e sono membri di una famiglia multigenica. Sui cromosomi i geni funzionali sono circondati da omologhi spesso non funzionali, definiti come *Hcr* per Homologues of Cladosporium resistance genes (Joosten and De Wit 1999).

Tutti i geni *Cf* codificano per proteine ancorate alla membrana con un dominio LRRs extracellulare ed una piccola coda citoplasmatica. La loro localizzazione appare consolidare il ruolo di recettori extracellulari per gli elicitori secreti dal patogeno nello spazio apoplastico (Jones and Jones, 1997; Thomas *et al.*, 1998).

Le principali differenze tra i vari geni *Cf* risiedono soprattutto nel dominio N-terminale che sembra giocare un ruolo fondamentale nel riconoscimento specifico dei diversi geni di avirulenza.

L'estremità C-terminale della regione LRRs invece mostra un elevato livello di omologia e pare essere coinvolta nella trasduzione del segnale per l'attivazione dei meccanismi di difesa (Dixon *et al.*, 1996; Jones & Jones 1997; Thomas *et al.*, 1997).

Gli elicitori proteici secreti da *C. fulvum* sono caratterizzati dall'aver all'estremità N-terminale una sequenza segnale per la secrezione extracellulare (Joosten *et al.*, 1999; Laugè *et al.*, 2000; Van den Ackerveken *et al.*, 1993a). La forma matura di queste proteine contiene un elevato numero di residui di cisteina che permettono la formazione di ponti disolfuro, risultati essenziali per la conformazione e la stabilità strutturale di queste molecole (Van den Ackerveken *et al.*, 1993b).

La localizzazione apoplastica dei vari elicitori, insieme con la localizzazione extracitoplasmatica dei domini LRRs delle proteine Cf nella cellula ospite suggerisce una semplice diretta interazione tra recettore e ligando (Piedras *et al.*, 2000), tuttavia le attuali evidenze biochimiche indicano che i meccanismi relativi alla percezione dell'elicitore da parte dell'ospite resistente è molto più complesso e può richiedere il coinvolgimento di un terzo componente.

La disponibilità di linee isogeniche (NILs) di pomodoro contenenti singoli geni Cf permette di realizzare studi dettagliati sui meccanismi di interazione R/Avr. Ad esempio in diversi studi di legami con l'elicitore proteico AVR9 marcato radioattivamente è stato identificato un sito di legame ad alta affinità per AVR9 (HABS) sulla membrana plasmatica di cellule in NILs di pomodoro, con e senza il gene di Cf9, il che suggerisce la presenza di un terzo componente nella percezione di AVR9 da parte di Cf-9 (Kooman-Gersmann *et al.*, 1996). Si pensa che HABS possa

rappresentare il punto di legame nella cellula vegetale per l'attività di AVR9 come fattore di virulenza.

Un altro modello d'interazione è rappresentato dal gene, recentemente clonato, *Rcr3* che è richiesto per la resistenza mediata da *Cf-2* verso ceppi di *C. fulvum* che hanno *Avr2* (Dixon *et al.*, 2000). L'endoproteasi extracellulare RCR3 potrebbe o processare AVR2, generando un ligando maturo, oppure degradare AVR2, rilasciando un peptide che interagisce con la regione LRR extracellulare di *Cf-2*.

1.3.3.1 Elicitori “Razza-Specifici” e “Non Razza Specifici” di *C. fulvum*

Durante l'infezione *C. fulvum* secerne nello spazio apoplastico delle cellule del mesofillo, diversi elicitori proteici. Otto dei geni che codificano per questi elicitori sono stati clonati e caratterizzati.

Quattro di questi elicitori: AVR2, AVR4, AVR4E, AVR9, sono razza-specifici e capaci di indurre risposte di difesa, associate alla reazione di ipersensibilità (HR), in specie di pomodoro che hanno il corrispettivo gene di resistenza *Cf* (Joosten and De Wit 1999; Joosten *et al.*, 1994; Scholtens-Toma and De Witt, 1988). Gli altri quattro, sono proteine extracellulari non razza-specifiche: ECP1, ECP2, ECP4, ECP5 secrete da tutti i ceppi di *C. fulvum* saggiati finora e sono riconosciuti da differenti genotipi di pomodoro (Haansatra *et al.*, 2000; Laugè *et al.*, 2000; Joosten and De Wit 1999).

Il gene **Avr9**, il primo determinante di avirulenza fungino ad essere clonato e caratterizzato, codifica per un precursore proteico di 63 amminoacidi, con un peptide segnale per la secrezione extracellulare di 23 amminoacidi. Dopo la secrezione nello spazio

apoplastico, viene processato all'estremità N-terminale dalle proteasi fungine e di pianta in una proteina matura di 28 amminoacidi, sei dei quali sono residui di cisteina. L'analisi strutturale rivela che questi ultimi sono tutti coinvolti nella formazione di ponti disolfuro, essenziali per la struttura e per l'induzione della HR (Kooman-Gersmann *et al.*, 1997; Van den Hooven *et al.*, 2001). Studi sperimentali non rivelano alcuna funzione di virulenza mediata da *Avr9*; ceppi di *C. fulvum*, virulenti su pomodoro Cf-9, presentano una completa delezione del gene. La sequenza promotrice del gene contiene molti elementi segnale per la regolazione da azoto, analoghi a quelli ritrovati in *Neurospora crassa* (TAGATA e GATA box: Fu e Marzuluf, 1990), pertanto, l'espressione del gene sembra essere fortemente indotta in condizioni di stress da azoto, suggerendone un ruolo nel metabolismo del fungo (Van den Ackerveken *et al.*, 1994a; Pérez-García *et al.*, 2001).

L'elicitore proteico codificato dal gene *Avr4* è secreto nello spazio apoplastico delle foglie di pomodoro come una "pre-proteina" di 135 amminoacidi (Joosten *et al.*, 1994). Dopo la degradazione del peptide segnale, la proteina è processata, dalle proteasi fungine e/o di pianta, in una proteina matura di 86 amminoacidi, con 8 residui di cisteina coinvolti nella formazione intramolecolare di 4 ponti disolfuro. Contrariamente ad *Avr9*, la sequenza promotrice del gene *Avr4* non contiene sequenze segnale per la regolazione da azoto, indicando che l'espressione di *Avr4* è controllata con meccanismi differenti. Tuttavia, sebbene le regioni promotrici dei geni *Avr4* e *Avr9* non mostrino significanti omologie, l'analisi di trasformanti di *C. fulvum*, ottenuti ponendo il gene *gus* sotto il controllo dei promotori di *avr4* e *avr9*, indicano che la

localizzazione ed il profilo di espressione di entrambi i geni di avirulenza è molto simile (Van den Ackerveken *et al.*, 1994b). Studi di espressione indicano che questi geni sono tra i primi ad essere attivati durante il processo infettivo. Questo, insieme all'elevata stabilità di AVR4 e AVR9 nello spazio apoplastico (ambiente ricco di proteasi) suggerisce che tali proteine sono le principali candidate del riconoscimento da parte dell'ospite, rendendosi fattori di avirulenza per il fungo (Joosten *et al.*, 1997).

Alcuni ceppi di *C. fulvum* superano la resistenza mediata da *Cf4*, attraverso singole mutazioni puntiformi nella regione codificante del gene (Joosten *et al.*, 1997). Queste modificazioni conducono alla produzione di proteine tronche o isoforme di AVR4 che esibiscono singole variazioni amminoacidiche, compresa la sostituzione di cisteina con tiroxina (Joosten *et al.*, 1997). È stato evidenziato che la sostituzione di residui di cisteina si traduce in una variazione della struttura proteica dell'elicitore. Ciò impedisce il legame con il corrispondente recettore compromettendo il riconoscimento specifico.

Analisi strutturali hanno inoltre evidenziato che AVR4 presenta un dominio che lega la chitina "chitin-binding domain ChBD", altamente omologo a quello identificato in diverse proteine di invertebrati (Shen and Jacobs-Lorena, 1999). La capacità di AVR4 di legare la chitina e di renderla più resistente all'idrolisi enzimatica è stata anche dimostrata *in vitro* da Van den Burg e colleghi. (2003). E' stato ipotizzato che questa proteina protegga la parete di *C. fulvum* dalla degradazione operata da chitinasi e glucanasi di pianta, durante il processo infettivo.

Si è visto, ancora, che tre dei quattro ponti disolfuro che rientrano nella formazione del dominio ChBD sono richiesti per la

stabilità proteica. La distruzione indipendente di uno dei tre ponti disolfuro, conservati in AVR4, determina la formazione di una proteina sensibile alla degradazione di proteasi fungine e di pianta, presenti nello spazio extracellulare.

Il gene **Avr2** codifica per una proteina di 78 amminoacidi, ricca di residui di cisteina che contiene un peptide segnale di 20 amminoacidi per la secrezione extracellulare (Luderer *et al.*, 2002). Ceppi di *C. fulvum* virulenti su pomodoro recante il corrispondente gene *Cf*, presentano differenti modificazioni nell'ORF (open reading frame) del gene. È stato dimostrato che nella resistenza mediata dal gene *Cf2* è richiesto un terzo componente, il gene *Rcr3* (Dixon *et al.*, 2000). *Rcr3* codifica per una cisteina proteasi secreta nello spazio apoplastico (Krüger *et al.*, 2002). In assenza di questo gene non si verifica l'HR, ciò che ne suggerisce un coinvolgimento nella percezione di AVR2, in piante che hanno il gene *Cf2* (Luderer *et al.*, 2002).

Il gene **Avr4E** codifica per una proteina di 101 amminoacidi, anch'essa ricca di cisteina ed è secreta nello spazio apoplastico delle foglie di pomodoro. Ceppi di *C. fulvum* che hanno il gene *Avr4E*, sono avirulenti su linee di pomodoro che hanno il corrispettivo gene *Hcr9-4E* (omologo funzionale del gene di resistenza *Cf9*).

A differenza delle proteine di avirulenza, le proteine extracellulari ECP (**E**xtra**C**ellular **P**rotein) sono abbondantemente secrete da tutti i ceppi di *C. fulvum* durante la colonizzazione delle foglie di pomodoro, indicando che queste svolgono una funzione fondamentale nella virulenza del fungo.

Per tali proteine non è stata trovata alcuna omologia di sequenza in banca dati (Laugé *et al.*, 2000) e, sebbene la

composizione amminoacidica sia ricca in residui cisteinici, sembra che questi non siano coinvolti nella formazione intramolecolare di ponti disolfuro.

Come per *Avr4* ed *Avr9* la trascrizione di *Ecp1* ed *Ecp2* è fortemente indotta nello spazio apoplastico (Wubben *et al.*, 1994), suggerendo il coinvolgimento di molecole segnale, provenienti dalla pianta, nell'induzione dell'espressione di questi geni. Le proteine ECP1 e ECP2 inoltre, sono necessarie per la piena virulenza di *C. fulvum* su pomodoro. Ad esempio mutanti difettivi per ECP1 sporulano meno abbondantemente rispetto al ceppo selvatico, riducendo la capacità di colonizzazione del fungo. Analogamente, il gene *Ecp2* appare indispensabile per la colonizzazione e la sporulazione di *C. fulvum* durante il processo infettivo (Laugè *et al.*, 1997). Inoltre, i ceppi mutati, mancanti dei relativi geni, inducono forti e più rapide risposte di difesa nella pianta, suggerendo che entrambe le proteine ECP sono coinvolte nella soppressione delle risposte di difesa della pianta durante la colonizzazione (Laugé *et al.*, 1997). È stato anche dimostrato che le proteine ECP agiscono come elicitatori della HR in piante di pomodoro che sono resistenti a *C. fulvum*. Ciò avviene, molto probabilmente attraverso un meccanismo di riconoscimento diretto del corrispondente ECP secreto (Laugè *et al.*, 2000).

1.4 TRICHODERMA COME AGENTE ANTAGONISTA

Al genere *Trichoderma* appartengono funghi filamentosi saprofiti inclusi nel gruppo dei Deuteromiceti. Tali funghi

costituiscono una presenza ubiquitaria nei suoli di ogni parte del mondo, esibendo una elevata adattabilità a diverse condizioni ambientali e riuscendo a crescere su vari tipi di substrati. Sono tra i microrganismi più resistenti a sostanze tossiche e prodotti chimici riuscendo a degradare molti di questi composti, inclusi idrocarburi, derivati clorofenolici, polisaccaridi e pesticidi xenobiotici. La maggior parte delle specie appartenenti al genere *Trichoderma*, presentano uno sviluppo rapido e producono una grande quantità di spore, di colore verde o bianco, formatesi da cellule conidiogene con ontogenesi fialidica. I conidiofori sono ramificati, a forma piramidale, settati e polinucleati. I conidi sono ovoidali, generalmente con parete liscia e possiedono un solo nucleo.

Il genere *Trichoderma* presenta un elevato livello di diversità genetica e racchiude un'elevata gamma di biotipi che si estende dai colonizzatori del suolo, con alto potenziale di biodegradazione, ai simbionti vegetali in grado di interagire con diversi organismi viventi incluse le piante ed altri microrganismi (Harman e Kubicek, 1998). Alcuni biotipi sono capaci di contrastare funghi fitopatogeni, attraverso la competizione per sostanze nutritive e/o nicchie ecologiche, o attraverso il complesso processo del micoparassitismo che richiede la secrezione di diversi enzimi litici, abili ad idrolizzare la parete cellulare del fungo ospite; chitinasi, glucanasi, proteasi sono stati descritti come importanti componenti del sistema multienzimatico di *Trichoderma spp.* In aggiunta alla capacità di attaccare o inibire direttamente la crescita di agenti fitopatogeni, alcuni ceppi di *Trichoderma* interagiscono attivamente con la pianta promuovendone la crescita delle radici e del fusto, con conseguenze benefiche sulla tolleranza a stress biotici ed abiotici. Possono inoltre indurre un miglioramento nello stato nutrizionale della pianta stessa,

attraverso la produzione di sostanze chimiche capaci di solubilizzare o chelare molti minerali e diversi composti nutritivi rendendoli così disponibili all'assorbimento radicale. Recentemente è stato inoltre evidenziato che la colonizzazione dei primi stadi corticali della radice da parte di *Trichoderma spp.* è correlata all'induzione di fenomeni di resistenza sistemica o localizzata in pianta.

Un'altra importante caratteristica di questi microrganismi antagonisti, riguarda la loro interazione con funghi e batteri benefici. E' stato osservato che alcune specie di *Trichoderma* hanno un effetto sinergico con i PGPR (Plant Growth Promoter Rhizobacteria) e con i funghi micorizzici. (Calvet *et al.*, 1993).

Tutte queste caratteristiche unite alla possibilità di produrre propagoli vivi a basso costo in processi industriali (Harman, 1991) hanno reso possibile lo sfruttamento commerciale delle capacità antagonistiche di *Trichoderma* contro molti funghi terricoli, agenti di importanti fitopatie. Oggi sono più di 50 le formulazioni a base di *Trichoderma* registrate e commercializzate in diversi Paesi e usati come biopesticidi, biostimolanti e biofertilizzanti su una larga varietà di piante in grado di integrare, e in alcuni casi sostituire, pesticidi di sintesi, riducendo i rischi relativi all'inquinamento ambientale (Tab. 4).

Alcuni suoi metaboliti ed in particolare i CWDEs (Cellular Wall Degrading Enzymes) trovano diverse applicazioni in molteplici settori industriali. Ad esempio, nell'industria agroalimentare, la β -(1-4)-endoglucanasi prodotta da *T. reesei* e *T. longibrachiatum*, viene utilizzata per risolvere problemi di filtrazione associati alla presenza di β -glucani nella produzione della birra. Interessante è anche la capacità di tale enzima di

Introduzione

promuovere la liberazione di precursori aromatici nell'uva, migliorando notevolmente l'aroma del vino.

Prodotto	Ingrediente attivo	Patogeno bersaglio	Coltura protetta
Binab T™ (Svezia)	<i>Trichoderma harzianum</i> (ATCC 20476), <i>Trichoderma polysporum</i> (ATCC 20475)	Batteri e funghi.	Alberi da frutta, ornamentali, graminacee.
Bio-Fungus™	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Fusarium</i> sp., <i>Pythium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Phytophthora</i>	Ananas, ciliegio, specie a fiore, ornamentali, alberi da fusto.
Antagon™ (Belgio)	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Fusarium</i> sp., <i>Pythium</i> sp., <i>Rhizoctonia Solanii</i>	Colture ortive
Harzian 20™ (Francia)	<i>Trichoderma harzianum</i> (NPP TH 20)	<i>Armillaria</i> , <i>Pythium</i> sp., <i>Sclerotinia</i> sp.	Alberi da frutta, vite, orchidee.
PlantShield™ RootShield™ (USA)	<i>Trichoderma harzianum</i> T-22 e <i>T.harzianum Rifai</i>	<i>Fusarium</i> sp., <i>Pythium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Thielaviopsis</i> , <i>Myrothecium</i> , <i>Cylindrocladium</i> , <i>Botrytis</i>	Cavolo, cetriolo, pomodoro, ornamentali, alberi.
Promote™ Promot Plus™ (Canada)	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i>	<i>Fusarium</i> sp., <i>Pythium</i> sp., <i>Rhizoctonia solanii</i>	Colture in serra
Root Pro™ (Israele)	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Athelia rolfsii</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Thanatephorus</i>	Colture ortive
T-22™ (USA)	<i>Trichoderma harzianum</i> T-22	<i>Fusarium</i> sp., <i>Pythium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Sclerotinia</i>	Ornamentali, ortive, colture floricole
Tri 002/003™ (Olanda)	<i>Trichoderma harzianum</i>	Vari batteri e funghi	Rosa, Begonia, Rododendro, Pomodoro, Crisantemo, cetriolo.
Trichodex™ (Israele)	<i>Trichoderma harzianum</i> T-39	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Monilia laxa</i> , <i>Collectotrichum</i> , <i>Fulvia fulva</i> , <i>Plasmopara viticola</i> , <i>Pseudoperonospora</i>	cetriolo, uva, soia, fragole, nettarine, pomodoro, girasole.
Trichodowels™ (Nuova Zelanda)	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i>	<i>Armillaria</i> sp., <i>Phytophthora</i> , <i>Chondrostereum purpureum</i>	Drupacee, pomacee, vite.
Trichoject™ (Nuova Zelanda)	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i>	<i>Armillaria</i> , <i>Botryosphaeria</i> , <i>Chondrostereum purpureum</i>	Kiwi, susino, vite, ornamentali.
TrichopeI™ (Nuova Zelanda)	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i>	<i>Fusarium oxisporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i>	Ortive, ornamentali, colture sotto serra.
Trichoseal™ (Nuova Zelanda)	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i>	<i>Botryosphaeria</i> sp., <i>Chondrostereum purpureum</i>	Frutticole, ornamentali vite, orchidee.

Tabella 4. Esempi di formulati commerciali a base di *Trichoderma*.

1.4.1 Interazione Trichoderma-patogeno

L'azione antagonista esercitata da *Trichoderma* spp. nei confronti di patogeni terricoli risulta dalla combinazione di più meccanismi, tradizionalmente classificati come antibiosi, competizione e micoparassitismo.

Diversi ceppi di *Trichoderma* spp. costituiscono una fonte inesauribile di metaboliti dotati di attività antibiotica, dalla gliovirina e gliotossina (Bisset, 1991), ad α -pironi, terpeni, polichetidi, derivati isocianidici e composti appartenenti al gruppo dei peptaiboli (Sivasithamparam e Ghisalberti 1998). Queste sostanze, oltre ad avere un'attività antimicrobica diretta, sono parte del meccanismo che si esplica durante i processi di controllo biologico. E' stato dimostrato che molti di essi producono un effetto sinergico in combinazione con i CWDEs, incrementando l'attività inibitoria nei confronti di molti funghi fitopatogeni. Gli enzimi degradativi la parete cellulare, sembrano comunque svolgere un ruolo di primaria importanza durante il micoparassitismo, un complesso processo che comporta una degradazione multi-stadio del fungo fitopatogeno e che culmina con la finale assimilazione di quest'ultimo.

Sono almeno quattro le fasi in cui può essere suddiviso il micoparassitismo:

- il fungo antagonista percepisce la presenza del fungo bersaglio e cresce chemiotropicamente verso di esso;
- si realizza un riconoscimento specifico tra micoparassita e ospite, probabilmente mediato dall'interazione tra molecole complementari, presenti sulla superficie cellulare di entrambi gli agenti;

- le ife del fungo antagonista avvolgono e penetrano le ife del fungo bersaglio;
- l'antagonista colonizza completamente il patogeno e ne distrugge sia il micelio che le strutture di conservazione.

La prima fase segna il passaggio dallo stato saprofitico del fungo a quello antagonistico. L'interazione *Trichoderma*–ospite avviene ancor prima del contatto fisico e sembra essere mediata dalla diffusione di una serie di macromolecole. *Trichoderma* risponde alla presenza del patogeno, direzionando la sua crescita rispetto ad un gradiente di essudati prodotti dal fungo bersaglio o stimolato da molecole rilasciate dall'attività degli enzimi litici secreti costitutivamente da *Trichoderma spp.* a bassi livelli. Questi enzimi catalizzano il rilascio dalla parete del fungo bersaglio di oligomeri, che, a loro volta inducono l'espressione di endochitinasi e altri CWDEs in grado di attaccare le pareti del fungo ospite prima dell'effettivo contatto fisico (Zeilinger, *et al.*, 1999; Viterbo *et al.*, 2002). Il riconoscimento molecolare può essere un evento essenziale nel processo di parassitizzazione ed è probabilmente mediato da un'interazione lectina – carboidrati (Barak *et al.*, 1986). Chet e colleghi hanno evidenziato che l'interazione tra le lectine, presenti nei funghi parassitizzati e i carboidrati complementari sulla superficie della parete cellulare di *Trichoderma*, induce eventi micoparassitici come l'ancoraggio delle ife di *Trichoderma* attorno all'ifa da parassitizzare, attraverso la formazione di caratteristiche strutture simili a ganci ed appressori. (Inbar e Chet 1992, 1995; Elad *et al.*, 1983a). Dopo l'avvolgimento attorno al fungo fitopatogeno *Trichoderma* produce una notevole quantità di sostanze dotate di attività antimicrobica e soprattutto enzimi litici principalmente chitinasi e glucanasi, che degradano la parete

cellulare del fungo parassitizzato. In corrispondenza delle strutture di ancoraggio sono evidenti sull'ifa del fungo bersaglio, dei veri e propri solchi e fori di penetrazione. Nell'ultima fase dell'interazione antagonista-ospite, *Trichoderma* digerisce il contenuto intracellulare del fungo attaccato, provocando dei cambiamenti morfologici come la vacuolizzazione, la perdita del citoplasma e la disintegrazione delle ife del fungo bersaglio e delle strutture di conservazione (Benhamur and Chet, 1996).

La competizione, per lo spazio e per i nutrienti, è un altro dei meccanismi classici del biocontrollo messo in atto da *Trichoderma* (Chet, 1987). La competizione può interessare l'ottenimento di nutrienti da: tessuti colonizzati da patogeni, come nel caso del biocontrollo di *Botrytis* e *Sclerotinia* spp. (Dubos, 1987; Gullino, 1992) e da essudati vegetali prodotti dai semi, come nel biocontrollo di *Pythium ultimum* (Ahmad and Baker, 1988). La competizione riguarda anche la più veloce colonizzazione di ferite, evitando quindi l'infezione, come accade nel caso del patogeno *Chondrostereum purpureum* (Corke, 1974).

Una questione completamente aperta e fortemente dibattuta in questi ultimi anni riguarda i meccanismi attivati da *Trichoderma* spp. per difendersi dalla complessa miscela di composti antifungini secreti da esso stesso durante l'attività antagonista, o prodotti e rilasciati dal fungo ospite e/o dalla microflora del suolo. Una delle ipotesi più accreditata, per spiegare questo fenomeno, fa riferimento alla produzione di inibitori dei propri enzimi litici. A tal proposito Lora e colleghi (1994) hanno rilevato la produzione di inibitori di chitinasi rilasciati simultaneamente ai CWDEs. Questo meccanismo potrebbe spiegare l'alto livello di resistenza mostrato da *T. harzianum* nei confronti di alcune sue endochitinasi purificate

(Lorito *et al.*, 1993). Allo stesso modo, la resistenza alle diverse sostanze antibiotiche o ai composti antimicrobici potrebbe essere legata alla presenza di proteine di membrana che detossificano le cellule, trasportando all'esterno i composti tossici. Tale considerazione viene sostenuta dall'identificazione in moltissimi organismi, compresi funghi e filamentosi, di proteine integrali di membrana, appartenenti alla famiglia dei trasportatori ABC che mediano un efflusso attivo di sostanze tossiche, di natura sia endogena che esogena, prevenendone l'accumulo intracellulare.

1.4.1.1 Trasportatori ABC

I trasportatori ABC (“**A**TP-**B**inding-**C**assette”) sono permeasi di membrana ATP-dipendenti che mediano il trasporto di differenti substrati attraverso le membrane biologiche, contro un gradiente di concentrazione (Driessen, *et al.*, 2000). Il loro nome deriva dalla caratteristica di possedere dei domini, altamente conservati, che legano ed idrolizzano l'ATP, reazione da cui deriva l'energia necessaria per l'attività di trasporto.

Queste proteine permettono il controllo della secrezione in entrata ed in uscita, di molecole piccole e grandi, al fine di creare o mantenere, all'interno del citoplasma e dei vari compartimenti cellulari, condizioni compatibili con lo svolgimento delle reazioni metaboliche.

Una delle più importanti caratteristiche che contraddistingue queste molecole consiste nel fatto che esse possono riconoscere ed espellere una sostanza tossica non appena questa entra nel plasmalemma, impedendole di raggiungere concentrazioni intracitoplasmatiche dannose o mortali per la cellula. La capacità di

trasportare sostanze chimicamente non correlate fra di loro, e generalmente tossiche per la cellula conferisce ai trasportatori ABC il ruolo di fattori di polichemioresistenza (MDR=MultiDrug Resistence).

La specificità dei trasportatori ABC per i substrati può variare in un range piuttosto ampio. Alcuni trasportatori sono in grado di veicolare seppur con diversa efficienza, una serie di sostanze di origine esogena ed endogena tra cui piccole molecole organiche di sintesi, come ad esempio fungicidi, antibiotici steroidei e peptidi (Kolaczkwoski *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996), acidi organici, metalli pesanti, ormoni steroidei (Martinoia *et al.*, 1993), solo per citarne alcune. In altri casi i trasportatori ABC hanno una specificità ristretta ad una o poche sostanze.

1.4.1.2 Caratteristiche strutturali e funzionali dei trasportatori ABC

Sia negli eucarioti che nei procarioti l'unità strutturale dei trasportatori ABC mostra una comune architettura costituita da due regioni, una prevalentemente idrofobica, con sei domini transmembrana generalmente indicati nel loro complesso con la sigla TMD (Trans-Membrane Domain), ed una marcatamente idrofilica indicata come NBF (Nucleotide-Binding Fold) e contenente la cassetta che lega e idrolizza l'ATP.

I domini transmembrana servono per l'ancoraggio del trasportatore alla membrana, determinano la specificità di substrato dei trasportatori ABC e costituiscono la via attraverso cui i substrati stessi attraversano la membrana. Tipicamente, l'unità funzionale è costituita da due unità strutturali organizzate secondo il modulo

(TM₆-NBF)₂ oppure (NBF-TM₆)₂. La figura 3 riporta una rappresentazione schematica di un tipico trasportatore ABC eucariotico.

Nell'NBF vi è una regione conservata di circa 200 amminoacidi contenente due motivi chiamati Walker A e Walker B, dal nome del ricercatore che li ha identificati, oltre ad una sequenza detta "ABC signature" (sequenza identificativa dei trasportatori ABC), caratteristica di questa famiglia di proteine. Si pensa che l'"ABC signature" sia coinvolta nella comunicazione fra differenti domini, specialmente per l'unione dell'attività di idrolisi dell'ATP e di trasporto (Hyde *et al.*, 1990). Altri autori (Bourne *et al.*, 1991; Carson e Welsh 1995) invece, ritengono che essa sia coinvolta direttamente nel legame e nell'idrolisi dell'ATP.

L'attività adenosintrifosfatasica dei trasportatori ABC è stimolata dalla presenza del substrato del trasportatore stesso e può essere quasi totalmente bloccata modificando uno dei due NBF e lasciando intatto il resto della sequenza del trasportatore, il che indicherebbe che esiste una cooperatività fra le due regioni (Loo e Clarke, 1995; Urbatsch *et al.*, 1995); l'NBF residuo mantiene, comunque un'attività di idrolisi dell'ATP, seppur bassa (Ko e Pedersen, 1995; Baubichon-Cortay *et al.*, 1994; Sharma e Rose, 1995).

Lo studio del meccanismo di funzionamento dei trasportatori ABC è, almeno in parte, ostacolato dalla mancanza di approfondite conoscenze della loro struttura. Sono stati realizzati diversi tentativi di cristallizzazione dei singoli domini. La difficoltà nell'ottenere cristalli deriva dal fatto che, quando i trasportatori vengono espressi come singole proteine o come proteine di fusione hanno la tendenza a formare grossi aggregati, compromettendo così le possibilità di

crystallizzazione o il successo dello studio con tecniche come la risonanza nucleare (NMR).

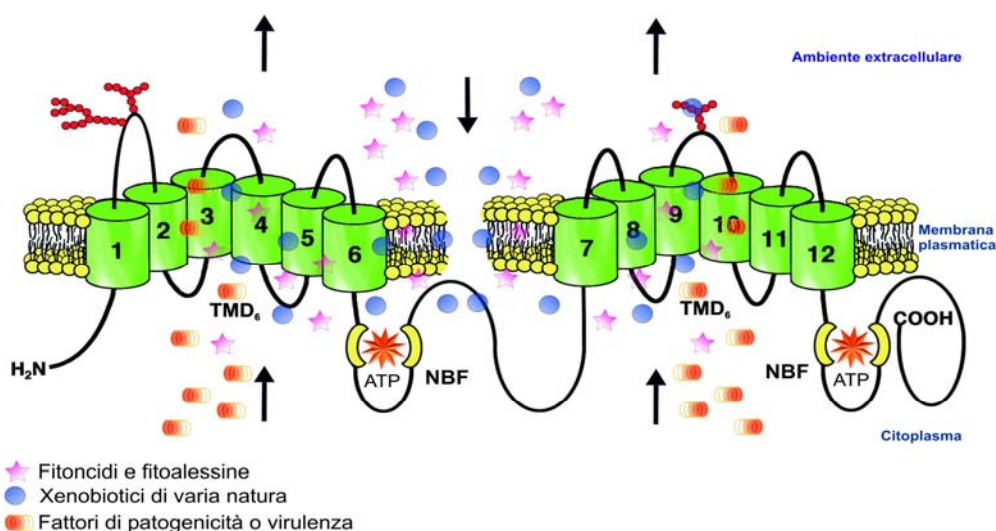


Figura 2. Rappresentazione schematica di un tipico trasportatore ABC eucariotico con topologia (TMD₆-NBF)₂

1.4.1.3 Trasportatori ABC nei funghi filamentosi

Diversi geni codificanti per trasportatori ABC sono stati clonati e caratterizzati in diverse specie di funghi filamentosi quali ad esempio *Aspergillus* spp. (Del Sorbo *et al.*, 1997; Tobin *et al.*, 1997; Slaven *et al.*, 1999; Angermayer *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2000a, 2000b), *Penicillium digitatum* (Nakaune *et al.*, 1998; Nakaune *et al.*, 2002), *Magnaporthe grisea* (Urban *et al.*, 1999) *Mycosphaerella graminicola* (Zweiers e De Waard, 2000; Stergiopoulos *et al.*, 2002); *Giberella pulicaris* (Fleissner *et al.*, 2002); *Botrytis cinerea* (Vermeulen *et al.*, 2001); *Monilinia fructicola* (Schnabel G., *et al.*, 2003). Moltissimi altri geni codificanti per trasportatori sono stati identificati e non ancora caratterizzati (Tab. 5).

Nome del gene	Topologia	Fungo fil. di provenienza	Bibliografia
<i>atrA; atrB</i>	(NBF-TM ₆) ₂	<i>Aspergillus nidulans</i>	Del Sorbo <i>et al.</i> , 1997
<i>afuMDR1; afuMDR2</i>	(TM ₆ -NBF) ₂	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Tobin <i>et al.</i> , 1997
<i>aflMDR1</i>	(TM ₆ -NBF) ₂	<i>Aspergillus flavus</i>	Tobin <i>et al.</i> , 1997
<i>atrC; atrD</i>	(TM ₆ -NBF) ₂	<i>Aspergillus nidulans</i>	Andrade <i>et al.</i> , 1998
<i>Mgatr1; Mgatr2</i>	(NBF-TM ₆) ₂	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Zwiers <i>et al.</i> , 1998
<i>PMR1</i>	(NBF-TM ₆) ₂	<i>Penicillium digitatum</i>	Nakaune <i>et al.</i> , 1998
<i>BcatrA, BcatrB</i>	(NBF-TM ₆) ₂	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Del Sorbo <i>et al.</i> , 1998b

Tabella 5. Geni codificanti per trasportatori ABC in funghi filamentosi

Nei funghi filamentosi i trasportatori ABC esplicano la loro naturale funzione nella secrezione di diversi metaboliti (Del Sorbo e De Waard 1996), e nel respingere verso l'ambiente esterno, composti tossici di origine biotica ed abiotica, al fine di portare le concentrazioni di tali sostanze a livelli tollerabili (De Waard, 1997; Del Sorbo *et al.*, 2000; Schoonbeek *et al.*, 2001). Il sistema di efflusso attivo contribuisce, inoltre, a prevenire l'autointossicazione dagli antibiotici prodotti dallo stesso organismo (Andrade *et al.*, 2000a; Mendez e Salas 2001). È stato anche postulato che i trasportatori ABC rivestono un importante ruolo nella interazione tra i microrganismi nell'ambiente naturale (Andrade *et al.*, 2000b; Schoonbeek *et al.*, 2002). Tale sistema di trasporto, inoltre, gioca un ruolo particolarmente importante nella polichemioresistenza (MDR) verso i fungicidi (Del Sorbo *et al.*, 1997; Del Sorbo *et al.*, 1998b).

I primi geni codificanti per proteine di membrana appartenenti alla superfamiglia dei trasportatori ABC, sequenziati in funghi filamentosi, sono stati *atrA* e *atrB* di *Aspergillus nidulans* (Del

Sorbo *et al.*, 1997). Tali geni sono stati i primi determinanti di MDR studiati nei funghi filamentosi. La trascrizione di *atrB* nel micelio di *A. nidulans* viene fortemente indotta dal trattamento con diverse sostanze tossiche, incluso antibiotici (cicloesimmide), fungicidi inibitori della sintesi dell'ergosterolo (fenarimol, imazalil) e sostanze di difesa delle piante (piscatina, resveratrolo).

Nei funghi fitopatogeni queste proteine sono coinvolte nella secrezione di fattori di patogenicità verso gli ospiti vegetali (tossine ospite-specifiche o fitotossine) (Del Sorbo e De Waard 1996; Del Sorbo *et al.*, 2000). Inoltre, l'importanza dei trasportatori ABC nel processo patogenetico è stata dimostrata anche per quel che riguarda la resistenza mostrata dai funghi fitopatogeni verso le sostanze di difesa prodotte dalla pianta. Urban e colleghi, (1999) hanno dimostrato che il gene *ABC1*, identificato nel fungo *Magnaporthe grisea*, agente causale del brusone del riso, è coinvolto nel processo di invasione delle cellule dell'ospite e, in modo particolare gioca un ruolo fondamentale nella difesa contro la fitoalessina sakuranetina, prodotta dalla pianta di riso.

Da *Mycosphaerella graminicola* agente della septoriosi del grano, sono stati isolati e caratterizzati due geni, *Mgatr1* e *Mgatr2* codificanti per trasportatori ABC dalla struttura (NBF-TM₆)₂. La trascrizione di entrambi i geni sembra essere indotta dalla presenza di alcuni metaboliti secondari prodotti dalla pianta, in particolare l'eugenolo, e da diversi antibiotici. Questi risultati suggeriscono che i due trasportatori possono avere un ruolo importante nella patogenesi e nella resistenza ad alcuni fungicidi (Zwiers e De Waard, 1998).

1.4.2 Interazione *Trichoderma* –pianta

Recenti studi hanno dimostrato che diversi ceppi di *Trichoderma* sono simbionti opportunisti ed avirulenti su una grande varietà di piante coltivate (Harman *et al.*, 2004a). *Trichoderma* infatti, colonizza la pianta senza risultare patogeno in quanto probabilmente l'invasione e la colonizzazione delle radici induce nella pianta una serie di cambiamenti metabolici volti a bloccare e prevenire l'ingresso del fungo, confinandolo nei primi strati delle cellule corticali (Elad *et al.*, 1999; Elad e Kapat, 1999).

Nell'interazione con i tessuti radicali, non solo il fungo prolifera utilizzando risorse nutrizionali fornite dalla pianta ma, come conseguenza dell'associazione con le radici, è anche favorito nella colonizzazione di nuove ed estese aree nel suolo. Alcuni ceppi mostrano una forte "competenza per la rizosfera" che permette loro di colonizzare una vasta superficie radicale e di persistere sulle radici per diverse settimane (Thrane e Gensen, 1997) o addirittura mesi (Barman, 2000). Questa capacità permette quindi al fungo di formare una stabile e duratura associazione con la pianta in svariate condizioni ambientali. Perciò, nonostante *Trichoderma* abbia la capacità intrinseca di attaccare le piante, è solitamente avirulento, avendo sviluppato una relazione con le piante di tipo simbiotica più che parassitaria (Harman *et al.*, 2004).

Gli effetti benefici per la pianta, derivanti da questa associazione sono molteplici e includono:

- il controllo di diverse malattie grazie all'azione diretta di *Trichoderma spp.* nei confronti di vari organismi patogeni (Chet, 1987) e agenti nocivi della microflora del suolo (Bakker e Schippers, 1987);

- il controllo indiretto di agenti patogeni a seguito dell'induzione di resistenza sistemica in pianta; tale fenomeno favorisce il controllo di varie classi di patogeni (funghi e batteri) spazialmente e temporalmente distanti dal punto di applicazione di *Trichoderma*; (Bigirimana *et al.*, 1987; Yedidia *et al.*, 1999; Yedidia *et al.*, 2000; Yedidia *et al.*, 2003);
- il miglioramento della crescita della pianta e lo sviluppo dell'apparato radicale.

Il verificarsi di quest'ultimo fenomeno in un sistema axenico (Lindsey e Baker, 1967; Yedidia *et al.*, 2001) ha dato credito all'ipotesi che esso è il risultato di un effetto diretto esercitato da *Trichoderma* sulla pianta, oltre ad essere una conseguenza del controllo di microrganismi patogeni e dell'inattivazione di composti tossici presenti nella rizosfera. Negli ultimi anni sono stati proposti vari meccanismi potenzialmente coinvolti in questo fenomeno, quali ad esempio: la produzione o il controllo degli ormoni vegetali (Kleifeld and Chet, 1992), la solubilizzazione di nutrienti normalmente insolubili nel suolo (Altomare *et al.*, 1999) ed un aumento dell'assorbimento e della traslocazione di minerali normalmente poco disponibili per la pianta (Inbar *et al.*, 1994). Infatti, in sistemi idroponici asettici contenenti solo *Trichoderma* è stato dimostrato un aumento nell'assorbimento di nutrienti come il ferro, il rame, il manganese, il fosforo ed il sodio (Yedidia *et al.*, 2001).

Nonostante la sua ovvia importanza, il meccanismo con cui *Trichoderma* interagisce con la pianta stimolando la crescita e inducendo fenomeni di resistenza, è stato poco studiato. Molta più

attenzione è stata data allo studio dei meccanismi di biocontrollo associati all'interazione diretta con gli agenti patogeni.

Il primo lavoro che riporta una chiara dimostrazione dell'induzione di fenomeni di resistenza risale al '97, quando Bigirimana e collaboratori mostrano che il trattamento dei semi di fagiolo con *T. harzianum* T-39 induce resistenza a patogeni fogliari, come *B.cinerea* e *Colletotrichum lindemuthianum*. Studi simili sono stati estesi a diverse specie vegetali appartenenti sia al gruppo delle monocotiledoni che delle dicotiledoni e con differenti specie e ceppi di *Trichoderma*.

Anche per *T. harzianum* T-22 (ceppo commerciale) è stata dimostrata l'induzione di resistenza in pomodoro, fagiolo e mais. In quest'ultima coltura, la presenza di T-22 nel suolo ha ridotto i sintomi di antracnosi causati da *Colletotrichum graminicola* (Harman *et al.*, 2004). In pomodoro, T-22 ha aumentato la resistenza al patogeno fogliare *Alternaria solani*, fino a tre mesi dopo l'applicazione di *Trichoderma* (Lo *et al.*, 2000).

Tuttavia, i meccanismi molecolari che regolano i fenomeni associati all'induzione di resistenza in pianta sono ancora poco noti e pertanto oggetto di numerosi studi.

Diverse ricerche hanno evidenziato che la colonizzazione dei tessuti radicali operata da *Trichoderma spp.* induce variazioni morfologiche e biochimiche in pianta a seguito delle quali quest'ultima risulta più resistente all'attacco di diversi patogeni.

Analizzando l'associazione *Trichoderma*–radici di cetriolo, in un sistema idroponico sterile, Yedidia e colleghi, (2003) hanno evidenziato che le ife del fungo *T. harzianum* T203 penetrano nell'epidermide della radice con un meccanismo analogo a quello osservato per il micoparassitismo (Fig. 3).

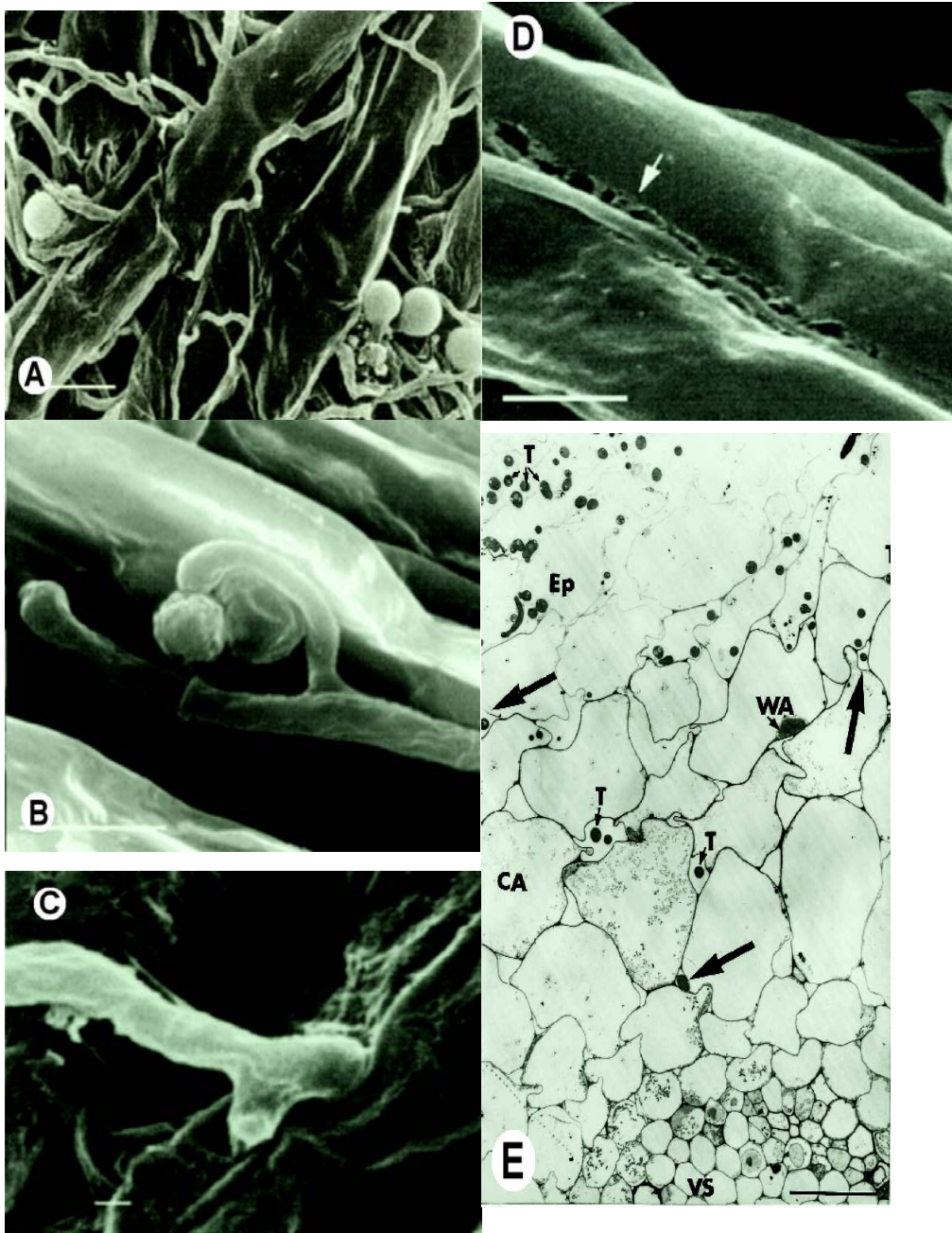


Figura. 3. Immagini al microscopio elettronico di radici di cetriolo in coltura idroponica 72 h dopo l'inoculo con *T. harzianum*. (A) Proliferazione e crescita di ife attorno alle radici; (B) Particolare di ifa che si avvolge attorno a un pelo radicale; (C) Formazione di una struttura simile a un appressorio; (D) Ifa che penetra l'epidermide radicale; (E) Colonizzazione di ife di *Trichoderma* (T) nell'epidermide radicale (Ep) verso lo strato corticale (CA) crescendo principalmente nello spazio intercellulare (freccie). Si nota anche la deposizione di callosio e lignina in cellule non invase (WA) (foto da Yedidia *et al.*, 2000).

L'ancoraggio ai peli radicali avviene con la formazione di strutture simili ad appressori e la penetrazione e colonizzazione dei tessuti corticali avviene attraverso la produzione di enzimi idrolitici. Tuttavia, la pianta limita la colonizzazione del tessuto radicale al primo o al secondo strato di cellule in seguito alla deposizione di

lignina e callosio nelle pareti cellulari, formando così una vera e propria barriera strutturale al successivo insediamento del fungo. La proliferazione di quest'ultimo è quindi ristretta agli spazi intercellulari dell'epidermide e dei tessuti corticali più esterni.

Uno degli aspetti più importanti di questa interazione è associato all'induzione in pianta di fenomeni simili a quelli osservati nella resistenza "non-ospite", dove sono attivati meccanismi di difesa non specifici.

L'invasione delle radici da parte di *Trichoderma* provoca un incremento nella produzione di enzimi vegetali correlati alla difesa, tra cui varie perossidasi, chitinasi, β -1,3-glucanasi, nonché l'attivazione del pathway delle lipossigenasi e delle liasi idroperossidi (Howel *et al.*, 2000; Harman *et al.*, 2004). In tal modo *Trichoderma* è in grado, non solo di produrre direttamente composti tossici nei confronti di patogeni, ma anche di stimolare fortemente le piante a produrre i propri metaboliti di difesa.

1.5 INTERAZIONE COMPLESSA PIANTA-PATOGENO-ANTAGONISTA: TRICHODERMA COME SISTEMA MODELLO

Le potenzialità relative all'impiego di nuovi approcci scientifici, per la comprensione e l'esplorazione di complessi sistemi biologici, appaiono chiaramente evidenti quando questi sono applicati ai funghi del genere *Trichoderma* spp. Il genoma di questi funghi, infatti, rappresenta un campo di grande interesse investigativo che potrebbe portare alla conoscenza di meccanismi molecolari di notevole importanza biologica, in virtù delle complesse interazioni che questi sono in grado di stabilire con la pianta e con altri microrganismi, in particolar modo con quelli che si trovano nelle componenti del suolo. Inoltre, questi funghi costituiscono una fonte inesauribile di geni e prodotti genici di grande utilità per lo sviluppo di nuove strategie biotecnologiche; dal potenziale impiego per migliorare il controllo delle malattie delle piante alla biodegradazione di svariati inquinanti ambientali, con il recupero di aree fortemente contaminate.

Negli ultimi anni, numerosi gruppi di ricerca hanno inteso studiare *Trichoderma* come sistema modello per migliorare la conoscenza di importanti relazioni microbiche, in particolare dell'interazione con la pianta e con l'agente patogeno. Fino a poco tempo fa, la ricerca ha riguardato soprattutto lo studio dei differenti fattori coinvolti nei meccanismi di interazione tra *Trichoderma* e altri funghi, batteri, e virus patogeni per la pianta. Particolare attenzione è stata data ai CWDEs e alla complessa miscela di molecole antimicrobiche prodotte durante l'attività antagonistica. Sebbene gli studi basati sull'impiego di mutanti difettivi ottenuti

con tecniche di distruzione genica, abbiano permesso di ottenere importanti informazioni sul coinvolgimento dei CWDEs nel biocontrollo, la ridondanza, nel genoma di *Trichoderma*, dei geni che li codificano, ha reso difficile identificare inequivocabilmente gli enzimi richiesti per il biocontrollo, indipendentemente dal ceppo e dal sistema usato (Baek *et al.*, 1999; Carsolio *et al.*, 1999; Woo *et al.*, 1999). Tuttavia, la discrepanza talvolta osservata nei dati presenti in letteratura, suggerisce l'ipotesi che questi funghi possano attivare diversi sistemi molecolari in relazione all'agente patogeno e alla pianta che colonizzano.

Nell'ambito dei meccanismi di interazione stabiliti da *Trichoderma*, minore enfasi è stata data all'identificazione di geni e prodotti genici che possano svolgere un ruolo di primaria importanza nell'associazione tra i diversi ceppi di *Trichoderma* e la pianta. I pochi studi avviati in tal senso, si sono concentrati su un numero limitato di geni che vengono differenzialmente espressi in pianta, quando questi funghi colonizzano le radici, spesso indipendentemente dalla presenza del patogeno (Viterbo *et al.*, 2004; Yedidia *et al.*, 1999; Yedidia *et al.*, 2000; Yedidia *et al.*, 2001; Yedidia *et al.*, 2003).

La difficoltà relativa allo studio di questi sistemi, scaturisce proprio dalla molteplicità delle componenti che entrano in gioco e suggerisce la necessità di applicare un approccio olistico.

L'interazione *Trichoderma*-pianta presenta i caratteri di una associazione simbiotica, con una diretta interazione fisica tra le ife fungine e le cellule radicali. Tuttavia, i meccanismi con cui il fungo limita la sua proliferazione ai primi strati corticali sono ancora sconosciuti sebbene appaiono correlati con la capacità di stimolare la risposta di difesa in pianta. Un notevole passo avanti,

nella valutazione dei determinanti molecolari coinvolti nelle interazioni complesse *Trichoderma*-pianta-patogeno, è stato realizzato con l'analisi proteomica. Tale tecnica permette di studiare i cambiamenti dell'espressione genica dei tre componenti (pianta-patogeno-antagonista) e di individuare le specie proteiche la cui produzione è alterata o differenziata durante l'interazione multicomponente. L'impiego di questi nuovi strumenti di analisi ha permesso di constatare l'instaurarsi di un vero e proprio "dialogo molecolare" tra *Trichoderma*, la pianta e l'agente patogeno, permettendo di identificare una varietà di molecole segnale, che vengono scambiate durante queste interazioni. Alcune di queste molecole possono agire come ormoni stimolando la crescita e lo sviluppo della pianta, altre come elicitori, inducendo le risposte di difesa in pianta.

La conoscenza dei meccanismi molecolari che regolano l'interazione *Trichoderma*-pianta è di fondamentale importanza per lo sviluppo soprattutto di nuove strategie biotecnologiche applicate alla difesa delle piante.

La caratterizzazione di ceppi che elicitano risposte di difesa nelle piante rappresenta il punto di partenza per:

- studiare il meccanismo di azione delle singole componenti coinvolte nell'interazione *Trichoderma*-pianta, al fine di isolare, clonare e caratterizzare nuovi geni coinvolti nell'induzione di risposte di difesa;
- trasformare ceppi commerciali di *Trichoderma*, che normalmente non inducono fenomeni di resistenza indotta, con geni in grado di conferire tali capacità, al fine di aumentare la loro performance nella protezione delle piante;

Introduzione

- modulare l'espressione di geni endogeni di *Trichoderma* coinvolti nell'interazione fungo – pianta cercando di attivare uno stato di ISR nella pianta.
- utilizzare i prodotti dei geni coinvolti nell'induzione di resistenza per la formulazione di nuovi biofitofarmaci;
- isolare e clonare geni di pianta che riconoscono molecole segnale di *Trichoderma*, e utilizzare tali geni per trasformare altre varietà o specie per estendere l'interazione con *Trichoderma* ad altre piante.

1.6 SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di tesi si prefigge l'obiettivo di potenziare le conoscenze relative al meccanismo di controllo biologico messo in atto da funghi antagonisti nei loro processi di interazione con la pianta e con l'agente patogeno, al fine di migliorare il controllo di importanti fitopatie.

In particolare, si è inteso studiare le basi molecolari dei meccanismi di interazione e identificare geni potenzialmente coinvolti in questi processi.

Lo studio dei meccanismi molecolari dell'interazione *Trichoderma* – pianta è stato realizzato utilizzando la coppia *avr4* – *cf4* come sistema modello basato sul riconoscimento specifico gene per gene. Allo scopo, sono stati ottenuti trasformanti di *Trichoderma* esprimenti il gene di avirulenza *avr4* di *C. fulvum*. Tali mutanti sono stati saggiati al fine di:

- verificare la possibilità di migliorare l'attività antagonista di *T. atroviride* ceppo P1, mediante l'espressione del gene di avirulenza *Avr4*;
- individuare e chiarire i meccanismi molecolari dell'interazione *Trichoderma* – pianta;
- dimostrare la possibilità di veicolare elicitori proteici da *Trichoderma* alla pianta;
- aumentare la resistenza delle piante ai patogeni, attraverso l'alterazione dell'interazione pianta - fungo antagonista e l'induzione di fenomeni di resistenza sistemica (ISR).

Inoltre, si è cercato di individuare in *Trichoderma* omologhi di *Avr4* e *Avr9* di *C. fulvum* (*avr-like*), per studiare la diffusione di questi geni in diverse specie fungine.

Nel presente studio si è anche inteso verificare l'eventuale coinvolgimento nei processi di interazione, di geni codificanti per trasportatori ABC. In particolare si è ipotizzato che i trasportatori ABC di *Trichoderma* spp. svolgano un ruolo importante in numerosi processi, dalla secrezione di fattori (micotossine, enzimi idrolitici, ormoni ecc.) necessari per stabilire un'interazione compatibile tra il micoparassita, il fungo ospite e/o la pianta, alla resistenza a sostanze tossiche prodotte dalla microflora o introdotte da attività antropiche (fungicidi e metalli pesanti).

In particolare in questo lavoro sono state clonate 4 parziali sequenze di trasportatori ABC (TABC1, TABC2, TABC3 e TABC4) in *Trichoderma atroviride*, avviando inoltre, per una di esse, la caratterizzazione funzionale.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Ceppi Utilizzati

Il ceppo utilizzato per la trasformazione di *T. atroviride* è stato il P1 ATCC 74058 (American Type Culture collection) derivato dal ceppo 107 di *T. atroviride* cresciuto su un mezzo contenente 500ppm di iprodione (fungicida). Il ceppo 107 di *T. atroviride* è stato isolato da legno dal Dr. C. Dennis a Norfolk (Inghilterra) ed è stato selezionato da Tronsmo (1991) per le capacità di sopravvivenza a bassa temperatura in modo da poter essere utilizzato come agente di biocontrollo nei climi freddi.

T. atroviride ceppo P1 (ATCC 74058) è stato valutato per le capacità di biocontrollo (Tronsmo, 1989) soprattutto nei confronti dei funghi fitopatogeni *Rhizoctonia* spp., *Sclerotinia* spp. e *Botrytis cinerea* (Tronsmo, 1991). Alcuni dei geni che codificano per gli enzimi CWDE (Cell Wall Degrading Enzyme) sono stati studiati in dettaglio. I geni *ech42*, *gluc78*, e *nag1* che codificano rispettivamente per una endochitinasi, una β -1-3 glucanasi ed una N-acetilglucosaminidasi, sono stati clonati e caratterizzati anche in relazione al loro coinvolgimento durante le fasi di biocontrollo (Lorito, 1998; Donzelli et al., 1997; Peterbauer et al., 1997; Woo et al., 1999). È stato inoltre trasformato anche un ceppo di *Trichoderma viride* che non agisce come agente di biocontrollo ed è notoriamente più suscettibile di *T. atroviride* ceppo P1 all'attività chitinolitica (Van den Burg, 2003).

Per i saggi di competizione in vitro sono stati utilizzati i seguenti ceppi di funghi fitopatogeni:

- *Rhizoctonia solani* ceppo 1556 isolato da pomodoro
- *Penicillium* spp.

- *Botrytis cinerea* B0510
- *Alternaria alternata* isolato FC2600 da patata

Il ceppo batterico utilizzato con i vettori plasmidici è stato *Escherichia coli* DH5 α (Promega), coltivato utilizzando i terreni e le condizioni di coltura descritte da Sambroock *et al.*, (1989), mentre il ceppo di *Agrobacterium tumefaciens* LBA 1100, che porta i geni *vir* necessari per il trasferimento del T-DNA, è stato gentilmente fornito dal Dr. Paul Bundock.

Le trasformazioni di cellule competenti di *E. coli* sono state effettuate utilizzando un elettroporatore Bio Rad (Gene Pulser II). Il ceppo LBA 1100 di *A. tumefaciens* è stato trasformato per congelamento-scongelo con il vettore binario pUR5750 e selezionato su un mezzo LB agar contenente 50 μ g/ml di kanamicina.

2.2 Piante Utilizzate

Linee isogeniche di pomodoro (*Lycopersicon esculentum*) Moneymaker (MM) che hanno i geni di resistenza *Cf* contro razze di *C. fulvum* sono state cresciute in serra come descritto da De Wit and Flach (1979). Il genotipo Moneymaker che non ha geni di resistenza contro *C. fulvum* è l'MM-Cf0, mentre MM-Cf4 e MM-Cf5 sono portatori dei geni di resistenza *Cf-4* e *Cf-5* rispettivamente. I semi delle linee MM-Cf4 e MM-Cf5 sono stati forniti dal Prof. Pierre J.G.M. De Wit del laboratorio di fitopatologia dell'Università di Wageningen (Olanda).

2.3 Condizioni di Crescita

Le spore del ceppo P1, conservate in una soluzione di glicerolo al 20% e mantenute alla temperatura di -80°C , sono state prelevate in opportune condizioni di sterilità e piastrate su terreno di coltura PDA (Potato Dextrose Agar, Merck).

Le colture sono state incubate a 25°C per circa 10 giorni sino alla sporulazione. Le spore sono state raccolte utilizzando 10 ml di H_2O distillata sterile per piastra, e sono state utilizzate per l'inoculo o conservate a 4°C .

La concentrazione dei conidi per l'inoculo è stata determinata utilizzando un contaglobuli Bright-line® (Sigma).

In coltura agitata è stato usato un mezzo salino liquido (SM, Salt Medium) a pH 6.6, di cui è di seguito riportata la composizione:

Sali	Concentrazione
KH_2PO_4	680 mg/l
K_2HPO_4	870 mg/l
KCl	200 mg/l
NH_4NO_3	1 g/l
FeSO_4	2 mg/l
ZnSO_4	2 mg/l
MnSO_4	2 mg/l
CaCl_2	200 mg/l
MgSO_4	200 mg/l

Al mezzo è stato aggiunto l' 1% di saccarosio

Per favorire la crescita del micelio fungino, le beute sono state incubate alla temperatura di 25°C in agitazione a 150 rpm.

Per i saggi di competizione *in vitro* in piastre Petri, è stato utilizzato lo stesso mezzo salino (SM) agarizzato (agar 1.5%).

I ceppi di *Escherichia coli* utilizzati sono stati cresciuti a 37° C nel mezzo LB (Luria-Bertani: 0,5% estratto di lievito, 1% Bacto peptone, 1% NaCl, pH 7) con l'aggiunta di ampicillina (100 µg ml⁻¹) o kanamicina (50 µg ml⁻¹), quando necessario. Il ceppo LBA1100 di *A. tumefaciens* è stato allevato a 28°C in un mezzo LB contenente 250 µg ml⁻¹ di spectinomicina o 50 µg ml⁻¹ di kanamicina per il ceppo contenente il plasmide binario pUR5750.

Per la trasformazione mediata da *Agrobacterium* è stato usato il mezzo d'induzione (IM) composto per 1 litro da:

- 0.8ml 1.25M K buffer pH 4.8
- 20ml M-N buffer (30g/l MgSO₄, 15g/l NaCl)
- 1 ml 1% CaCl₂
- 10ml 0.01% FeSO₄
- 5ml spore elements (100mg/l ZnSO₄, 100mg/l CuSO₄, 100mg/l H₃BO₃, 100mg/l MnSO₄, 100mg/l Na₂MoO₄)
- 2.5ml 50% NH₄NO₃
- 10ml glicerolo 50%
- 40ml 1M MES pH5.5
- 5mM glucosio

È stato aggiunto 1 ml di una soluzione 0.2 M di Acetosiringone (AS) per l'induzione dei geni *vir* durante la trasformazione.

2.4 Vettori Utilizzati

Il plasmide pGA₄W₆ (fig. 4) di 6.2 kb contiene il gene *Avr4* (di 408 bp) sotto il controllo del promotore costitutivo del gene *gpd*

che codifica per la gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi di *Aspergillus nidulans*. Il plasmide ci è stato gentilmente fornito dal prof. Pierre J.G.M. De Wit ed è stato utilizzato sia per la co-trasformazione con il plasmide pAN7.1 di protoplasti del ceppo wild-type P1 di *T. atroviride*, che per l'amplificazione tramite PCR (Polymerase Chain Reaction) del gene *Avr4*.

Il plasmide pAN7.1 (fig. 4) di 6.7 kb è stato utilizzato per la co-trasformazione con il plasmide pGA₄W₆. Il plasmide pAN7.1 contiene il gene *hph* per la resistenza all'igromicina B sotto il controllo del promotore costitutivo P *gpd* e del terminatore del gene *trpC* di *Aspergillus nidulans* (Punt et al., 1987).

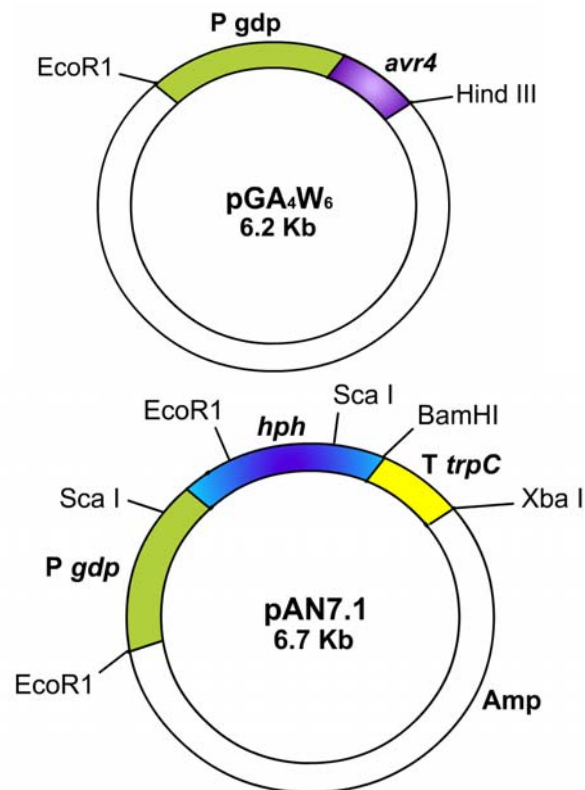


Figura 4. Mappe circolari dei vettori pGA₄W₆ e pAN7.1 utilizzati per la co-trasformazione di protoplasti del ceppo P1 di *T. atroviride*. Sono indicati i siti di restrizione di endonucleasi e la grandezza del plasmide in kb. Abbreviazioni: P *gdp* frammento del promotore del gene *gdp* di *A. nidulans*; T *trpC* frammento del terminatore *trpC* di *A. nidulans*.

Il plasmide pZEGA2 (fig. 5) di 5.3 kb contiene il gene della *gfp* (green fluorescence protein) con un frammento di 814 bp del promotore inducibile del gene *ech42* che codifica per un'endochitinasi in *T. atroviride* (Schindler et al., 1993) e la sequenza terminatrice del gene *cbh2* di *T. reesei*.

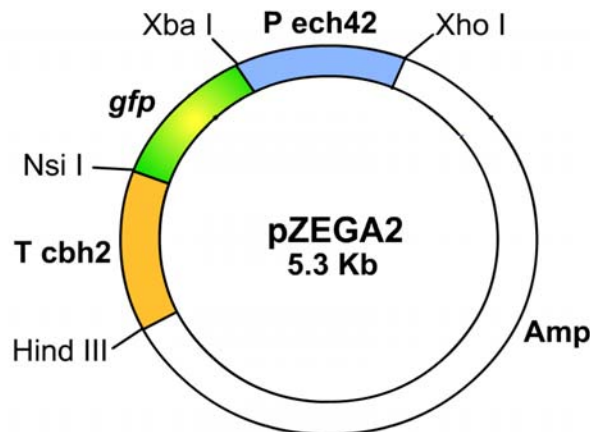


Figura 5. Mappa circolare del plasmide pZEGA2 utilizzato per subclonare il gene *avr4* tra il promotore inducibile *ech42* e il terminatore *cbh2*. Il plasmide contiene anche il gene di resistenza all'ampicillina codificante per la β -lattasi. Sono indicati i siti di restrizione di endonucleasi e la grandezza del plasmide in kb. Abbreviazioni: P *ech42* frammento del promotore del gene *ech42* in *T. atroviride*; T *cbh2* frammento del terminatore del gene *cbh2* di *T. reesei*.

Il plasmide contiene inoltre il gene per la resistenza all'ampicillina codificante per la β -lattasi. Il plasmide pZEGA2 è stato digerito con gli enzimi di restrizione Xba I e Nsi I e utilizzato per subclonare il gene *avr4* (amplificato dal plasmide pGA₄W₆) tramite la sostituzione del gene della *gfp* tra il promotore *ech42* e il terminatore *cbh2*.

Il vettore binario pUR5750 (fig. 6) di circa 12 kb è stato utilizzato sia per la trasformazione di protoplasti di *T. atroviride* ceppo P1 e *T. viride*, che per la trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation) di spore dei due suddetti funghi (Zeilinger, 2004). La costruzione del plasmide binario è descritta da De Groot et al. (1998).

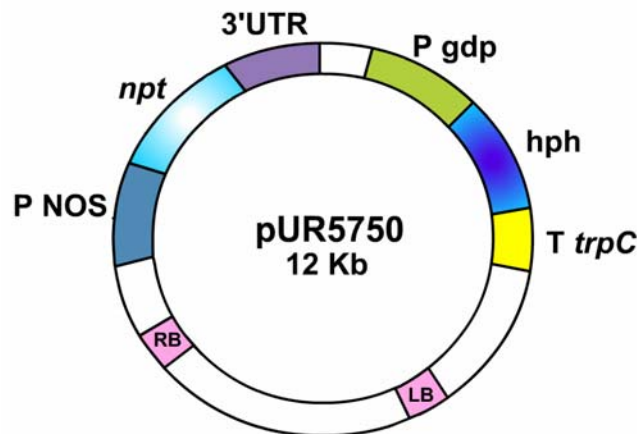


Figura 6. Mappa circolare del vettore binario pUR5750 utilizzato per la trasformazione di protoplasti e per la trasformazione mediata da *A. tumefaciens* di *T. viride* e del ceppo P1 di *T. atroviride*. Abbreviazioni: P gdp frammento del promotore del gene *gdp* di *A. nidulans*; T trpC frammento del terminatore trpC di *A. nidulans*, P NOS frammento del promotore del gene nopalina sintasi, LB left border, RB right border.

Esso contiene nella regione del T-DNA: le sequenze del left (LB) e right border (RB); il gene *hph* per la resistenza all'igromicina B, sotto il controllo del promotore costitutivo P gdp della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi di *A. nidulans* e il terminatore trpC di *A. nidulans*; un polylinker derivato da M13mp19; il gene che codifica per la neomicina fosfotransferasi (*npt*) con il promotore della nopalina sintasi (NOS) per la resistenza alla kanamicina in *Agrobacterium*.

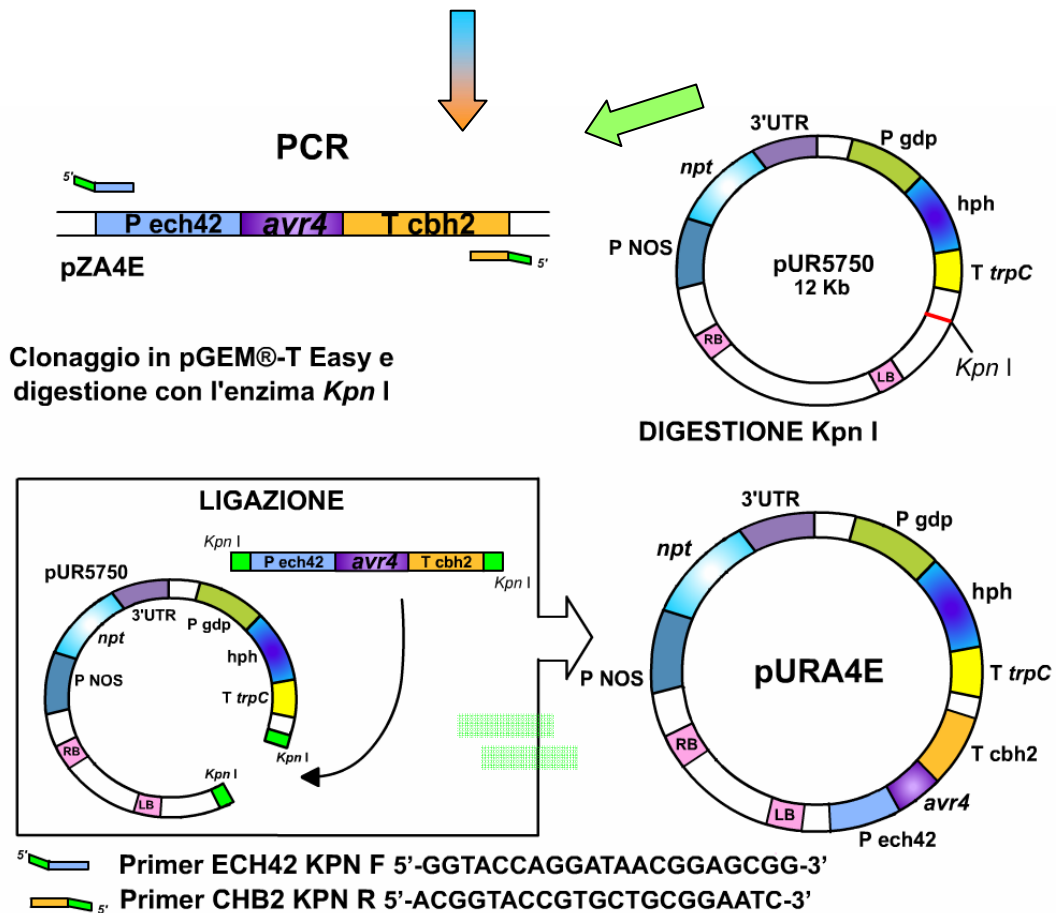
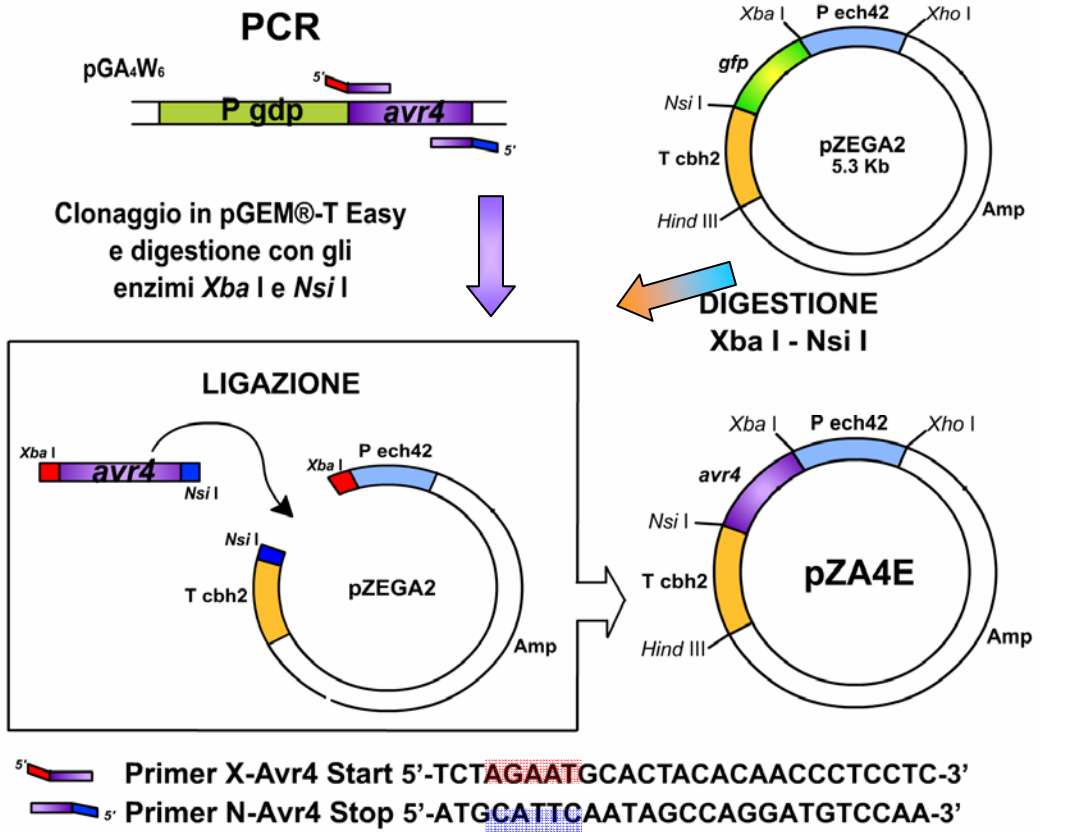
2.5 Costruzione del Vettore pURA4E

Il plasmide pURA4E è stato ottenuto dal clonaggio del gene *Avr4* (sotto il controllo del promotore inducibile *ech42* e del terminatore *cbh2*) in pUR5750.

Dopo aver amplificato il gene *avr4* dal plasmide pGA₄W₆ il prodotto di PCR di 408 bp è stato clonato nel vettore pGEM®-T Easy e successivamente digerito con gli enzimi *Xba* I e *Nsi* I. È stata inoltre effettuata la digestione enzimatica del plasmide pZEGA2 con *Xba* I e *Nsi* I ottenendo un plasmide pZEGA2 senza il gene della *gfp*. Il plasmide pZEGA2 digerito e il gene *avr4* sono stati ligati e il prodotto di ligazione (pZA4E) è stato elettroporato in cellule competenti di *E. coli*. Sul DNA plasmidico di pZA4E è stata eseguita una PCR per amplificare il gene *avr4-ech42*. L'amplificato (di circa 2000 bp) è stato ligato nel vettore pGEM®-T Easy e digerito con l'enzima *Kpn* I. Il gene *avr4-ech42* con le estremità digerite *Kpn*I è stato ligato nella regione del T-DNA del vettore binario pUR5750 precedentemente linearizzato con l'enzima *Kpn* I. Il costrutto pURA4E è stato elettroporato in cellule competenti di *E.coli*.

Nello schema 1 sono riportate le reazioni effettuate per ottenere il plasmide pURA4E. In rosso e in blu sono indicati le code al 5' corrispondenti alle sequenze riconosciute dall'enzima di restrizione *Xba* I e *Nsi* I per i primer X-AVR4 START e N-AVR4 STOP rispettivamente e in verde le code al 5' corrispondenti alle sequenze riconosciute dall'enzima di restrizione *Kpn* I per i primer ECH42 KPN F e CHB2 KPN R.

SCHEMA 1



2.5.1 Amplificazione tramite PCR del gene *avr4* e *avr4-ech42*

Le reazioni polimerasiche sono state condotte in un volume totale di 50 µl utilizzando come templati il DNA plasmidico pGA₄W₆, per l'amplificazione del gene *avr4*, o il DNA plasmidico pZEGA2 per l'amplificazione del gene *avr4-ech42*.

Per tutte le PCR effettuate sono state utilizzate due coppie di primers.

Primers utilizzati per l'amplificazione

Per l'amplificazione del gene *Avr4* dal plasmide pGA₄W₆ e dal DNA genomico dei trasformanti per *avr4* (ottenuti per co-trasformazione con pGA₄W₆ e pAN7.1), sono stati usati i primers:

- **XAVR4START**: 5'TCTAGAATGCACTACACAACCC TCCTC-3' primer forward di 27 nt disegnato sulla sequenza del gene *avr4* partendo dal codone di start ATG, e comprendente il peptide segnale per la secrezione extracellulare, e all'estremità 5' una sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione *Xba*I (T/CTAGA).
- **NAVR4STOP**: 5'ATGCATTCAATAGCCAGGATGTC CAA-3' primer reverse di 26 nt disegnato sulla sequenza del gene *avr4* partendo dal codone di stop con una sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione *Nsi* I (ATGCA/T) all'estremità 5'.

Per l'amplificazione del gene *Avr4-ech42* dal plasmide pZA4E e dal DNA genomico dei trasformanti con *avr4-ech42* (ottenuti utilizzando il plasmide pURA4E), sono stati usati i primers:

- **ECH42 KPN F**: 5'GGTACCAGGATAACGGAGCGG-3' primer forward di 21 nt disegnato sulla sequenza di un frammento di 814 bp del promotore del gene *ech42*

che codifica per un endochitinasi di *T.atroviride* (Schindler et al., 1993), con quindici basi omologhe partendo dall'undicesima base e all'estremità 5' una sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione *Kpn* I (GGTAC/C).

- **CHB2 KPN R:** 5'-ACGGTACCGTGCTGCGGAATC-3' primer reverse di 21 nt disegnato sulla sequenza del terminatore del gene *cbh2* di *T.reesei* (Mach et al., 1994), con tredici basi omologhe alla regione 2633-2646 bp a valle del terminatore *cbh2* e una sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione *Kpn* I (GGTAC/C) all'estremità 5'.

Il protocollo utilizzato per i cicli termici è stato il seguente:

1) DENATURAZIONE INIZIALE (hot start)94°C	2 min.
2) AMPLIFICAZIONE (32 cicli)		
DENATURAZIONE INIZIALE	94°C	30 sec.
ANNEALING (APPAIAMENTO)	*	45 sec.
ALLUNGAMENTO		72°C
*		
3)ALLUNGAMENTO FINALE	72°C	10 min.

*Le temperature di annealing e il tempo di allungamento sono stati diversi per le varie combinazioni di primers:

- per la coppia di primer utilizzata per l'amplificazione del gene *Avr4* è stata usata una temperatura di annealing di 62°C e per l'allungamento a 72°C un tempo di 1 minuto e 30 secondi.
- per la coppia di primer utilizzata per l'amplificazione del

gene *Avr4-ech42* è stata usata una temperatura di annealing di 56°C e per l'allungamento a 72°C un tempo di 2 minuti e 30 secondi

Per tutte le reazioni di PCR sono state utilizzate le seguenti condizioni:

COMPONENTI DELLA REAZIONE	CONCENTRAZIONI FINALI
Taq polimerasi	1 unità
MgCl ₂ 50 mM	2 mM
PCR buffer 10x	1x
DNTPs (10 mM)	2 mM
DNA	20 ng
Primer	20 picomoli
Acqua	Fino a 50 µl

2.5.2 Clonaggio del gene *avr4* e *avr4-ech42*

2.5.2.1 ELUIZIONE DA GEL

Le bande elettroforetiche degli amplificati ottenuti tramite PCR e quelle dei plasmidi e degli inserti digeriti, sono stati rimossi dal gel d'agarosio con l'ausilio di un bisturi e purificate utilizzando il protocollo QIAEX II (Qiagen). La procedura consiste nella dissoluzione dell'agarosio a 50°C in presenza di opportuni reagenti e nel successivo assorbimento del DNA ad una resina. I campioni di DNA purificati dal gel sono stati risospesi in acqua. Un'aliquota di ciascuno di essi è stata quantizzata, la parte restante è stata usata per la ligazione.

2.5.2.2 LIGAZIONE NEI VETTORI PLASMIDICI

Per il clonaggio dei frammenti di DNA amplificati mediante PCR è stato usato il plasmide pGEM®-T Easy Vector (Promega) (figura 7).

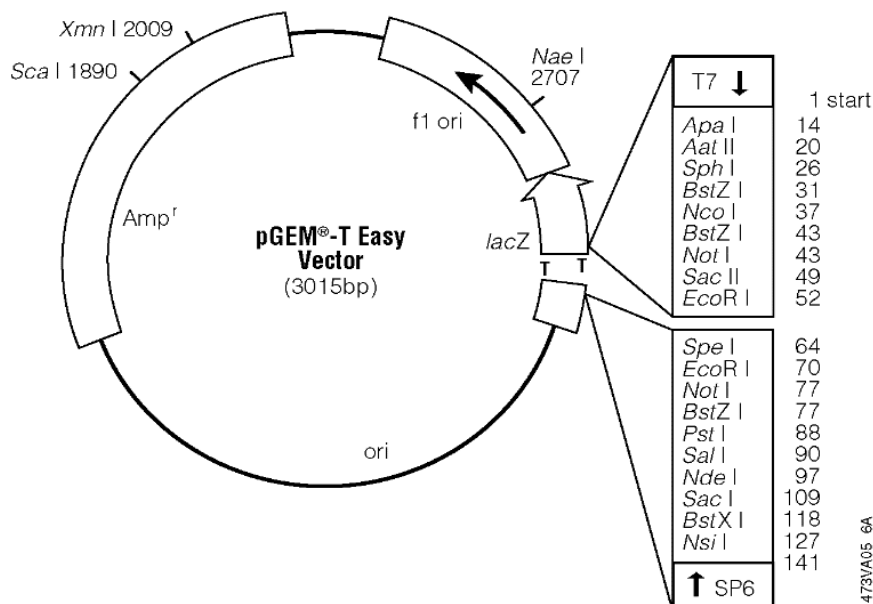


Figura 7. Mappa circolare del vettore pGEM®-T Easy riportante: sito di inizio della trascrizione dell'RNA polimerasi T7, sito di inizio della trascrizione dell'RNA polimerasi SP6, regione timidilata per il clonaggio di frammenti di DNA, punto di interruzione della sequenza dell'operone *Lac*, regione gene di resistenza all'ampicillina codificante per la β-lattamase.

Tale vettore, recando un residuo di timina al 3' terminale di ciascuna estremità, risulta particolarmente efficace per il clonaggio di prodotti di PCR ottenuti utilizzando enzimi, quali la Taq polimerasi, che aggiungono uno o più residui di adenina al terminale 3' delle sequenze amplificate.

Le ligazioni sia degli amplificati mediante PCR in pGEM®-T Easy che del gene *avr4* in pZEGA2 e del gene *avr4-ech42* in pUR5750 sono state effettuate utilizzando 50 ng di vettore in presenza di un eccesso molare 3:1 dell'inserto di DNA da clonare. L'enzima utilizzato è la T4 DNA ligasi (PROMEGA), in un volume di reazione totale di 20 µl. La miscela di reazione è stata mantenuta

per tutta la notte a 15°C, il DNA è stato precipitato per centrifugazione dopo aver aggiunto 1/10 di volume di acetato di sodio 3M pH 5.2 e 2,5 volumi di etanolo assoluto ed aver mantenuto il campione a -20°C per 30 minuti. Il precipitato è stato lavato con etanolo 70%, brevemente asciugato all'aria e ridisciolto in 10 µl di acqua bidistillata sterile.

2.5.2.3 ELETTOPORAZIONE IN CELLULE DI E. COLI

Dopo la reazione di ligazione si è proceduti alla trasformazione del DNA plasmidico in cellule competenti di *E.coli*, ceppo DH5α, mediante elettroporazione, servendosi di un elettroporatore Gene Pulser 2 (Bio Rad). A 90 µl di una sospensione in acqua di cellule competenti è stato aggiunto il DNA plasmidico proveniente dalla ligazione (5 µl). La miscela è stata trasferita in apposite cuvette che, dopo essere state conservate in ghiaccio per 30-60 secondi, sono state inserite nell'apposito alloggiamento dell'elettroporatore, quest'ultimo è stato settato a 25 µF, 2.4 kV e 200 ohm. Dopo la scarica elettrica, la cuvetta è stata immediatamente rimossa e, alla miscela in essa contenuta, è stato aggiunto 1ml del mezzo di coltura SOC (Bacto-tryptone 2%, Bacto yeast extract 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgSO₄ 10 mM, MgCl₂ 10 mM, glucosio 20 mM). La rapida addizione di SOC risulta molto importante per la "ripresa" dei trasformanti dopo aver subito lo shock elettrico. La sospensione cellulare, trasferita in appositi tubi di coltura, è poi stata incubata a 37° C per 1 ora in agitazione. Successivamente aliquote da 100 e 200 µl della sospensione batterica sono state piastrate sul mezzo LB (Luria Bertani) costituito da 5 g/l di Bacto yeast extract, 10 g/l di peptone, 5mg/l di NaCl e 15 g/l di agar tecnico e contenente come mezzo selettivo 100 µg/ml di ampicillina.

Nel caso dell'elettroporazione del plasmide pGEM®-T Easy al substrato sono stati aggiunti 20 mg/ml di 5 bromo-4-cloro-3-indolil- β -galattoside, substrato dell'enzima della β -galattosidasi e 0.1 mg/ml di isopropil- β tiogalattopiranoside, induttore del gene della β -galattosidasi. Tale substrato permette l'analisi dei trasformanti recanti l'inserto, grazie ad un processo denominato "inattivazione inserzionale". Infatti, il sito di clonaggio del plasmide pGEM®-T Easy è localizzato all'interno del gene Lac Z, codificante per l'enzima β -galattosidasi. L'inserzione del frammento di DNA esogeno interrompe la sequenza codificante del gene che pertanto non viene espresso. Le colonie di *E. coli* trasformate con plasmidi contenenti l'inserto appaiono bianche, mentre quelle contenenti il plasmide vuoto appaiono blu.

Le colonie sviluppatasi dopo 16-18 ore di incubazione a 37° C, sono state trasferite in tubi contenenti 3ml di LB + ampicillina 100 μ g/ml e incubate a 37° C per 16 ore in agitazione in modo da ottenere una concentrazione di cellule batteriche sufficiente per la successiva estrazione di DNA plasmidico.

2.5.2.4 ESTRAZIONE DEL DNA PLASMIDICO

L'estrazione del DNA plasmidico di *E.coli* è stata effettuata a partire da 3 ml di una coltura batterica, fatta crescere in LB per circa 16 ore, secondo il protocollo di lisi alcalina descritta da Sambrook *et al.*, (1989), a cui sono state apportate alcune modifiche. Il pellet batterico è stato risospeso in 100 μ l di soluzione di risospensione (soluzione I 50 mM glucosio, 25 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA pH8), agitando vigorosamente. Alla miscela sono poi stati aggiunti 200 μ l della soluzione di lisi (soluzione II 0.2 N NaOH, 1% SDS), il tubo è stato invertito rapidamente per cinque

volte ed è stato conservato su ghiaccio. Alla miscela sono stati quindi aggiunti 150 μ l della soluzione di neutralizzazione (soluzione III 60 ml di acetato di potassio 5 M, 11.5ml di acido acetico glaciale, 28.5 ml di acqua), Il tubo è stato invertito per più volte al fine di disperdere la soluzione III attraverso il lisato batterico, ed il tutto è stato mantenuto su ghiaccio per 5-6 minuti. Il lisato batterico ottenuto è stato centrifugato due volte a 12000g per 5 minuti a 4° C ed in entrambe i casi si è prelevato il surnatante contenente gli acidi nucleici. Il DNA a doppio filamento è stato poi fatto precipitare aggiungendo alla fase acquosa 2 volumi di etanolo assoluto e centrifugando a 12000g per 5 minuti a 4° C, dopo aver conservato la miscela per 5 minuti a 4° C. Il surnatante è stato allontanato ed il pellet contenente il DNA è stato lavato con 1 ml di etanolo 70% (volume:volume) ed è stato asciugato all'aria per circa 10 minuti. Dopo tale tempo è stato risospeso in 50 μ l di TE (pH 8) a cui sono stati aggiunti 2 μ l di RNAsi A (Sigma) (20 μ g/ml). Il DNA è stato quantizzato sul gel di agarosio per comparazione visiva della fluorescenza emessa in presenza di bromuro d'etidio e di quantità note di DNA standard.

2.6 Trasformazione di Agrobacterium tumefaciens

Il ceppo LBA1100 di *A.tumefaciens* cresciuto su piastra contenente LB agarizzato più spectinomicina (250 μ g ml⁻¹) è stato reso competente alla trasformazione nel seguente modo:

5ml di LB liquido sono stati inoculati con il ceppo LBA1100 e fatti crescere a 28°C per 16 ore, questi sono stati usati come starter per una nuova coltura di 50ml di LB cresciuta per altre 20 ore a

28°C. Le cellule quindi sono state centrifugate, ed il pellet è stato risospeso in 500 µl di CaCl₂ 20 mM sterile. Ad aliquote di 100 µl di cellule batteriche è stato aggiunto 1µg di DNA del costrutto pURA4E. Il tutto è stato congelato in azoto liquido e scongelate in agitazione a 37°C per 5 minuti. A questo punto è stato aggiunto 1ml di LB e la miscela è stata posta a crescere a 28°C per 3 ore, alla fine delle quali è stata eseguita una centrifugazione. Il pellet è stato risospeso in 100 µl e piastrato su un mezzo contenente LB più kanamicina 50 µg/ml.

2. 7 Trasformazione di Trichoderma

I ceppi P1 di *T. atroviride* e di *T. viride* sono stati trasformati seguendo il protocollo della permeabilizzazione dei protoplasti con PEG.

I plasmidi usati per la trasformazione sono stati: pGA₄W₆ e pAN7.1 (fig.4) per la co-trasformazione e pURA4E (schema 1) per trasformare i ceppi con il gene *avr4-ech42*. È stata provata poi la trasformazione mediata da *A. tumefaciens* di spore di *T. atroviride* ceppo P1 e di *T. viride* con il ceppo LBA1100 di *A. tumefaciens* contenente il costrutto pURA4E.

2.7.1 Trasformazione di Protoplasti

Per la preparazione di protoplasti di *T. atroviride* ceppo P1 e di *T. viride* è stato utilizzato il protocollo di Penttilä et al. (1987). Sono state preparate piastre contenenti PDA (Potato Dextrose Agar) ed il mezzo è stato coperto con dischetti di cellophane precedentemente sterilizzati. Le piastre sono state inoculate con una

sospensione di conidi 1×10^6 /piastra di *T. viride* e del ceppo P1 di *T. harzianum*. I conidi sono stati lasciati germinare alla temperatura di 28°C per circa 20 ore fino alla formazione di un sottile strato di micelio. Successivamente, i dischetti sono stati trasferiti in condizioni di sterilità, in piastre Petri contenenti ciascuna 15 ml di una soluzione di enzimi litici Novozym 234 (Sigma) 5 mg di enzima/ml di tampone MgSO_4 1.2 M e di sodio fosfato 10 mM pH 5.8. Il micelio è stato digerito a 28° C per circa 3 ore, fino alla completa lisi delle pareti delle ife (la reazione è stata monitorata al microscopio ottico). La sospensione è stata filtrata attraverso lana di vetro sterile, ed a questa è stato aggiunto un ugual volume di tampone contenente sorbitolo 0,6 M e tris-HCl 0,1M pH 7.0. La sospensione è stata centrifugata a 4° C alla velocità di 4000 g/minuto per 15 minuti. I protoplasti, accumulatisi all'interfase, sono stati raccolti e lavati due volte con lo stesso tampone. Infine, sono stati risospesi nel tampone sorbitolo 1,2 M, CaCl_2 10 mM e di Tris-HCl 10 mM pH 7.5 e contati. Le miscele di trasformazione del volume di 260 μl sono state preparate in tubi da 15 ml sterili aggiungendo nel seguente ordine:

200 μl della sospensione di protoplasti concentrata 10^7 /ml

10 μg di DNA plasmidico in 10 μl di acqua

50 μl di tampone A (PEG 8000 25%, CaCl_2 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5).

Le miscele sono state incubate su ghiaccio per 20 minuti. Dopo tale tempo, sono stati aggiunti 2 ml di tampone A e poi 4 ml di tampone B (sorbitolo 1,2 M, CaCl_2 50 mM e Tris-HCl 10 mM pH 7.5). Sono state quindi prelevate aliquote da 1000, 500, 250 e 125 μl che, aggiunte a 4 ml di substrato selettivo, sono state versate in piastre Petri già contenenti lo stesso substrato di crescita. La

selezione è stata effettuata utilizzando nel mezzo di crescita (PDA) 100 ppm di igromicina B, sia per i protoplasti trasformati con il costrutto pURA4E sia per i protoplasti co-trasformati con i plasmidi pAN7.1 e pGA₄W₆. Le piastre sono state lasciate ad incubare a 30° C ed analizzate dopo circa 3-4 giorni. Le colonie cresciute sono state trasferite nuovamente su mezzo selettivo fino alla sporulazione. Per ottenere l'omocariosi, singole spore sono state isolate da ciascun mutante eterocariotico selezionato e trasferite nuovamente su mezzo selettivo. Le colture monoconidiche sono state ripetute tre volte per assicurare una completa omocariotizzazione della progenie (Woo et al., 1999).

2.7.2 Trasformazione mediata da *A. tumefaciens*

La procedura di trasformazione mediata da *A. tumefaciens* si è basata sul protocollo di Zeilinger (2004).

Coltura di *Agrobacterium*

Tre ml di coltura di *A. tumefaciens* ceppo LBA1100 cresciuto per 48 ore a 28°C sono stati centrifugati a 12000 rpm per 1 minuto. Il pellet è stato lavato nel mezzo d'induzione (IM) e poi risospeso in 200µl di IM, che sono serviti per inoculare 10 ml di IM in presenza o in assenza di Acetosiringone (200µM). La coltura è stata mantenuta a 28°C per altre 5-6 ore.

Co-coltivazione

Dischi di cellophane trasparenti sterili sono stati posizionati su piastre di IM+/-AS. Cento µl di spore di *Trichoderma* 10⁶/ml miscelati a 100µl di sospensione di *Agrobacterium* e sono stati lasciati per 30 minuti circa a 25°C. La miscela è stata poi piastrata sul cellophane delle piastre di IM+/-AS e queste ultime sono state incubate per 24 ore a 22°C.

Selezione

Dopo le 24 ore di incubazione i filtri di cellophane sono stati rimossi dalle piastre di IM+/-AS e sono stati messi su nuove piastre contenenti PDA addizionate con 100µg/ml di igromicina B e 200µM di cefotaxime (batteriostatico usato per inibire la crescita di *A. tumefaciens*). I filtri sono stati immediatamente ricoperti con uno strato (overlay) di 5 ml di PDA (a 48°C) con igromicina B 100µg/ml. Le piastre sono state incubate a 28°C e dopo 4-5 giorni sono apparsi i trasformanti.

2.8 Caratterizzazione Genetica dei Trasformanti

I trasformanti sono stati selezionati e sottoposti ad analisi genetico-molecolare mediante PCR, Southern blotting e northern blotting. Le analisi Southern e northern sono state effettuate utilizzando come sonda l'intero gene *avr4*.

2.8.1 Estrazione del DNA di *Trichoderma*

Il DNA genomico è stato ottenuto mediante estrazione con fenolo-cloroformio a partire da micelio allevato in coltura agitata in PDB per 72 ore alla temperatura di 24° C. La biomassa è stata raccolta separando il substrato per filtrazione con carta Miracloth (Calbiochem), lavata ripetutamente con acqua distillata sterile e asciugata con carta assorbente.

Il micelio è stato dapprima immerso in azoto liquido e poi posto in tubi in polipropilene da 50 ml a liofilizzare. La biomassa liofilizzata è stata polverizzata con l'ausilio di una spatola e immediatamente sottoposta ad estrazione. Un grammo di micelio

liofilizzato è stato sospeso in 10 ml di buffer di estrazione (NaCl 0,5 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, SDS 1% pH 7.5), al quale sono stati aggiunti 5ml di fenolo e 5 ml di cloroformio-alcool isoamilico (24:1). La sospensione è stata agitata delicatamente e quindi centrifugata a 4° C per 30 minuti a 12000 rpm. La fase acquosa recuperata è stata digerita con 50µl di RNasi (10 mg/ml) per 1 ora a 37° C. Terminata la digestione sono stati aggiunti 10 ml di fenolo-cloroformio, il campione è stato agitato delicatamente e centrifugato nuovamente. La fase acquosa è stata sottoposta ad una nuova estrazione fenolo-cloroformio e ad una con solo cloroformio. Alla fase acquosa recuperata (contenente il DNA genomico) è stata aggiunta isopropanolo e il tutto è stato centrifugato a temperatura ambiente per 15 minuti. Il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo al 70%, lasciato asciugare bene e poi risospeso in TE (Tris 10 mM - EDTA 10 mM pH 8.0). Il DNA ottenuto è stato quantificato tramite elettroforesi in gel d'agarosio per comparazione con un DNA standard.

2.8.2 Analisi Southern Blotting

Aliquote di 20 µg di DNA genomico di *Trichoderma* sono state digerite con 50 unità dell'enzima di restrizione Hind III (non taglia all'interno del gene *avr4*) a 37°C per 16 ore, ed i frammenti ottenuti sono stati separati per elettroforesi (40V per 6 ore) su gel d'agarosio allo 0.7 % (p/v) in tampone TAE (Tris 10 mM, Acetato di sodio 1 mM, EDTA 1 mM pH 7.5). Dopo l'elettroforesi, il gel è stato immerso, due volte per 15 minuti, in una soluzione contenente NaOH 0.5 M e NaCl 1.5 M, al fine di ottenere la denaturazione del DNA, e neutralizzato per immersione, due volte per 15 minuti, in una soluzione di Tris-HCl 0.5 M pH 7.5, NaCl 3 M. La migrazione

dei frammenti su una membrana di nylon (Nytran 13 N, Schleicher e Schuell) è stata ottenuta per capillarità in presenza di tampone SSC 10X (l' SSC 1X è costituito da una soluzione tamponata a pH 7.0, di NaCl 0.14 M e citrato di sodio 0.01 M). Prima dell'ibridazione il DNA è stato fissato sulla membrana tramite esposizione ai raggi UV (1.5 kJ/min) per 3 minuti, per ciascuno dei lati, e la membrana è stata preibridizzata in un'apposita soluzione (Sambrook et al., 1989) a 42° C. Per gli esperimenti descritti nel presente lavoro sono state utilizzate tecniche non radioattive di marcatura delle sonde molecolari. In particolare è stato utilizzato il sistema DIG della Roche che prevede la marcatura della sonda con digossigenina tramite PCR. Dopo la preibridazione, la membrana è stata posta a contatto con la soluzione contenente la sonda marcata con digossigenina (la concentrazione di sonda utilizzata era pari a 25 ng/ml nella soluzione di ibridazione), precedentemente denaturata per immersione in acqua a 100° C per 10 minuti e rapido raffreddamento su ghiaccio. La fase di ibridazione è stata protratta per la durata di una notte a 65°C. Dopo tale passaggio la membrana è stata sottoposta a 3-4 lavaggi in presenza di una soluzione tampone SSC a pH 7.0 contenente lo 0.1% in peso di SDS, 750mM di NaOH e 75 mM di sodio citrato. Per la rivelazione dell'avvenuta ibridazione si è usata la procedura indicata dal protocollo Roche, che prevede il trattamento con un anticorpo diretto contro la digossigenina e marcato con l'enzima fosfatasi alcalina, seguito da incubazione in una soluzione di un substrato chemiluminescente per la fosfatasi (CPD Star). La defosforilazione enzimatica di tale substrato porta alla formazione dell'anione metastabile dioxene fenolato che si decompone ed emette luce a 466 nm. Il segnale

luminoso serve ad impressionare la lastra autoradiografica, il cui sviluppo rivela i risultati dell'avvenuta ibridazione.

2.8.3 Estrazione dell'RNA di *Trichoderma*

Per l'estrazione dell'RNA dal micelio di *T. atroviride* ceppo P1 ci si è serviti del protocollo basato sulla tecnica descritta da Logemann et al. (1987). Al micelio polverizzato mediante l'ausilio di un mortaio e di un pestello sono stati aggiunti per ogni grammo di micelio, 2 ml di un tampone a pH 7.0 contenente idrocloruro di guanidina 8M, acido morfolinetansulfonico (MES) 20 mM, EDTA 20 mM, β -mercaptoetanololo 50 mM. La mistura così ottenuta è stata agitata vigorosamente per 2 minuti, quindi è stato aggiunto un ugual volume di fenolo, cloroformio ed alcool isoamilico (25:24:1 in volume) pH 7.0. Dopo aver centrifugato per 15 minuti a 4000 g/minuto, la fase acquosa è stata prelevata ed è stato aggiunto un ugual volume di una soluzione di cloroformio ed alcool isoamilico (24:1), seguito da centrifugazione. Al surnatante è stato aggiunto un terzo di una soluzione di cloruro di litio, seguito da un'incubazione a 4°C per 16 ore, tale da consentire la precipitazione selettiva dell'RNA. Trascorse le 16 ore si centrifuga a 10000 g/minuto per 30 minuti, il pellet ottenuto è stato lavato con 1 ml di una soluzione 2M di cloruro di litio e, successivamente con una soluzione di etanolo freddo al 70% in volume. Il pellet di RNA viene poi risospeso in acqua e riprecipitato in presenza di 1/10 di volume di una soluzione 3M di sodio acetato e di 2.5 volumi di etanolo. Il pellet lavato con etanolo freddo al 70% e lasciato asciugare bene è poi risospeso in acqua. L'RNA ottenuto è stato quantificato allo spettrofotometro.

2.8.4 Analisi Northern Blotting

Aliquote di 20µg di RNA totale sono state denaturate a 65°C in presenza di formaldeide e formammide e poi separate elettroforeticamente in un gel di agarosio/formaldeide contenente l'1% in peso di agarosio, e il 6 % in volume di formaldeide, in un tampone di MOPS 40mM a pH7.0.

La corsa elettroforetica è stata effettuata a 45V per 6 ore. Dopo questo tempo il fronte di migrazione raggiungeva, di norma, i $\frac{3}{4}$ della lunghezza del gel. Il trasferimento dell'RNA sulla membrana di nylon (Nytran 13N) è stato fatto per capillarità in un tampone SSC 10X, in modo analogo alla procedura descritta per l'analisi Southern, così come i successivi passaggi di fissaggio, preibridazione, ibridazione, lavaggio e rilevazione del segnale.

2.9 Caratterizzazione Biochimica dei Trasformanti

Per valutare la presenza di AVR4 nei trasformanti sono state separate con SDS-PAGE varie frazioni proteiche: proteine di filtrati colturali (F.C.) che non legano la chitina, proteine di filtrati colturali che legano la chitina, proteine da micelio presenti nella parete, proteine da micelio intracellulari. Sono stati inoltre analizzati i profili enzimatici dei trasformanti di *Trichoderma* contenenti il gene *avr4* con promotore costitutivo *gdp* e comparati con quello del ceppo selvatico P1.

2.9.1 Preparazione delle Frazioni Proteiche da Filtrati Colturali e da Micelio

Venti ml di filtrato colturale (F.C.) dei trasformanti e dei wt allevati per sette giorni in MS (Murashige and Skoog) e + 1% di glucosio sono stati portati a secco e risospesi in 1ml di acqua (20X) e successivamente dializzati per 16 ore e poi liofilizzati. I filtrati colturali liofilizzati sono stati sottoposti al protocollo “chitin-binding” (proteine che legano la chitina) per separare le proteine che legano la chitina da quelle che non la legano. I filtrati colturali liofilizzati sono stati risospesi in 1ml di buffer (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8), a cui sono stati aggiunti circa 20 mg di chitina di granchio (Sigma) e mantenuti in agitazione per circa due ore a 25°C. La sospensione è stata poi centrifugata per tre minuti a 13.000 rpm. Il surnatante, che rappresenta la frazione di proteine che non legano la chitina, è stato congelato in azoto liquido e liofilizzato. Il pellet è stato lavato due volte con lo stesso buffer ed è stata rimossa ogni traccia di liquido. Il pellet di chitina è stato risospeso in 200µl di SDS 1% ed è stato mantenuto a 95°C per 10 minuti. Successivamente la miscela è stata centrifugata e il surnatante è stato recuperato, congelato in azoto liquido e liofilizzato, ottenendo la frazione di proteine che si lega alla chitina.

Al micelio dei trasformanti e dei wt cresciuti per sette giorni in SM + 1% di glucosio è stato aggiunto 1ml di buffer A (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8) e “glass beads” per rompere le pareti tramite agitazione per 1 minuto. In seguito a centrifugazione per due minuti il surnatante è stato raccolto congelato in azoto liquido e messo a liofilizzare. In tal modo è stata preparata la frazione di proteine intracellulari. Il pellet, invece, è stato lavato tre volte con 1ml del buffer A aggiungendo alla fine dei lavaggi 500µl di SDS

1%. I campioni sono stati mantenuti a 95°C per otto minuti e centrifugati per due minuti. Terminata la centrifugazione è stato prelevato il surnatante, che è stato congelato in azoto liquido e liofilizzato. In tal modo è stata preparata la frazione di proteine di parete.

2.9.2 SDS-PAGE

Le frazioni proteiche liofilizzate sono state risospese nel buffer di corsa 1X SDS e separate mediante elettroforesi verticale in condizioni denaturanti tricina-SDS-PAGE. E' stata usato il sistema per elettroforesi "miniprotean Bio Rad". Il gel di corsa conteneva il 16 % di acrilammide mentre quello di separazione il 4 % di acrilammide, usando come tampone Tris 3 M + 0.3 % SDS.

Tampone al catodo 0.1 M Tris, 0.1 M tricina e 0.1% SDS pH 8.5.

Tampone all'anodo 0.2 M Tris-HCl pH 8.9.

Il gel è stato corso a 120 volts per 1 ora e 30 minuti. A corsa ultimata le proteine sono state colorate con nitrato di argento e/o con Blue di Coomassie (Morrissey, 1981).

2.9.3 Analisi Enzimatica di Glucanasi e Chitinasi

Allo scopo di analizzare i profili enzimatici dei trasformanti di *Trichoderma* contenenti il gene *avr4* con promotore costitutivo *gdp* e compararli con quello del ceppo selvatico P1, i ceppi sono stati allevati in coltura liquida in presenza di diverse sorgenti di carbonio.

Beute contenenti 50 ml di PDB sono state inoculate con 40 µl di una sospensione di conidi (1×10^6 /ml) e lasciate in agitazione per 48 ore a 25° C. La biomassa prodotta, raccolta con l'ausilio di un setaccio, è stata trasferita asetticamente in 250 ml di mezzo salino

SM (Harman et al., 1993) contenente come unica fonte di carbonio o l'1% (peso/volume) di saccarosio, o l'1% di estratto di chitina di granchio (sigma) (peso/volume), o lo 0,5 % di basidiocarpi di *Agaricus bisporus* liofilizzati. I filtrati colturali sono stati raccolti dopo 8 giorni di crescita a 25°C e 150rpm e sottoposti a filtrosterilizzazione (filtri Millipor 0,8-0,6-0,2 µm) e quindi a dialisi con acqua distillata per 48 ore a 4° C, utilizzando membrane con esclusione molecolare a 3,5 kDa. Infine, i filtrati dializzati sono stati concentrati circa 20 volte usando il polietilenglicole (PEG 8000) e conservati a -20° C fino al loro uso per i saggi enzimatici.

Le concentrazioni di proteine totali nei vari filtrati sono state determinate con il saggio Bradford (Bio Rad). Per tutti i campioni le concentrazioni di proteine sono state equalizzate. L'attività endochitinasica è stata misurata valutando la riduzione di torbidità di una sospensione di chitina colloidale 10 mg/ml in tampone potassio fosfato 50 mM pH 6.7 (Harman et al., 1993). Per effettuare questo saggio, sono stati incubati in tubi da 10 ml, 500 µl di sospensione di chitina e 500 µl di frazioni di filtrato da saggiare, per 24 ore a 30° C. Terminata l'incubazione, il volume nei tubi è stato portato a 5 ml con acqua bidistillata sterile ed è stata misurata l'assorbanza ottica a 510 nm mediante lettura spettrofotometrica. La riduzione di torbidità della sospensione è stata comparata al controllo contenente acqua al posto del filtrato colturale.

Per determinare l'attività esochitinasica, è stato utilizzato un saggio in grado di misurare l'attività N-acetilglucosaminidasica (NAGase) e quella chitobiosidasica (biase). Il substrato di reazione usato per misurare l'attività N-acetilglucosaminidasica è il p-nitrofenil-β-D-N-acetilglucosaminide 0.3mg/ml (Sigma), mentre per l'attività chitobiosidasica è stato utilizzato il p-nitrofenil-β-D-

N-N'-diacetilchitobiosio 0.3mg/ml (Sigma), entrambi preparati in tampone potassio fosfato 50 mM pH 6.7. Trenta μ l di substrato enzimatico, 10 μ l di filtrato colturale da saggiare, e 50 μ l di tampone, sono stati aggiunti nell'ordine nei pozzetti della piastra. I controlli sono stati ottenuti ponendo al posto del filtrato colturale solo il tampone. La piastra è stata incubata a 50° C per 30 minuti, e poi sono stati aggiunti 30 μ l di Na₂CO₃ 0.4 M per arrestare la reazione enzimatica. Attraverso la misura dell'assorbanza a 405 nm (spettrofotometro Bio Rad) è stata valutata la quantità di p-nitrofenolo rilasciato dall'attività enzimatica.

L'attività β -1,3 glucanasica è stata determinata misurando secondo Ashwell (1957) la quantità di gruppi riducenti rilasciati dall'attività enzimatica su laminarina (un polimero del glucosio con legami β -1,3), come descritto da Lorito et al. (1994).

Il saggio viene effettuato preparando una soluzione di laminarina (Sigma) 1 mg/ml in tampone citrato-fosfato 50 mM pH 6.7. A 250 μ l del suddetto substrato sono stati aggiunti 250 μ l di filtrato da saggiare (acqua nei controlli) in tubi di polipropilene da 10 ml. I tubi sono stati incubati a 37° C per 2 ore in leggera agitazione. Contemporaneamente sono stati preparati gli standard per la curva di taratura utilizzando crescenti concentrazioni di glucosio (20, 40, 80, 120, 160, 200, 240 μ g/ml). Terminata l'incubazione, alle miscele di reazione sono stati aggiunti 250 μ l di reagente rameico (fosfato sodico bibasico 28 gr/L, tartrato potassio-sodico 40 gr/L, NaOH 1N 100 ml/L, solfato di rame pentaidrato 10%, solfato anidro di sodio 180 gr/L). I campioni così trattati sono stati incubati a 120° C per 20 minuti e poi raffreddati rapidamente su ghiaccio. Ad essi sono stati aggiunti 250 μ l di arseniomolibdato

di ammonio (ammonio molibdato 50 gr/lt, acido solforico concentrato 42 ml/lt, sodio arsenato 6 gr/lt). Tutti i campioni sono stati portati, con l'aggiunta di acqua, ad un volume finale di 8.5 ml prima di effettuare la lettura spettrofotometrica dell'assorbanza a 510 nm. La concentrazione di gruppi riducenti rilasciati dall'attività enzimatica è stata stimata come unità glucosio equivalenti mediante confronto con la curva di taratura.

Ogni saggio enzimatico è stato effettuato almeno tre volte con almeno tre repliche per ogni campione.

2.10 Caratterizzazione Fisiologica dei Trasformanti

2.10.1 Saggi di Competizione in Vitro

L'attività antagonista dei trasformanti è stata valutata mediante saggi di competizione in piastra contro i funghi patogeni *B. cinerea*, *R. solani*, *A. alternata*, *Penicillium* spp.

I saggi sono stati condotti su piastre petri contenenti SM agarizzato più 1 % saccarosio come fonte di carbonio. I due funghi (antagonista e patogeno) sono stati inoculati a 3 cm di distanza. La crescita radiale dei funghi è stata valutata ogni 24 h mantenendo le piastre a 25 °C.

2.10.2 Saggi in Vivo con Linee di Pomodoro

Sono stati effettuati saggi *in vivo* per valutare la reazione delle linee isogeniche di pomodoro MM-Cf4 e MM-Cf5 cresciute in presenza dei trasformanti di *Trichoderma* contenenti il gene *avr4* con promotore costitutivo *gdp*. I semi delle linee MM-Cf4 e MM-Cf5 di pomodoro sono stati prima disinfettati con ipoclorito di sodio al 1 % per 15 minuti e successivamente risciacquati con acqua

sterile. I semi così ottenuti sono stati ricoperti con sospensioni conidiche (immergendoli in una sospensione di 10^8 /ml) dei diversi isolati di *T. atroviride*. I semi delle linee di pomodoro sono stati quindi messi nel terreno ad una profondità di 1 cm ed i vasetti, opportunamente irrigati, sono stati mantenuti a temperatura, umidità e fotoperiodo controllati. Dopo cinque settimane è stata valutata la crescita delle piante e il peso fresco delle radici e della parte aerea. Sono stati inoltre effettuati degli isolamenti su PDA dalle radici per confermare la presenza di *Trichoderma*. Le radici sono state quindi osservate al microscopio ottico.

2.10.3 Microiniezione di Filtrati Colturali in Pianta

Venti ml di filtrato colturale (F.C.) dei trasformanti e dei wt cresciuti per sette giorni in MS + 1% di glucosio sono stati sottoposti a precipitazione acetone (10ml F.C.+40ml acetone) e messi a -20°C per circa due ore. Successivamente sono stati centrifugati a 16.000 rpm per 10 minuti. Il pellet ottenuto è stato lavato con una miscela acqua acetone 1:4. Il pellet, una volta asciugato, è stato risospeso in 2 ml di acqua distillata sterile. I campioni così ottenuti sono stati sottoposti a microdialisi per quattro giorni con membrane dotate di cut-off a 3500 Da.

Il filtrato colturale precipitato e dializzato è stato infiltrato con microsiringhe nelle foglie delle due linee di pomodoro, 4E1 e 4D2, di piantine di 5 settimane.

2.10.4 Estrazione di Fitoalessine da Foglia

Per l'estrazione di fitoalessine è stato utilizzato il protocollo messo a punto da De Wit e Flach (1979). Foglie di linee di pomodoro MM-Cf4 e MM-Cf5, i cui semi sono stati

preventivamente ricoperti con spore del *Trichoderma* ceppo selvatico o degli isolati trasformati, sono state raccolte, congelate in azoto liquido e omogeneizzate in metanolo 10ml/g di peso fresco. L'omogeneizzato è stato mantenuto per circa due ore in infusione a temperatura ambiente, quindi filtrato con carta Whatman e portato a secco con rotovapor. I residui sono stati risospesi in metanolo al 60% (15 ml metanolo/g tessuto fresco). È stato aggiunto un volume di cloroformio ed è stata effettuata una separazione delle due fasi mediante imbuto separatore. La frazione con cloroformio è stata portata a secco e risospesa in 3 ml di acetone. La frazione acetonica è stata analizzata per cromatografia su strato sottile (TLC) e per HPLC (con colonna C-18). La TLC è stata corsa con cloroformio e metanolo nel rapporto 95:5 ed è stata sviluppata con una soluzione di vanillina (3g) in 100ml di etanolo acidificato con 0,5 ml di acido solforico e messa in stufa per 10 minuti a 100° C, allo scopo di rilevare molecole quali i sesquiterpeni.

2.11 Sequenziamento di Proteine

Una banda di circa 10 kDa separata mediante SDS-PAGE è stata escissa dal gel di poliacrilammide per essere sottoposta a sequenziamento amminoacidico secondo la reazione di degradazione di Edman. La sequenza amminoacidica è stata analizzata con il software BlastX, confrontandola con quelle contenute nella banca dati GeneBank del National Center for Biotechnological Information (consultabile al sito internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.12 Purificazione dell'mRNA

La purificazione dell'mRNA è stata effettuata con il GenEluiteTM mRNA Miniprep Kit (Sigma). A 100µg di RNA totale disciolti in 100µl di acqua sono stati aggiunti 15µl di una matrice di polystirene con oligo d(T). La miscela è stata incubata per 3 minuti a 70° C per denaturare l'RNA, e poi per 10 minuti a 25° C per permettere il legame dell'mRNA alla matrice di oligo d(T). Dopo aver centrifugato la miscela, il pellet è stato risospeso in 500µl di soluzione di lavaggio e caricato su filtri GenEluite spin filter per effettuare due lavaggi. A lavaggi ultimati, alle colonnine sono stati aggiunti 50µl di soluzione di eluizione, quindi il tutto è stato incubato a 70° C per 5 minuti e centrifugato.

2.1 Clonaggio del Gene hytral Tramite PCR-RACE 3'

La PCR-RACE 3' è stata effettuata utilizzando il sistema 5'/3'RACE (Boehringer), questo prevede l'utilizzo di un "oligo dT-anchor primer" e della trascrittasi inversa del virus AMV per la conversione dell'mRNA in cDNA e l'amplificazione tramite PCR del cDNA con un primer specifico e un "PCR anchor primer".

Sintesi del cDNA	PCR sul cDNA
1µg (5µl) di mRNA	1µl di cDNA
2µl di buffer reverse transcriptase 10X	1µl di dNTPs
2µl di dNTPs	1µl di PCR anchor primer
1µl di oligo dT-anchor primer	1µl di primer specifico Hydr F1
1µl di AMV reverse transcriptase	0,5µl di Taq DNA polimerasi
9µl di H ₂ O	5µl di buffer 10X
La miscela è stata incubata per 1 ora a 55°C e per altri 10 minuti a 65°C	3µl di MgCl ₂
	16,5µl di H ₂ O

Il protocollo utilizzato per i cicli termici della PCR è stato il seguente:

- | | | |
|-------------------------------------|------|---------|
| 1) DENATURAZIONE INIZIALE | 94°C | 5 min. |
| 2) AMPLIFICAZIONE (30 cicli) | | |
| - DENATURAZIONE INIZIALE | 94°C | 30 sec. |
| - ANNEALING (APPAIAMENTO) | 54°C | 45 sec. |
| - ALLUNGAMENTO | 72°C | 1 min. |
| 3) ALLUNGAMENTO FINALE | 72°C | 10 min. |

Primer utilizzati per la PCR-RACE 3'

- **oligo dT-anchor primer:**

5'GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'

primer che si appaia con la coda di polyA dell'mRNA che ha 16 T, 22 basi riconosciute da tre enzimi di restrizione (*Mlu I*,

Cla I, Sal I) all'estremità 5', e una base selettiva all'estremità 3' (V= A, C o G).

- **PCR anchor primer:**

5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3' primer reverse con sequenza omologa alle 22 basi dell'estremità 5' dell'oligo dT-anchor primer.

- **Hytra1 F1 primer:**

5'-GCTGTCTGCCCTACC-3' primer specifico forward di 15 nt disegnato sulla sequenza dei primi 5 amminoacidi all'N-terminale della proteina di circa 10 kDa del ceppo wt T-22 di *T. atroviride* (Paragrafo 11) separata tramite SDS-PAGE.

L'amplificato è stato subclonato nel vettore pGEM®-T Easy (Promega) ed è stato sequenziato.

2.14 Clonaggio di geni codificanti per trasportatori ABC in Trichoderma spp.

L'isolamento di geni di *Trichoderma atroviride* ceppo P1 (ATCC 74058), codificanti per trasportatori ABC, è stato realizzato mediante l'utilizzo di primers degenerati disegnati sulle sequenze conservate di geni codificanti per trasportatori ABC.

I prodotti di PCR ottenuti, sono stati purificati per elettroforesi in gel di agarosio, eluiti dallo stesso, clonati in opportuno vettore plasmidico e sequenziati.

2.14.1 Amplificazione tramite PCR di frammenti genici codificanti per trasportatori ABC

Le reazioni polimerasiche sono state condotte in un volume totale di 50 µl utilizzando come template il DNA genomico di *T. atroviride* estratto secondo quanto riportato al paragrafo 3.8.1

La miscela di reazione per la PCR viene preparata con i seguenti componenti:

COMPONENTI DELLA REAZIONE	CONCENTRAZIONI FINALI
Taq polimerasi	1 unità
MgCl ₂ 50 mM	2 mM
PCR buffer 10x	1x
DNTPs (10 mM)	2 mM
DNA	20 ng
Primer	20 picomoli
Acqua	Fino a 50 µl

I primers utilizzati per l'amplificazione sono:

Nome	Bp	Sequenza (5'-3')
PDasp1	23	ATGGGKGYGAGCGGKGCWGGKAA
PDasp2	23	ATGGGKGYGTCCGGKCGWGGKAA
PDsp1	20	GCAGARGGYTGRTGGATSGT
PDsp2	21	GATGCTGGGCTGRTGGATGGT

R=A+G; Y=C+T; K=G+T; S=G+C; W=A+T

Le condizioni della reazione di amplificazione effettuata usando le coppie di primers sopra indicate sono le seguenti:

1) DENATURAZIONE INIZIALE (hot start)	94°C	2 min.
2) AMPLIFICAZIONE (32 cicli)		
- DENATURAZIONE INIZIALE	94°C	30 sec.
- ANNEALING (APPAIAMENTO)	57-58 °C	45 sec.
- ALLUNGAMENTO	72°C	1 min
3) ALLUNGAMENTO FINALE	72°C	10 min.

2.14.2 Eluizione delle bande da gel e ligazione nel vettore plasmidico pGEM®-T Easy

Le bande elettroforetiche degli amplificati ottenuti tramite PCR, sono stati rimossi dal gel d'agarosio e purificate utilizzando il protocollo QIAEX II (Qiagen). I campioni di DNA purificati, sono stati risospesi in acqua. Un'aliquota di ciascuno di essi è stata quantizzata, la parte restante è stata usata per la ligazione.

Per il clonaggio dei frammenti di DNA amplificati mediante PCR è stato usato il plasmide pGEM®-T Easy Vector (Promega) (figura 7).

Le ligazioni sono state effettuate utilizzando 50 ng di vettore in presenza di un eccesso molare 3:1 dell'inserto di DNA da clonare. L'enzima utilizzato è la T4 DNA ligasi (PROMEGA), in un volume di reazione totale di 20 µl. il procedimento seguito è analogo a quello riportato al paragrafo 3.5.2.2.

2.14.3 Elettroporazione in cellule di *E. coli* ed estrazione del DNA plasmidico

Dopo la reazione di ligazione si è proceduti alla trasformazione del DNA plasmidico in cellule competenti di *E.coli*, ceppo DH5α, mediante elettroporazione. Il procedimento eseguito per

l'elettroporazione e per l'estrazione del DNA plasmidico è analogo a quello riportato ai paragrafi 3.5.2.5. e 3.5.2.6. rispettivamente.

2.14.4 Sequenziamento ed analisi BlastX

Una aliquota di DNA plasmidico è stata sottoposta ad analisi di restrizione per verificare la presenza del Dna esogeno nel vettore plasmidico. La reazione di digestione è stata realizzata usando l'enzima di restrizione *EcoRI* che, su pGEM-T easy, ha due siti di restrizione da entrambi i lati del sito di clonaggio. Dopo tale verifica, 1µg di DNA plasmidico purificato con Kit QIAGEN veniva inviato per il sequenziamento. Le sequenze nucleotidiche degli inserti così ottenute sono state sottoposte ad analisi in silico attraverso il programma BlastX che confronta, le sequenze nucleotidiche, con quelle contenute in banca dati GenBank del National Center for Biotechnological information (consultabile al sito internet <http://www.ncbi.gov>). L'analisi BlastX delle sequenze ottenute ha permesso di individuare 4 differenti trasportatori ABC denominati TABC1, TABC2, TABC3 e TABC4.

2.15 Caratterizzazione Molecolare per *Tabc2*

Sul DNA genomico estratto da micelio di *T. atroviride* ceppo P1 è stata effettuata una PCR utilizzando una coppia di primers specifica disegnata sulla parziale sequenza del gene *Tabc2*.

Tali primers:

TABC2 for 1= tgg vtv cat cca ggt tga;

TABC2 rev 1= cgg cag cga gct tcg taa g;

amplificano una regione di 354 bp. Questa parte del gene è stata utilizzata come sonda per l'analisi Southern blotting e per analizzare la libreria genomica di *T. atroviride* P1.

La sonda è stata marcata attraverso PCR DIG system (Roche)

2.15.1 Analisi Southern blotting

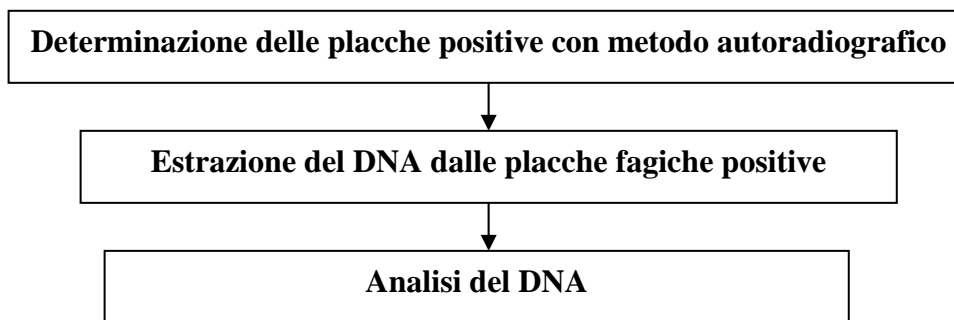
La procedura seguita per l'analisi Southern blotting è stata descritta al paragrafo 3.8.2 L'analisi è stata condotta su aliquote di 20 µg di DNA genomico di *Trichoderma* digerite (37°C per 16 ore) con 20 unità dell'enzima di restrizione BamHI (Promega).

2.15.2 Screening di libreria genomica

La libreria genomica di *T. atroviride* ceppo P1 è stata preparata dalla Clontech srl. Tale libreria è stata ottenuta impiegando il fago lambda EMBL3 SP6/T7 come vettore di ligazione e utilizzando il ceppo LE392 di *Escherichia coli* come ospite per la replicazione del fago.

Lo screening è stato realizzato seguendo il protocollo "Lambda Library" fornito dalla Clontech, riportato nello schema 2. La sonda utilizzata è stata la parziale sequenza del gene *Tabc2* marcata con digossigenina secondo il sistema DIG della Roche.





Schema 2. Schematizzazione delle fasi principali in cui si articola lo screening di una libreria seguendo il protocollo “Lambda Library” della Clontech.

2.15.2.1 DETERMINAZIONE DEL TITOLO DELLA LIBRERIA

5 µl del ceppo batterico LE392, conservato in una soluzione di glicerolo al 25% e mantenuto alla temperatura di -80°C , sono stati prelevati in opportune condizioni di sterilità e piastrati su terreno di coltura LB agar (Luria-Bertani: 0,5% estratto di lievito, 1% Bacto peptone, 1% NaCl, pH 7, 1,5 % agar). Le piastre sono state incubate a 37°C per circa 12 h. Una singola colonia batterica prelevata dalla piastra è stata inoculata in LB liquido contenente MgSO_4 10mM + 0,2% maltosio e incubata in agitazione a 37°C fino al raggiungimento di un OD_{600} pari a 2. A 4 tubi contenenti 100 µl di 1X lambda Dilution buffer (NaCl 1M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Tris-HCL pH7,5 0,35M) sono stati aggiunti 200 µl della coltura batterica ottenuta, e inoculati rispettivamente con 0, 2, 5, 10, µl della libreria fagica diluita 1: 250 con 1X lambda Dilution buffer (tabella 6)

Tubo	1X Lambda dilution buffer	Coltura batterica	Libreria fagica
1	100 µl	200 µl	0 µl
2	100 µl	200 µl	2 µl
3	100 µl	200 µl	5 µl
4	100 µl	200 µl	10 µl

Tabella 6. Diluizioni della libreria fagica

I tubi così preparati sono stati incubati a 37°C per 15 minuti, ad ognuno sono stati aggiunti 6ml di LB soft top agarosio +MgSO₄ (45°C) ed il tutto è stato versato su piastre petri (90mm di diametro) contenenti come substrato LB agar +MgSO₄ mantenute a 37 °C. Le piastre sono state incubate a 37 °C per un tempo massimo di 8h.

Il numero di placche fagiche ottenuto è stato contato e il titolo della libreria è stato determinato secondo la relazione:

$$\text{pfu/ml:} = \frac{\text{n. placche}}{\mu\text{l usati}} \times \text{il fattore di diluizione} \times 10^3 \mu\text{l/ml.}$$

2.15.2.2 SCREENING DELLA LIBRERIA

Una singola colonia batterica LE392 è stata inoculata in 15 ml di LB liquido contenente MgSO₄ 10mM + 0,2% maltosio e incubata in agitazione a 37°C per 12-15 h. A 200 µl della coltura batterica sono stati aggiunti 10 µl della libreria fagica diluita in 0,1 ml di 1X lambda (DB) dilution buffer e incubati a 37°C per 15 minuti. A questi sono stati aggiunti 6ml di LB soft top agarosio +MgSO₄ (45°C) e versati su piastre Petri (90mm di diametro) contenenti come substrato LB agar +MgSO₄. Le piastre sono state incubate a 37 °C per un tempo massimo di 8 h evitando la confluenza delle placche di lisi. Sulle piastre così ottenute è stata appoggiata una membrana di nylon N+ (Schleicher & Schuell), orientata, tracciando con una matita 3 punti in posizioni asimmetriche. Dopo 2 minuti la membrana è stata sollevata delicatamente dalla piastra e immersa in una soluzione contenente NaOH 0.5 M e NaCl 1.5 M, al fine di ottenere la denaturazione del DNA, e neutralizzata per immersione, per altri 5 minuti, in una soluzione di Tris-HCl 0.5 M pH 7.5, NaCl 3 M e di seguito lasciata

brevemente ad equilibrare in una soluzione contenente 2X SSC. I successivi passaggi di fissaggio, preibridazione, ibridazione, lavaggio e rilevazione del segnale sono analoghi a quelli seguiti per il Southern blotting.

La lastra autoradiografica ottenuta dallo sviluppo è stata orientata sulla piastra per recuperare le placche fagiche positive all'ibridazione. Per quest'ultime è stato ripetuto uno screening secondario e terziario. Le placche risultate positive allo screening terziario, e ben isolate le une dalle altre, sono state sottoposte ad estrazione di DNA fagico .

2.15.2.3 ESTRAZIONE DEL DNA DAL LISATO FAGICO

La placca fagica isolata allo screening terziario è stata posta in eppendorf contenente 200 µl di 1X lambda DB e lasciata a 4°C per 12 h. Dopo centrifugazione a 10.000 rpm per 2 minuti il surnatante è stato raccolto e titolato come riportato al paragrafo 3.15.2.1. Sei tubi da centrifuga (falcon) contenenti 200 µl di coltura batterica LE392 sono stati inoculati con 10 µl del surnatante titolato, e incubati a 37°C per 15'. A questi sono stati aggiunti 6ml di LB soft top agarosio +MgSO₄ (45°C) e versati su piastre Petri (90mm di diametro) contenenti come substrato LB agar +MgSO₄. Le piastre sono state incubate a 37 °C per un tempo massimo di 8 h. A ciascuna piastra sono stati aggiunti 10 ml di 1X lambda DB e dopo incubazione a 4°C per 12-15 h sono stati aggiunti 2 ml di cloroformio. Il liquido fagico, raccolto in tubi falcon da 50 ml, è stato centrifugato (Beckman J2-21) a 7000 rpm per 10 minuti e il surnatante è stato utilizzato per inoculare beute contenenti 1L di coltura batterica LE392 con un OD₆₀₀ pari 0,6. Le beute sono state incubate in agitazione a 37°C fino ad ottenere una riduzione della

torbidità della coltura a seguito della lisi fagica, dopodiché a ciascuna beuta sono stati aggiunti 15 ml di cloroformio e lasciate in incubazione per ulteriori 15 minuti. Il lisato fagico è stato raccolto e centrifugato, e a 20 ml di surnatante sono stati aggiunti 4 µl di DNAsi I (5mg/ml) e 75 µl di RNAsi A (10 mg/ml) e incubati temperatura ambiente per 30 minuti. Il DNA è stato quindi precipitato a 4°C O/N aggiungendo 20 ml di una soluzione 1X lambda DB contenente il 20% PEG 8000/2M NaCl. Dopo aver centrifugato per 20 minuti a 10000 rpm, il surnatante è stato rimosso e il pellet è stato risospeso in 500 µl, di 1X lambda dilution buffer. Alla sospensione sono stati quindi aggiunti 2,5 µl di SDS 20%, 5 µl di EDTA (pH 8) 0,5 M, e 1,25 µl di proteinase K 20 mg/ml . Dopo incubazione per 1 h a 65 °C sono stati aggiunti 500 µl di fenolo, il campione è stato agitato vigorosamente e centrifugato nuovamente. La fase acquosa è stata sottoposta ad una nuova estrazione fenolo-cloroformio e ad una successiva con solo cloroformio. Il DNA contenuto nella fase acquosa è stato precipitato con l'aggiunta di 2 volumi di etanolo. Il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo al 70%, lasciato asciugare bene e poi risospeso in TE (Tris 10 mM - EDTA 10 mM pH 8.0). Il DNA ottenuto è stato quantificato tramite elettroforesi su gel d'agarosio per comparazione con un DNA standard.

2.15.2.4 ANALISI DI RESTRIZIONE DEL DNA FAGICO OTTENUTO

L'inserto è stato tagliato dalle braccia del vettore fagico digerendo 10 µl di DNA a 37 °C per 16h con l'enzima di restrizione *EcoRI*

2.16 Studi di Espressione

Abbiamo valutato mediante RT-PCR e analisi northern blotting l'espressione dei geni clonati quando *Trichoderma* cresce in presenza di biomassa (sterile) di funghi patogeni quali *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, e *Pythium ultimum* o nei filtrati colturali degli stessi, allo scopo di verificare l'eventuale coinvolgimento dei geni in esame, nei fenomeni di antagonismo.

Allo stesso modo si è proceduto per valutare il livello di espressione dei quattro geni *Tabc* quando *Trichoderma* viene cresciuto in presenza di alcuni composti chimici, allo scopo di studiarne l'eventuale coinvolgimento nei fenomeni di resistenza a sostanze tossiche di varia natura.

Per le reazioni di RT-PCR sono state disegnate coppie di primers specifici per ciascuno dei quattro geni. Per l'analisi northern blotting è stata utilizzata come sonda la parziale sequenza del gene *Tabc2*.

2.16.1 Condizioni di crescita

Beute contenenti 100 ml di PDB (Sigma) sono state inoculate con 50 µl di una sospensione di conidi (1×10^6 /ml) di *T. atroviride* P1 e lasciate in agitazione a 25° C. Dopo 48 ore, per alcune colture, la biomassa prodotta, è stata raccolta con l'ausilio di un setaccio, ed è stata trasferita asetticamente in 100 ml di filtrato colturale filtrosterilizzato (filtri Miraclot 0,8-0,6-0,2 µm), ottenuto dalla crescita in coltura agitata (150 rpm) per 7 gg a 25 °C dei funghi patogeni *B. cinerea*, *R. solani*, e *P.ultimum* rispettivamente. Alle altre colture, invece, sono stati aggiunti i seguenti componenti:

- 1) N-acetilglucosammina (0,1M; 0,01M; 0,001M concentrazione finale)

Materiali e metodi

- 2) Dicloran (0,05 M concentrazione finale)
- 3) Procloraz (0,05M concentrazione finale)
- 4) Benlate (0,05 M concentrazione finale)
- 5) glucosio 1 %; 4%
- 6) fruttosio 1%; 0,5%
- 7) Biomassa *B. cinerea* sterile 1%
- 8) Biomassa *R. solani* sterile 1%
- 9) Biomassa *P. ultimum* sterile 1%
- 10) Cicloeximide (100ppm concentrazione finale)
- 11) Bovaricina (5 ppm concentrazione finale)
- 12) Metanolo (solvente in cui è solubilizzata la bovaricina)

Il micelio di *Trichoderma* è stato raccolto a tempi variabili a secondo della condizione di induzione . Nel caso della cicloeximide, la biomassa è stata raccolta dopo 1h e dopo 24h di induzione, per la bovaricina e metanolo dopo 10, 20 e 40 minuti, mentre per tutte le altre condizioni la biomassa è stata raccolta dopo 10 ore di contatto.

2.16.2 Estrazione di RNA

La procedura seguita per l'estrazione dell'RNA è stata descritta al paragrafo 3.8.3

2.16.3 RT-PCR

La procedura seguita per l'analisi RT-PCR è stata descritta al paragrafo 3.13.1

2.16.4 Analisi northern blotting

La procedura seguita per l'analisi northern blotting è stata descritta al paragrafo 3.8.4

3.RISULTATI

3.1 Ottenimento dei trasformanti di *Trichoderma spp.*

La co-trasformazione, per permeabilizzazione di protoplasti (Penttilä *et al.*, 1987), di *T. atroviride* ceppo P1 con il gene *avr4* sotto il controllo del promotore costitutivo P_{gpd} di *Aspergillus nidulans*, ha prodotto, per µg di DNA, una ventina di colonie. Sedici di queste sono state selezionate su mezzo selettivo e sono state sottoposte a tre passaggi di coltura monoconidica per ottenere lo stadio di omocariosi.

È stata inoltre effettuata la trasformazione di *T. atroviride* ceppo P1 e di *T. viride* con il plasmide pURA4E (fig. 8) sia mediante il protocollo di permeabilizzazione di protoplasti (Penttilä *et al.*, 1987) che con il protocollo di trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* (fig. 9) (Zeilinger, 2004). Dalla trasformazione con il protocollo di Penttilä e colleghi, (1987) sono state ottenute 5-6 colonie per 10⁷/ml di protoplasti, capaci di crescere su substrato selettivo. Nella trasformazione mediata da *A. tumefaciens* sono stati ottenuti 20-30 putativi trasformanti per 10⁷ spore/ml. Sono state selezionate a caso 15 colonie di *T. atroviride* ceppo P1 e 16 colonie di *T. viride* che sono state sottoposte a tre passaggi di colture monoconodiche. Tutti gli isolati provenienti dalle due trasformazioni sono stati sottoposti alla successiva caratterizzazione molecolare per confermare la presenza del DNA eterologo.

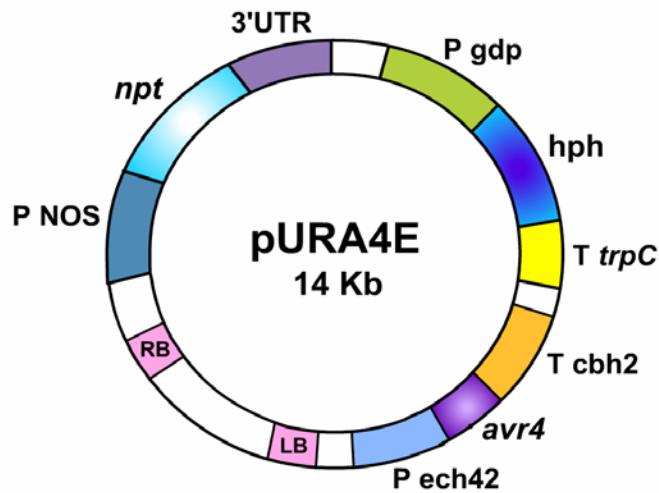


Figura 8. Mappa del plasmide pURA4E contenente la cassetta d'espressione del gene *hph* che codifica per l'enzima igromicina fosfotransferasi, la cassetta d'espressione del gene *npt* che codifica per l'enzima neomicina fosfotransferasi, e il gene *avr4* sotto il controllo del promotore inducibile *ech42* e del terminatore *cbh2*. Abbreviazioni: P *ech42* frammento del promotore del gene *ech42* di *T. atroviride*; T *cbh2* frammento del terminatore del gene *cbh2* di *T. reesei*; P *gdp* frammento del promotore del gene *gdp* di *A. nidulans*; T *trpC* frammento del terminatore *trpC* di *A. nidulans*, P NOS frammento del promotore del gene nopalina sintasi, LB left border, RB right border.



Figura 9. Trasformazione mediata da *A. tumefaciens* di *T. atroviride* ceppo P1 e *T. viride*. Immagine delle colonie dei trasformanti di *T. viride* dopo 4 giorni dal trasferimento della membrana su una piastra di PDA + igromicina B (100µg/ml).

3.2 Caratterizzazione genetico-molecolare dei trasformanti

3.2.1 Analisi mediante PCR

Sui trasformanti ottenuti per co-trasformazione è stata effettuata una PCR sul DNA genomico estratto dal micelio, utilizzando i primer X-AVR4 START e N-AVR4 STOP che amplificano l'intero gene *avr4*. L'analisi tramite PCR ha mostrato la banda delle dimensioni attese (420 bp) solo per alcune colonie (fig. 10).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 M

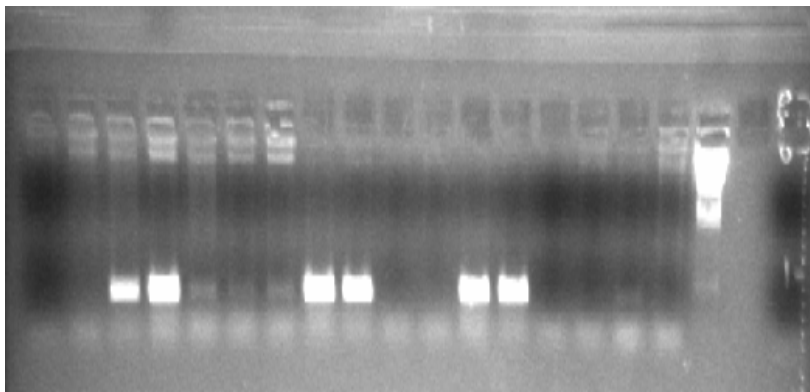


Figura 10. Analisi PCR dei trasformanti di *Trichoderma* con il gene *avr4* utilizzando primer X-AVR4 START e N-AVR4 STOP. Linea 1 controllo negativo; linea 2 ceppo selvatico P1; linea 3 controllo positivo; linee 4-17 colonie selezionate; M marker λ Hind III.

Per i trasformanti di *T. viride* e di *T. atroviride* ceppo P1 con il plasmide pURA4E, è stata effettuata una PCR sul DNA genomico estratto da micelio per verificare la presenza del gene eterologo *avr4-ech42*, usando come primers la coppia ECH42KPN F e CHB2KPN R che si appaiano rispettivamente sul promotore (*ech42*) e sul terminatore (*cbh2*). La PCR ha prodotto l'attesa banda di circa 2000 bp in tutte le colonie sottoposte ad analisi (fig. 11).

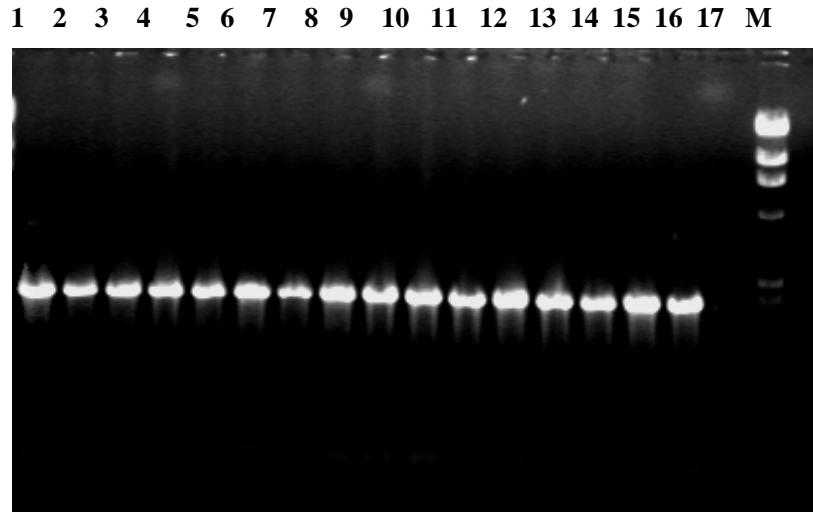


Figura 11. Analisi PCR degli isolati di *T. viride* (linea 1-8) e di *T. atroviride* ceppo P1 (linea 9-15) resistenti all'igromicina, utilizzando come primers ECH42KPN F e CHB2KPN R. Linea 16: controllo positivo (plasmide pURA4E); Linea 17: controllo negativo; M: marker λ *Hind* III.

3.2.2 Analisi Southern blotting

Gli isolati risultati positivi all'amplificazione del transgene sono stati analizzati mediante Southern blotting per valutare la presenza e il numero di copie del gene eterologo *avr4*. Il DNA genomico dei trasformanti è stato digerito con l'endonucleasi di restrizione *Hind* III che non taglia all'interno della sequenza del gene *avr4*. Come sonda è stata impiegata l'intera regione codificante di *avr4* marcata. La membrana contenente i DNA ibridati con la sonda *avr4* ha mostrato il segnale atteso solo per alcuni trasformanti. Inoltre per alcuni di questi sono state evidenziate più bande di ibridazione probabilmente derivate da inserzioni multiple del gene eterologo (fig. 12).

Sorprendentemente, il ceppo selvatico P1 ha mostrato un segnale di ibridazione con la sonda *avr4* nonostante la PCR non abbia dato alcuna amplificazione.

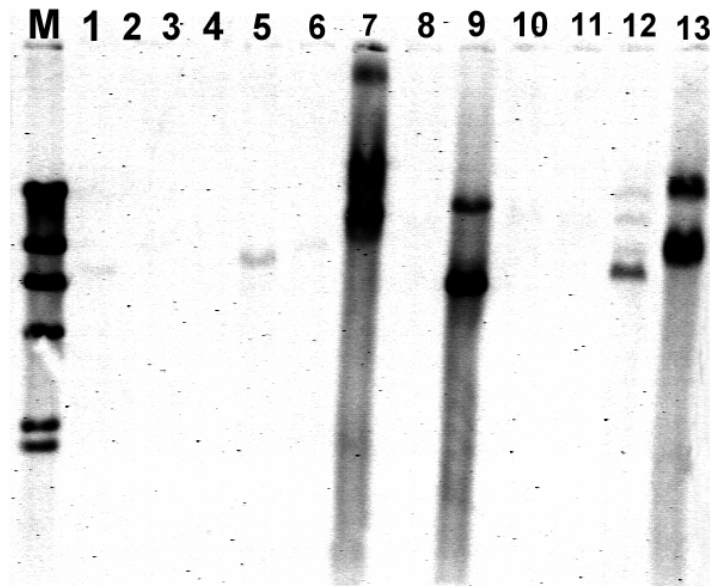


Figura 12. Analisi Southern blotting dei trasformanti. L'intera regione codificante di *avr4* marcata con digossigenina è stata utilizzata come sonda su DNA digerito *Hind* III. Linea 1: ceppo selvatico P1; linea 2: pozzetto vuoto; linea 3: trasformante A 3/2; linea 4: trasformante PQS 2/1; linea 5: trasformante L 1/3; linea 6: trasformante BC 2/1; linea 7: trasformante L 1/2; linea 8: trasformante BC 2/2; linea 9: trasformante A 3/1; linea 10: trasformante BC 3/2; linea 11: trasformante A 1/3; linea 12: trasformante PQS 2/2; linea 13: trasformante H 3/2; M: marker λ *Hind* III marcato con digossigenina.

3.2.3 Analisi northern blotting

Per valutare l'espressione del gene *avr4* e quindi il funzionamento del promotore costitutivo *gdp* in *Trichoderma*, è stata effettuata un'analisi northern dei trasformanti risultati positivi all'analisi Southern, sempre utilizzando come sonda l'intera regione codificante del gene *avr4*. I trasformanti A3/1, H3/2, L1/3 hanno mostrato un forte segnale di ibridazione (Fig. 13), e in particolare il trasformante A3/1 ha mostrato un segnale molto più intenso rispetto agli altri due. L'RNA totale del ceppo selvatico e di alcuni dei trasformanti non ha ibridato con la sonda.

I trasformanti A 3/1, H 3/2, L1/3 sono stati quindi scelti per la caratterizzazione biochimica e fisiologica.



Figura 13. Analisi northern blotting dei trasformanti, utilizzando come sonda l'intera regione codificante di *avr4*. Linea 1: trasformante BC 2/1; linea 2: trasformante A3/1; linea 3: trasformante L 1/2; linea 4: trasformante H3/2; linea 5: trasformante L 1/3; linea 6: trasformante PQS 2/2; linea 7: pozzetto vuoto; linea 8: ceppo selvatico P1; M: marker λ *Hind* III marcato con digossigenina.

3.3 Caratterizzazione biochimica dei trasformanti

I tre trasformanti risultati positivi all'analisi northern blotting sono stati sottoposti ad ulteriori analisi biochimiche per verificare la presenza del prodotto del transgene. AVR4 è una proteina di circa 10 kDa che si lega alla chitina e presenta un peptide segnale per la secrezione extracellulare (Van den Burg *et al.*, 2003). Sono state preparate estrazioni di proteine totali dal filtrato colturale e dal micelio sia dei trasformanti che del ceppo selvatico P1. I profili proteici sono stati valutati tramite SDS-PAGE. I filtrati colturali (F.C.) non hanno mostrato bande differenziali tra i trasformanti ed il

Risultati

ceppo selvatico P1, sia nelle frazioni proteiche che non legano la chitina sia in quelle che la legano (fig. 14 A, B). Al contrario i profili ottenuti dalle proteine intracellulari mostrano una banda differenziale di circa 10 kDa nei trasformanti A 3/1 ed L 1/3, che non è presente nel ceppo selvatico P1 e nel trasformante H 3/2 (fig. 14 C).

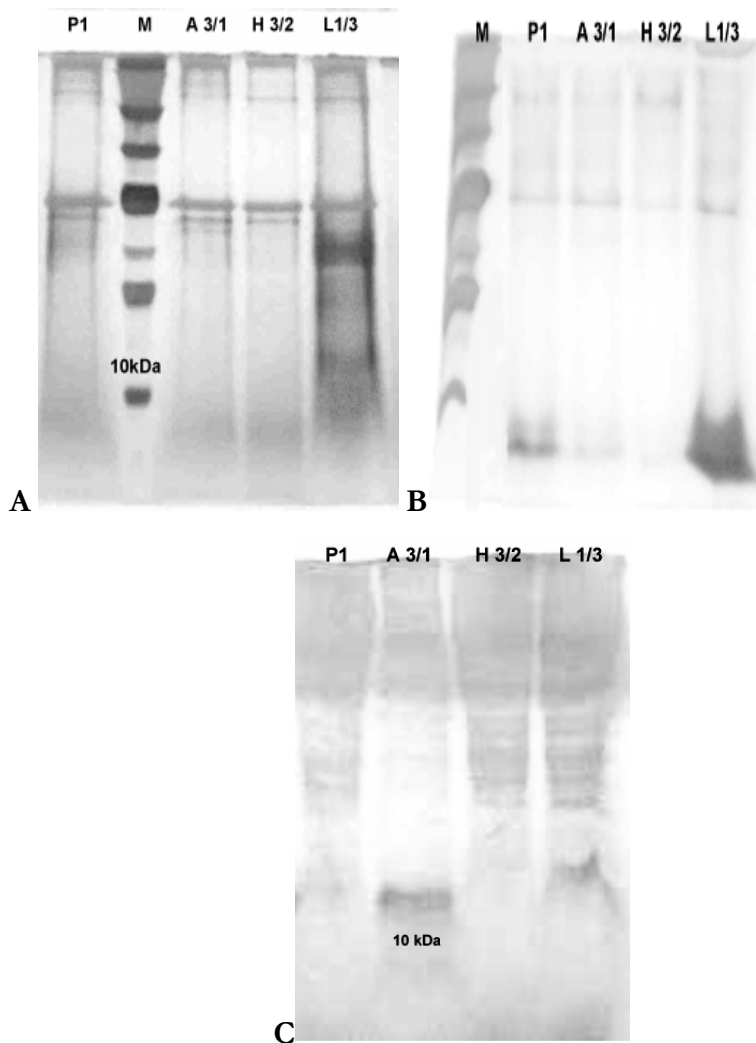


Figura 14. SDS-PAGE delle proteine dei trasformanti di *T. atroviride*. (A) Profili proteici delle frazioni di filtrati colturali che legano la chitina. (B) Profili proteici delle frazioni di filtrati colturali che non legano la chitina. (C) Profili proteici delle proteine intracellulari. M: marker

Questi dati sono stati validati anche dall'analisi dei profili proteici ottenuti dalle proteine intracellulari e dei F.C. di alcuni trasformanti

di *C. fulvum* ottenuti utilizzando il medesimo costrutto (pGA₄W₆) usato per la trasformazione di *Trichoderma*. Anche in questo caso la proteina AVR4 non viene secreta nel mezzo di crescita ma resta associata al micelio (fig. 15).

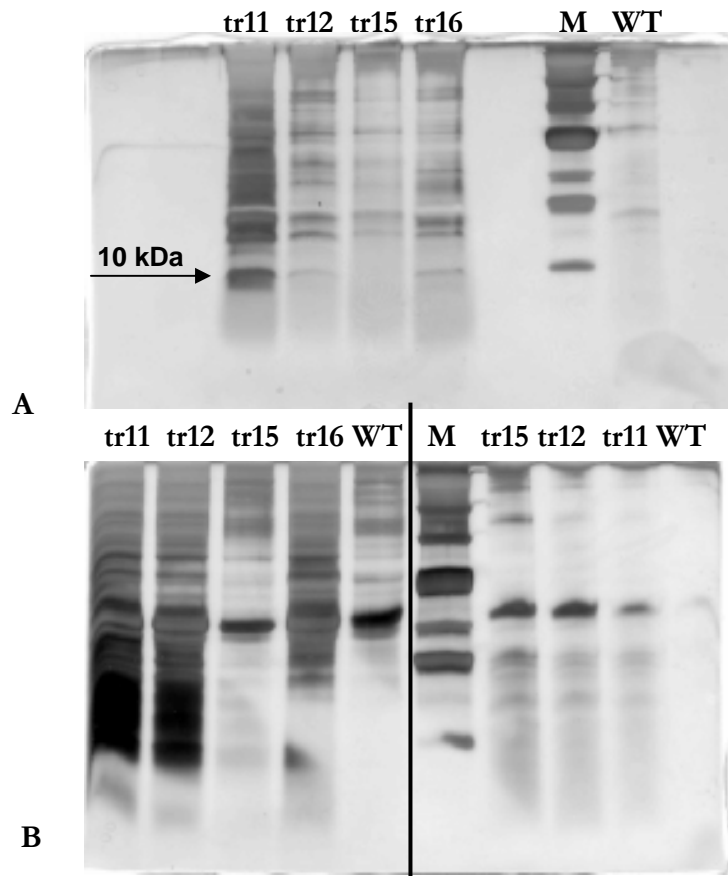


Figura 15. SDS-PAGE delle frazioni proteiche di *C. fulvum* (tr11, tr12, tr15, tr16) trasformato con *avr4* e relativo ceppo selvatico (WT). **(A)** profili proteici delle proteine intracellulari. **(B)** Profili proteici delle frazioni di filtrati colturali che legano (parte sinistra) o non legano la chitina (parte destra). M: marker.

3.3.1 Analisi enzimatica dei trasformanti

Sono state determinate le attività β -1,3 glucanasica e chitinasica (endo- e eso-chitinasi) nei filtrati colturali ottenuti in condizioni di induzione dei relativi geni (in presenza di estratto chitina di granchio e basidiocarpi di *Agaricus bisporus* liofilizzati,

Risultati

come unica fonte di carbonio) e di non induzione (mezzo salino + saccarosio), sia per i trasformanti che per il ceppo selvatico.

Nel saggio per la determinazione dell'attività β -1,3 glucanasica, i trasformanti non hanno presentato differenze significative rispetto al ceppo P1 (fig. 16). In tutti si verifica un graduale aumento dell'attività β -1,3 glucanasica nelle condizioni di induzione contenente funghi liofilizzati come sorgente di carbonio.

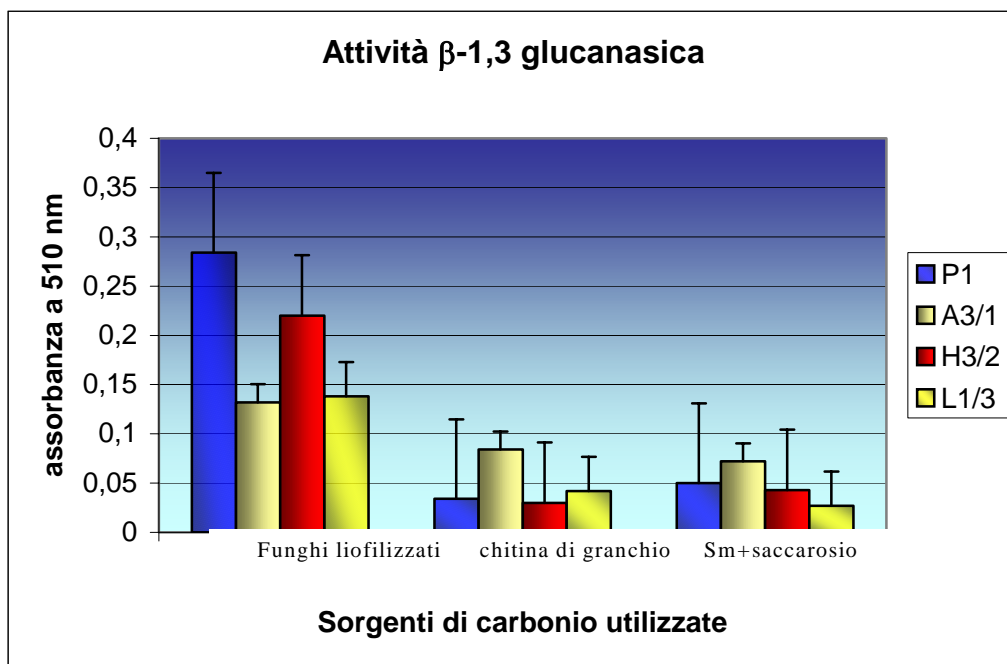


Figura 16. Determinazione dell'attività β -1,3-glucanasica nei filtrati colturali del ceppo selvatico P1 e dei trasformanti. Le barre indicano la deviazione standard.

L'attività endochitinasica dei trasformanti e di P1 è stata determinata attraverso il saggio di riduzione di torbidità di una soluzione di chitina colloidale (Harman *et al.*, 1993). Anche in questo saggio non sono state evidenziate differenze significative tra il ceppo selvatico P1 ed i trasformanti, e l'attività endochitinasica risulta pressoché invariata nelle diverse condizioni applicate (fig. 17).

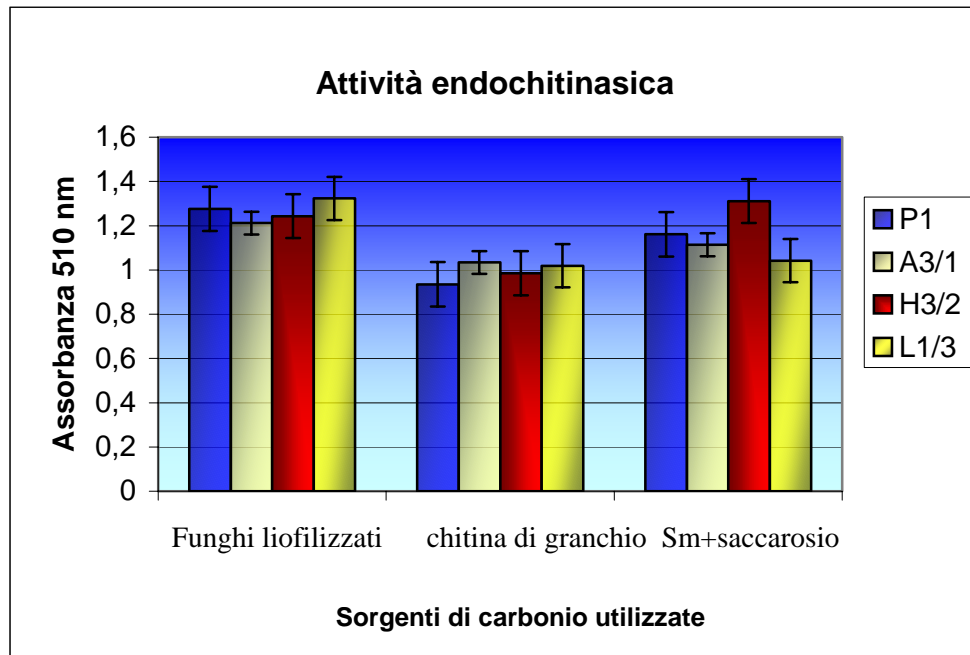


Figura 17. Determinazione dell'attività endochitinasica nei filtrati colturali del ceppo selvatico P1 e dei trasformanti. Le barre indicano la deviazione standard.

Per determinare l'attività esochitinasica, sono stati utilizzati saggi in grado di misurare l'attività N-acetilglucosaminidasica (Nagasi) e quella chitobiosidasica (Biasi). Sorprendentemente l'attività N-acetilglucosaminidasica (Fig. 18) dei trasformanti in presenza di saccarosio risulta fortemente incrementata rispetto al ceppo selvatico. Nelle condizioni di induzione l'attività N-acetilglucosaminidasica è più elevata rispetto alla condizione di non induzione, ma non si apprezzano differenze significative tra i trasformanti e il ceppo selvatico.

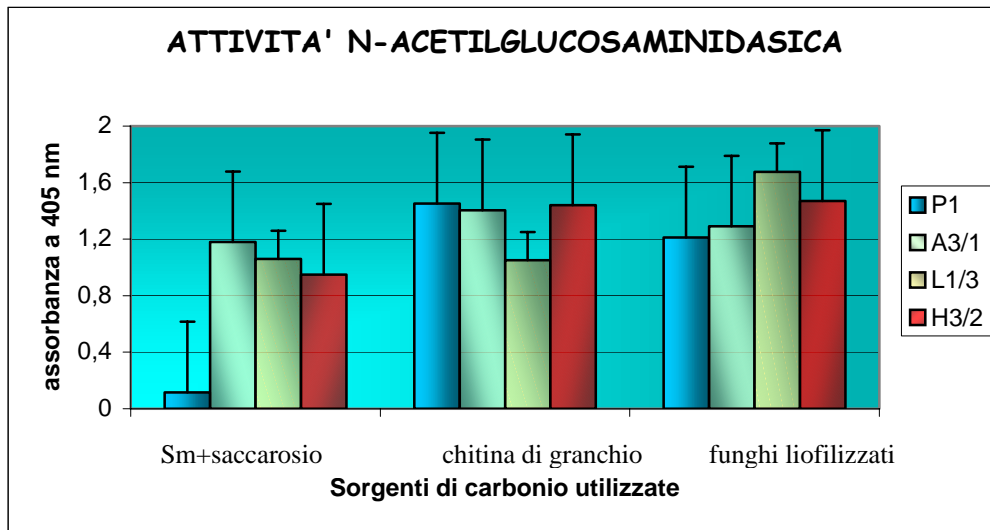


Figura 18. Attività N-acetilglucosaminidasi misurata nei filtrati colturali del ceppo selvatico P1 e dei trasformanti. Le barre indicano la deviazione standard

l'attività chitobiosidasi (Fig. 19), misurata nelle diverse condizioni in esame, mostra un andamento simile all'attività N-acetilglucosaminidasi, anche se nella condizione di non induzione si apprezzano differenze meno significative tra i trasformanti e il ceppo selvatico.

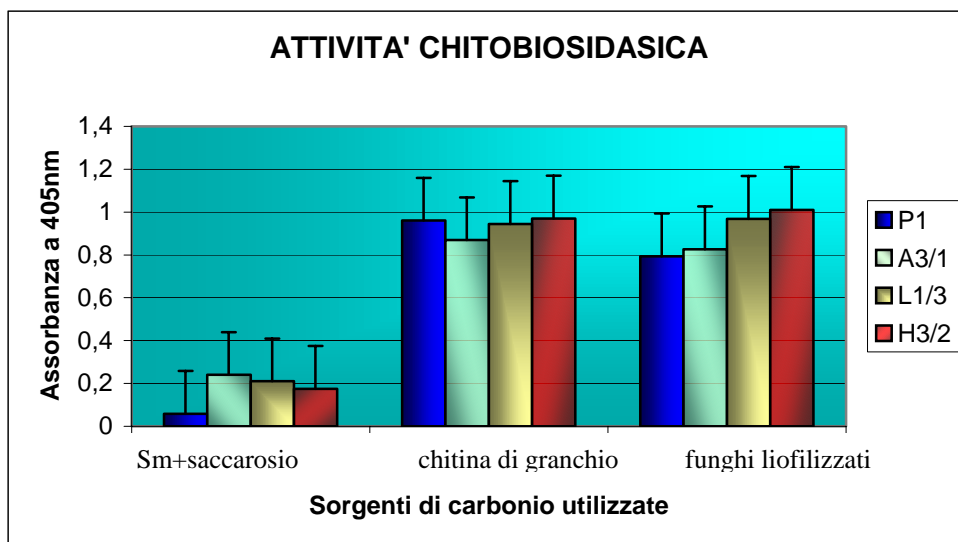


Figura 19. Attività chitobiosidasi misurata nei filtrati colturali del ceppo selvatico P1 e dei trasformanti. Le barre indicano la deviazione standard

3.4 Caratterizzazione fisiologica dei trasformanti

La caratterizzazione fisiologica dei trasformanti selezionati è stata eseguita sia con saggi *in vitro* che *in vivo*.

I saggi *in vitro* hanno riguardato la valutazione della capacità antagonista dei trasformanti rispetto al ceppo selvatico nei confronti di vari patogeni. Con i saggi *in vivo* è stata valutata l'interazione dei trasformanti con linee di pomodoro MM-Cf4 (che riconoscono il prodotto del gene di avirulenza *avr4*) ed MM-Cf5 e MM-CF0 (che non riconoscono il prodotto del gene di avirulenza *avr4*).

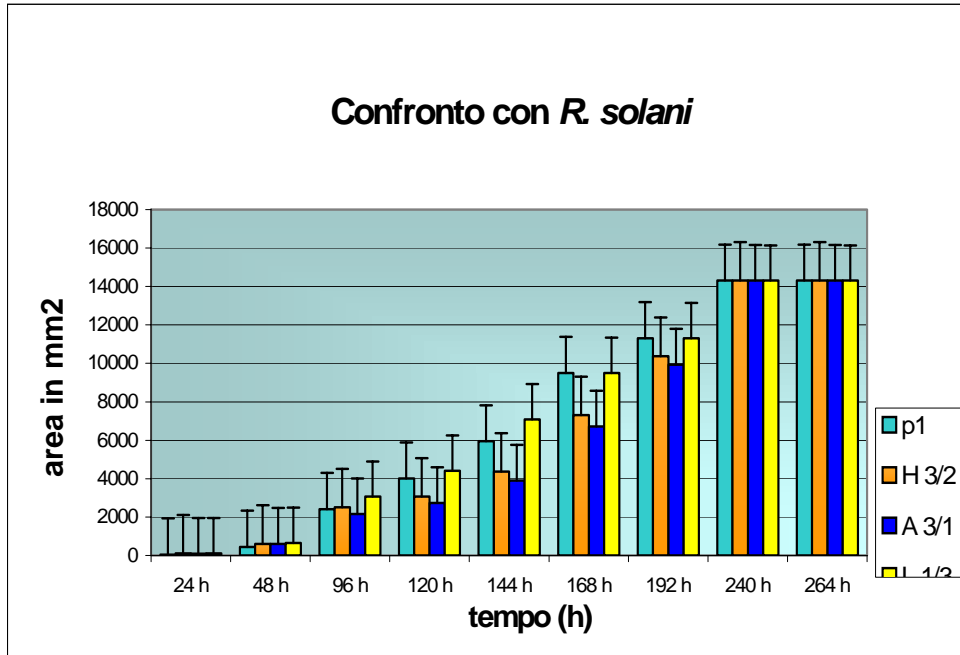
3.4.1 Saggi di competizione *in vitro*

L'attività antagonista dei trasformanti è stata valutata mediante saggi di competizione in piastra contro i funghi patogeni *B. cinerea*, *R. solani*, *A. alternata* e *Penicillium* spp. Contro *R. solani* e *B. cinerea* i trasformanti non hanno mostrato differenze significative nell'attività antagonista rispetto al ceppo selvatico P1, essendo riusciti tutti a parassitizzare il fungo fitopatogeno (fig. 20 A, B). Anche nei confronti di *Penicillium* spp., i trasformanti si sono comportati allo stesso modo di P1. Infatti nessun isolato è riuscito a parassitizzare il patogeno (fig. 21 A, B).

Contro *A. alternata*, invece, i trasformanti hanno mostrato una maggiore velocità di crescita, raggiungendo e colonizzando il patogeno dopo 10 gg dall'inoculo. Il ceppo selvatico, invece, raggiungeva l'altro fungo molto lentamente e al 15° giorno dall'inoculo ancora non era in grado di colonizzarlo fermandosi al margine della colonia di *A. alternata* senza più crescere (fig. 22 A, B). Questi risultati suggeriscono che la trasformazione con *Avr4* ha

aumentato la virulenza e/o la capacità antagonistica di *T. atroviride* nei confronti di funghi fitopatogeni.

A



B

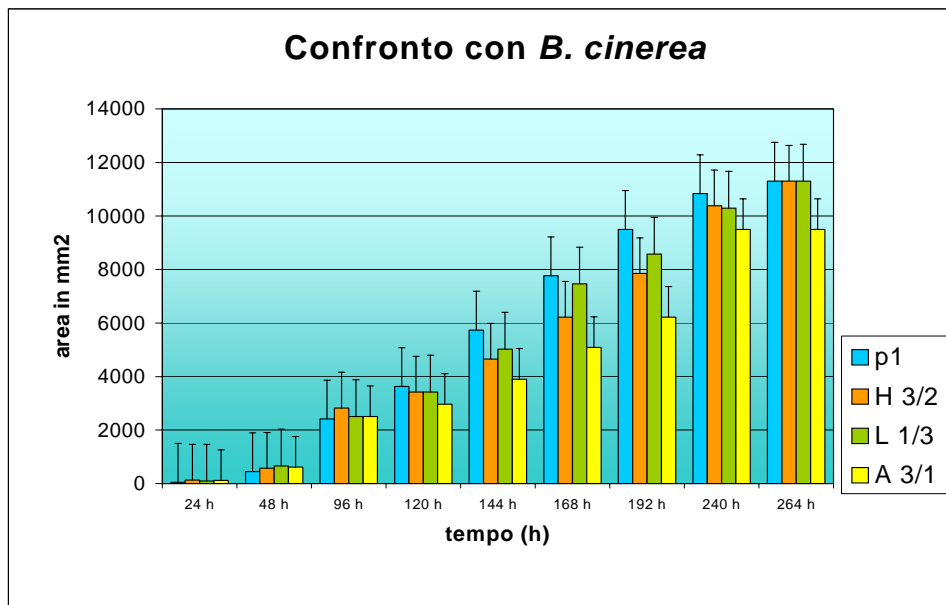
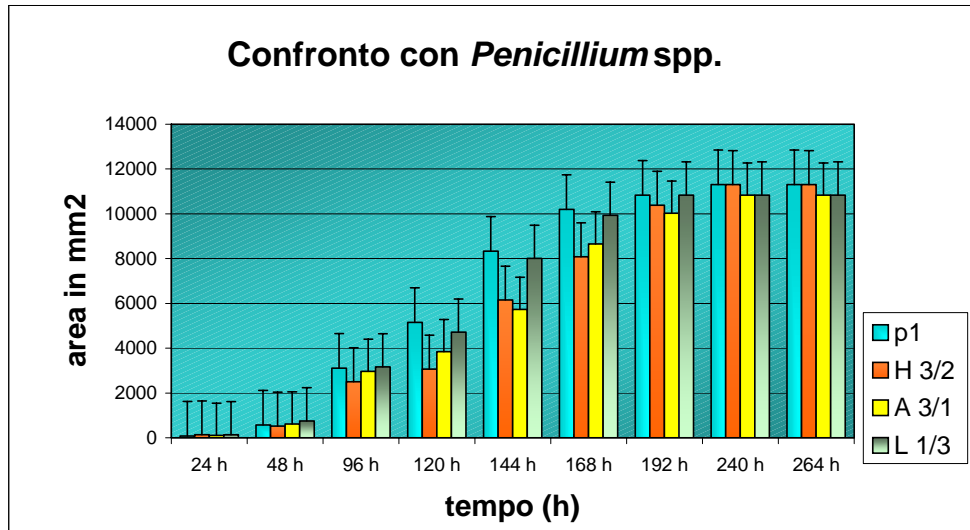


Figura 20. Crescita radiale dei trasformanti e del ceppo se lavico contro *R. solani* (A) e *B. cinerea* (B).

A



B

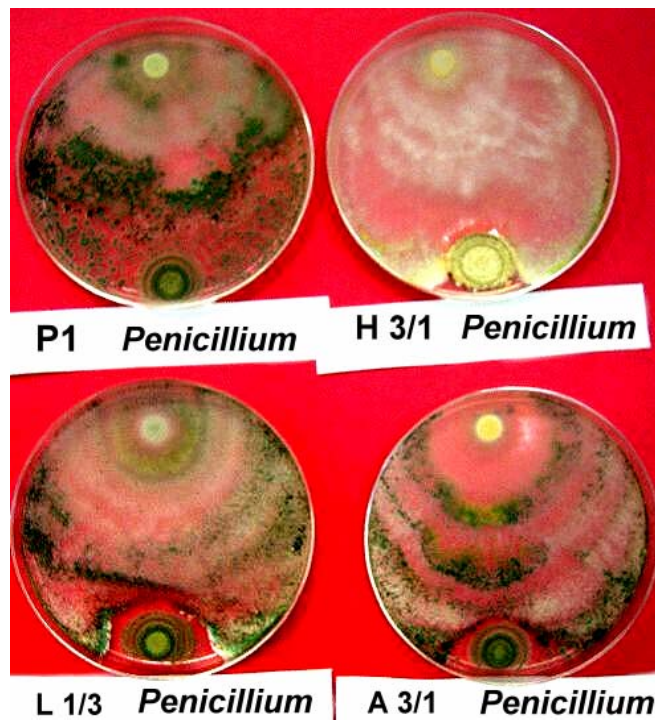


Figura 21. Saggi di competizione in piastra tra i trasformanti di *Trichoderma* e il patogeno *Penicillium* spp. (A) Crescita dei trasformanti confrontati con *Penicillium* spp.; (B) Immagini di piastre di *Penicillium* spp. non parassitizzate dai trasformanti H 3/2, A 3/1, L 1/3 e dal ceppo selvatico P1.

A

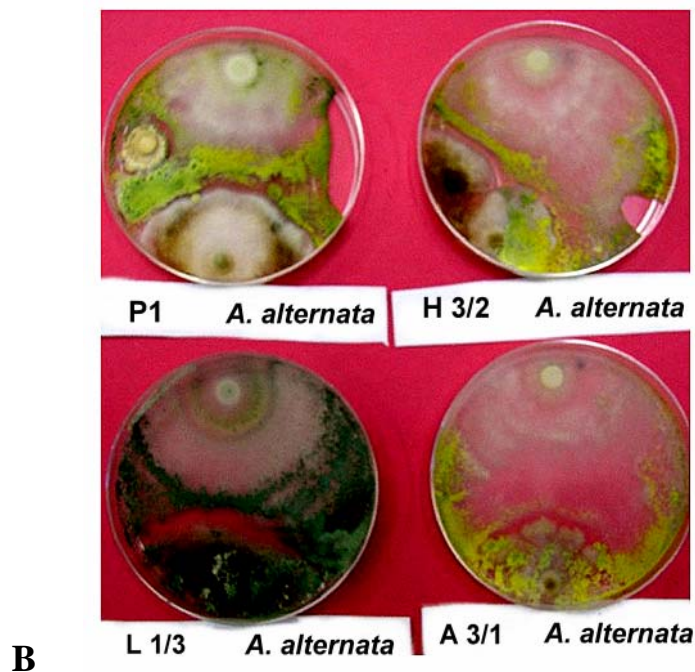
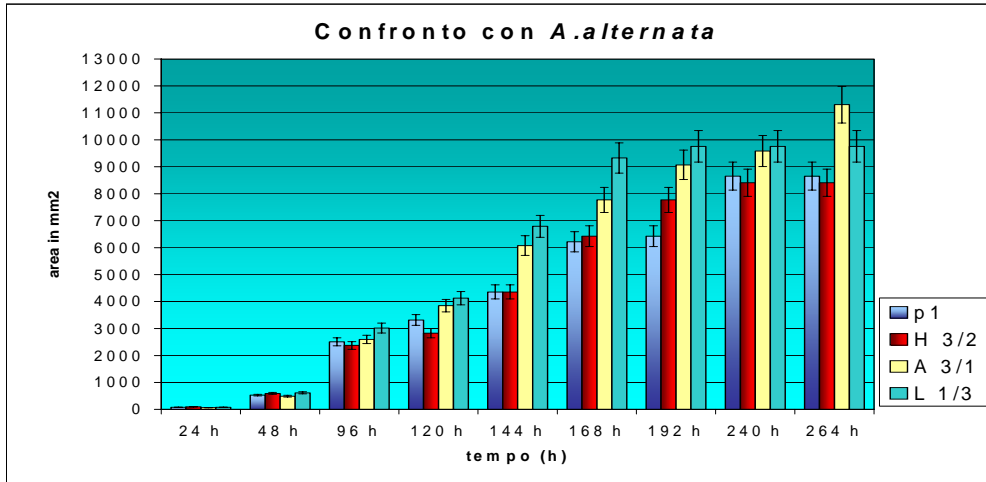


Figura 22. Saggi di competizione in piastra tra i trasformanti di *Trichoderma* e il patogeno *A. alternata*. **(A)** Crescita dei trasformanti confrontati con *A. alternata*; **(B)** Immagini della colonizzazione dei trasformanti H 3/2, A 3/1, L 1/3 e del ceppo selvatico P1 contro *A. alternata* 10 giorni dopo l'inoculo.

3.4.2 Saggi in vivo con diverse linee di pomodoro

Nei saggi *in vivo* è stata valutata la reazione delle linee MM-Cf4 (che riconoscono il prodotto del gene di avirulenza *avr4*) e MM-Cf5 (che non riconoscono il prodotto del gene di avirulenza *avr4*) in presenza dei trasformanti A 3/1, H 3/2, L 1/3 e del ceppo selvatico P1. A tale scopo i semi delle linee di pomodoro sono stati

Risultati

ricoperti con una sospensione di spore dei diversi isolati di *Trichoderma*. Dopo 5 settimane dalla semina, le piantine delle linee MM-Cf5 e MM-Cf4 germinate in presenza del ceppo selvatico P1 hanno raggiunto il 5° internodo, mostrando un maggiore sviluppo delle stesse linee germinate in assenza di *Trichoderma* (fig. 23).

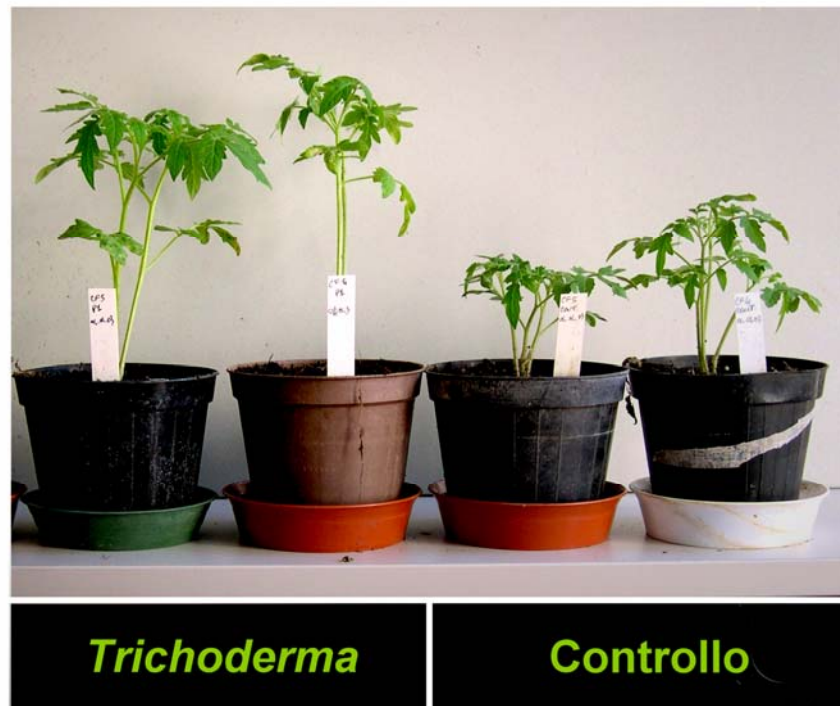


Figura 23. Confronto tra linee MM-Cf4 e MM-Cf5 germinate in presenza ed assenza di *T. atroviride* ceppo P1.

Tuttavia le piantine della linea MM-Cf4 inoculate con le spore dei trasformanti *avr4* hanno presentato una germinazione ritardata ed un rallentamento della crescita, che in alcuni casi si è addirittura bloccata. Le linee cresciute in presenza del ceppo selvatico, e le piantine della linea MM-Cf5 inoculate con gli stessi trasformanti hanno mostrato uno sviluppo ed una crescita paragonabile a quella delle piante cresciute in presenza di P1 (fig. 24).

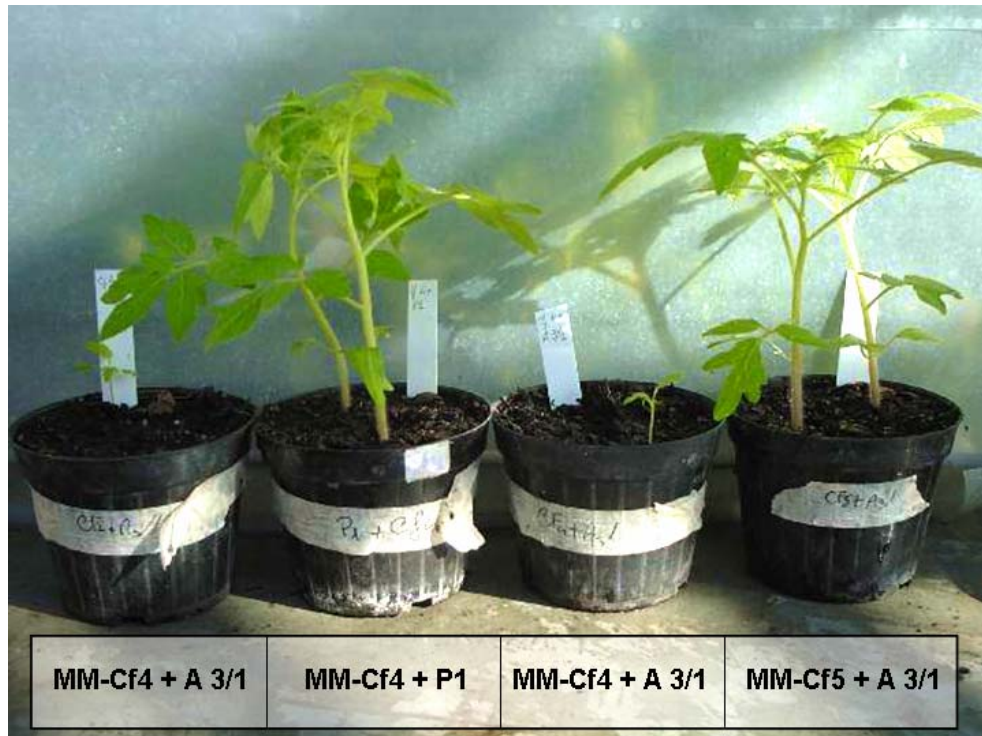


Figura 24. Confronto tra linee MM-Cf4 e MM-Cf5 germinate in presenza del trasformatante A3/1 o del ceppo selvatico P1. Partendo da sinistra: piante MM-Cf4 germinate in presenza del trasformatante A3/1, piante MM-Cf4 germinate in presenza del ceppo selvatico P1, piante MM-Cf4 germinate in presenza del trasformatante A3/1 e piante MM-Cf5 germinate in presenza del trasformatante A3/1.

Le piantine MM-Cf4 inoculate con i trasformanti e con il ceppo selvatico sono state spiantate, e ne è stato valutato sviluppo e morfologia dell'apparato radicale. Come si può osservare nella figura 25 F, l'apparato radicale della piantina MM-Cf4 germinata in presenza di P1 è risultato molto più sviluppato rispetto all'apparato radicale della piantina MM-Cf4 germinata in presenza dei trasformanti; sono state infatti riscontrate differenze significative nel peso fresco sia dell'intera pianta che dell'apparato radicale (tabella 7).

Risultati

Tabella 7. Valori medi del peso fresco di piante intere e di apparati radicali di linee MM-Cf4 germinate in presenza di P1 (MM-Cf4 + P1) e di linee MM-Cf4 germinate in presenza del trasformatante A 3/1 (MM-Cf4 + A3/1).

	PIANTA INTERA	APPARATO RADICALE
MM-Cf4 + P1	53,36 g	20,26 g
MM-Cf4 + A3/1	11,70 g	3,74 g

Le stesse radici sono state quindi osservate al microscopio ottico. Sulle radici di piante germinate in presenza dei trasformatanti nei punti di fuoriuscita delle radichette secondarie sono state osservate piccole necrosi e zone di suberificazione, ed una emissione “a ciuffetti” delle radici secondarie (fig.25 A, B, C). Nelle piante germinate con il ceppo selvatico P1 ed in quelle controllo senza *Trichoderma* (fig. 25 D, E) non sono state osservate ne lesioni ne uno sviluppo anomalo dell'apparato radicale.

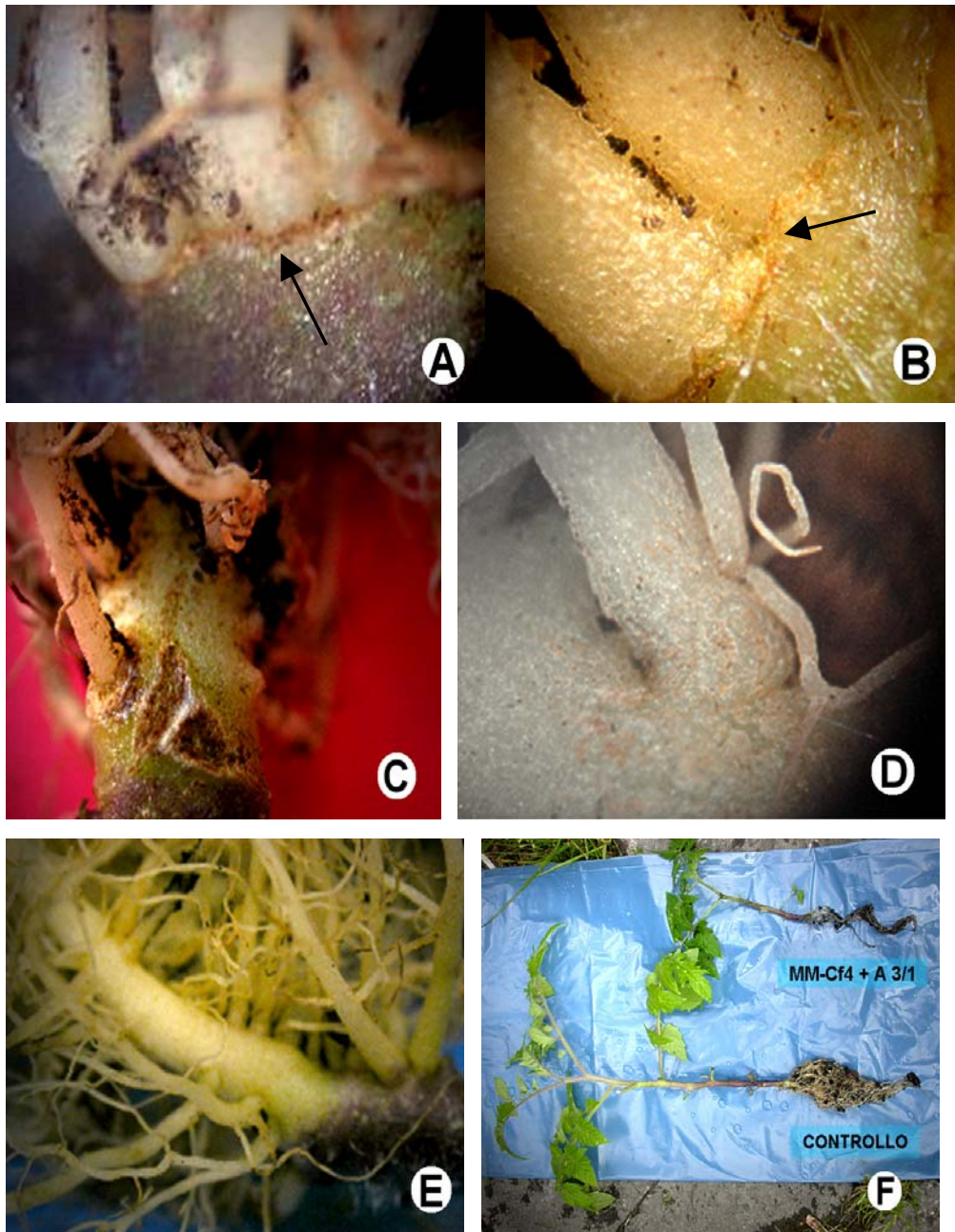


Figura 25. Apparati radicali di piante MM-Cf4 germinate in presenza del trasformatore A 3/1 e del ceppo selvatico P1. **(A) (B) (C)** Radici secondarie di piante MM-Cf4 germinate con il trasformatore A 3/1 (MM-Cf4+A3/1). Le frecce indicano zone necrotiche nel punto di fuoriuscita delle radici secondarie; **(D)** Ingrandimento di radici secondarie di piante MM-Cf4 germinate con il ceppo selvatico P1 (MM-Cf4+P1) che appaiono prive di evidenti necrosi; **(E)** Apparato radicale di piante controllo (MM-Cf4 senza *Trichoderma*), che non mostra evidenza di lesioni o zone necrotiche; **(F)** Confronto tra piante MM-Cf4 germinate in presenza di P1 (MM-Cf4 + P1) o in presenza del trasformatore A 3/1 (MM-Cf4 + A3/1).

Le necrosi e le suberificazioni presenti sulle radici delle piante trattate con i trasformanti indicano che la pianta è in grado di

riconoscere le proteine prodotte da *Trichoderma* (in questo caso AVR4) ed attivare diverse reazioni tra cui quella d'ipersensibilità. Dalle radici che presentavano necrosi e da quelle non trattate è stato fatto un isolamento su piastra (PDA) per accertare la presenza di *Trichoderma*, che è cresciuto dai pezzetti di radice inoculate con il fungo ma non dal controllo. Per verificare che si trattasse di uno dei trasformanti il ceppo di *Trichoderma* isolato dalle radici è stato trasferito su piastre di PDA contenenti igromicina B (100 µg/ml).

3.4.3 Microiniezione di filtrati culturali in pianta

Aliquote dei filtrati culturali dei tre trasformanti A 3/1, H 3/2, L1/3 e del ceppo selvatico P1, già utilizzati per la caratterizzazione biochimica, sono state microinfiltrate in foglie di piante di pomodoro della linea 4D2 (contenente il gene *Cf-4*) e della linea 4E1 (senza il gene *Cf-4*). Lo scopo di questo esperimento era quello di evidenziare una eventuale reazione di ipersensibilità (HR) associata alla presenza del prodotto del gene *avr4* nel filtrato culturale. Tutte le infiltrazioni hanno prodotto necrosi su entrambe le linee di pomodoro (tabella 8) e ciò non ha permesso di apprezzare differenze tra i trasformanti e il ceppo selvatico P1. Questo esperimento conferma la presenza di elicitori proteici nel ceppo selvatico P1 che comunque attivano la reazione di ipersensibilità indipendentemente dalla presenza della proteina transgenica AVR4.

Risultati

Tabella 8. Microinfiltrazione di filtrati colturali concentrati e diluiti (1:10) dei trasformanti A 3/1, H 3/2, L1/3 e del ceppo selvatico P1 in linee di pomodoro 4D2 e 4E1. 0; *, **, ***, **** indicano l'intensità dell'area necrotica ottenuta.

	20 ore dopo l'infiltrazione	20 ore dopo l'infiltrazione	48 ore dopo l'infiltrazione	48 ore dopo l'infiltrazione	72 ore dopo l'infiltrazione	72 ore dopo l'infiltrazione
	Line 4D2	Line 4E1	Line 4D2	Line 4E1	Line 4D2	Line 4E1
P1 (4) conc.	**	**	***	***	****	****
P1 (4) 1:10	0	0	*	*	****	****
A 3/1 (4) conc.	0	**	***	***	****	****
A 3/1 (4) 1:10	0	0	**	0	***	0
L 1/3 (4) conc.	**	**	***	***	****	****
L 1/3 (4) 1:10	0	0	*	**	****	****
H 3/2 (4) conc.	**	**	***	***	****	****
H 3/2 1:10	0	0	*	0	***	***
P1 (7) conc.	**	**	***	***	****	****
P1 (7) 1:10	0	0	**	**	****	***
A 3/1 (7) conc.	**	**	***	***	****	****
A 3/1 (7) 1:10	0	0	**	**	****	****
L 1/3 (7) conc.	**	**	***	***	****	****
L 1/3 (7) 1:10	0	0	**	**	***	****
H 3/2 (7) conc.	**	**	***	***	****	****
H 3/2 (7) 1:10	*	*	**	*	***	***
Avr4 controllo	0	0	**	0	***	0

3.4.4 Induzione di fitoalessine

I tre trasformanti A 3/1, H 3/2, L1/3 sono stati valutati anche per la loro capacità di indurre risposte di difesa sistemiche nella linea di pomodoro MM-Cf4. Da studi di De Wit e colleghi, (1979) risulta che nelle combinazioni incompatibili tra *C. fulvum* e pomodoro si ha una forte produzione della fitoalessina riscitina. Seguendo il protocollo di De Wit (1979) è stata effettuata un'estrazione di fitoalessine riscitina-simili da foglie di pomodoro delle linea MM-Cf4 cresciuta in presenza dei trasformanti, del ceppo selvatico P1 e in assenza di *Trichoderma*. Gli estratti acetonicici sono stati analizzati mediante cromatografia su strato sottile (TLC) ed HPLC. La TLC ha mostrato una banda differenziale nei campioni provenienti da foglie di piante MM-Cf4 cresciute con il trasformantie A 3/1 rispetto agli estratti provenienti

da foglie di piante MM-Cf4 cresciute in presenza del ceppo selvatico P1 (Fig. 26).

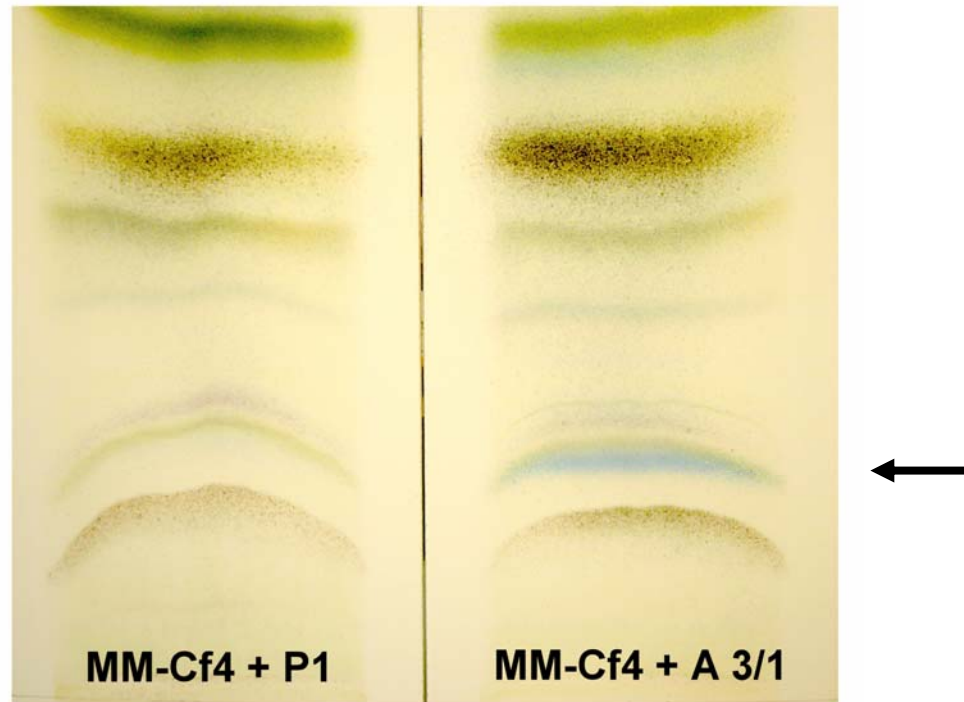


Figura 26. Produzione differenziale di fitoalessine indotte dai trasformanti di *Trichoderma*. Cromatografia su strato sottile degli estratti acetonicici provenienti da foglie di piante MM-Cf4 cresciute in presenza del ceppo selvatico P1 o in presenza del trasformatore A 3/1. La freccia indica una banda differenziale.

L'analisi all'HPLC ha confermato i risultati ottenuti dalla TLC avendo prodotto cromatogrammi differenti per gli estratti provenienti da piante MM-Cf4 cresciute con il trasformatore A 3/1 rispetto a quelli ottenuti in presenza di P1 (fig. 27). Uno dei picchi differenziali è stato raccolto ed analizzato con MALDI-TOF (fig. 28). La massa ottenuta per questa possibile nuova fitoalessina, la cui produzione è indotta dalla presenza della proteina AVR4 espressa dai trasformanti di *Trichoderma*, è di 656.9.

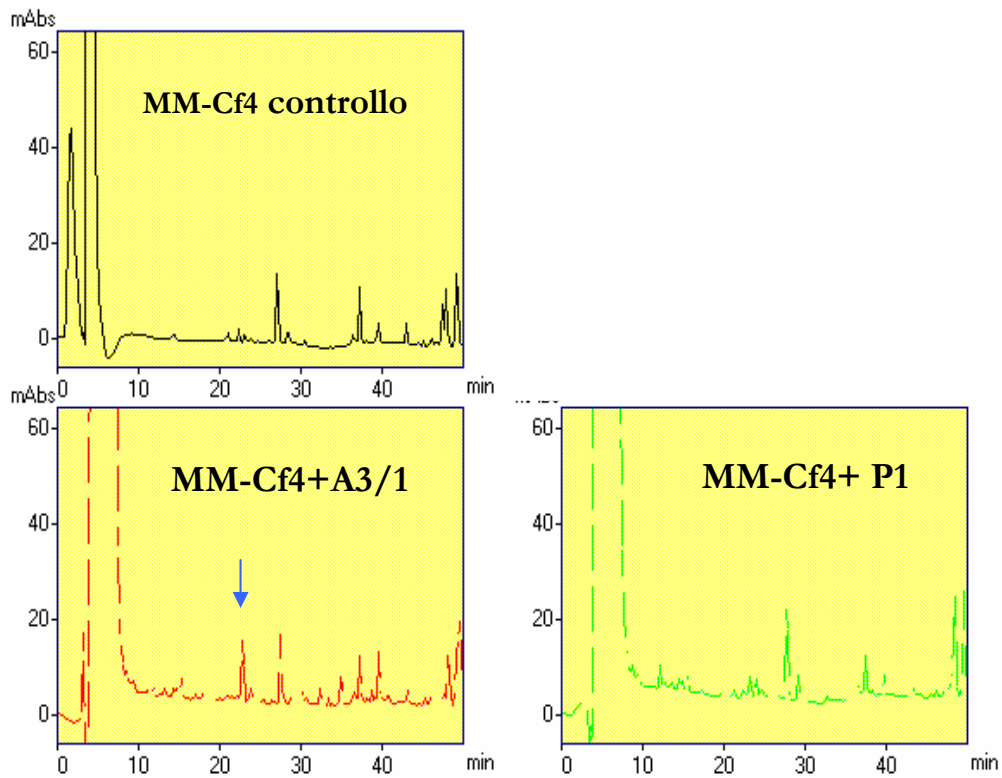


Figura 27. Analisi HPLC degli estratti acetonicici di piante controllo MM-CF4 e di piante cresciute in presenza del ceppo selvatico P1 e del trasformatante A 3/1. La freccia indica un picco differenziale.

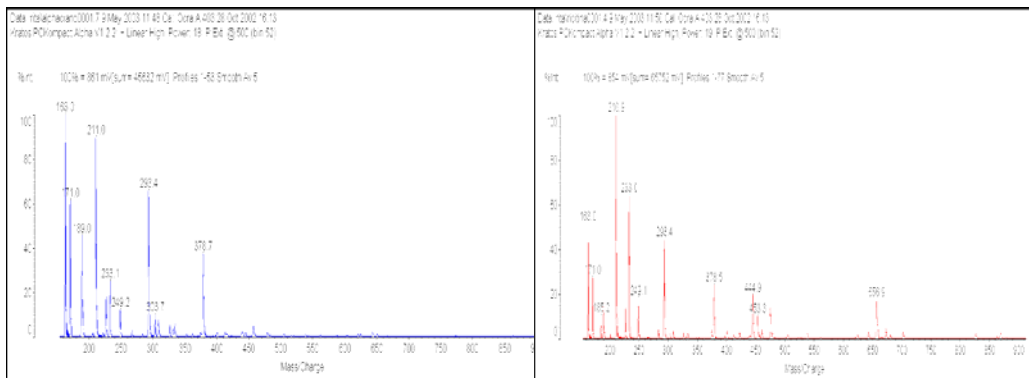


Figura 28. Analisi MALDI-TOF della frazione corrispondente ad un picco differenziale presente nel cromatogramma dell'HPLC dell'estratto acetonicico di piante MM-CF4 cresciute in presenza del trasformatante A 3/1.

3.5 Ricerca di geni Avr-like in Trichoderma

Risultati

L'analisi Southern, effettuata per valutare l'avvenuta inserzione del gene eterologo nei diversi isolati ottenuti dalla trasformazione, ha anche mostrato almeno un'altra banda d'ibridazione nel ceppo selvatico P1. Questo ci ha fatto presupporre la presenza di sequenze omologhe a quella di *avr4* nel genoma di *Trichoderma*. Per investigare questa possibilità è stato effettuato un Southern blotting su diversi isolati selvatici di *Trichoderma* (fig. 29).

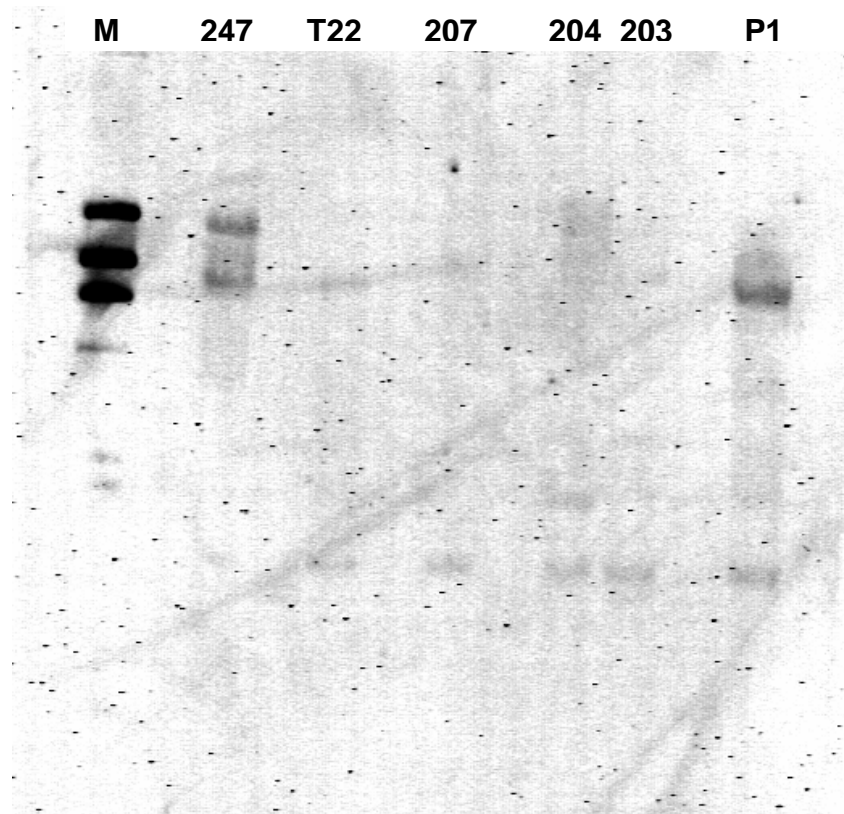


Figura 29. Presenza in diversi isolati di *Trichoderma* di sequenze che ibridizzano con quella del gene *avr4* di *C. fulvum*. Risultati dell'analisi Southern blotting dopo un'esposizione di 30 minuti utilizzando come sonda l'intera regione codificante di *avr4* marcata con digossigenina. M: marker λ *Hind* III marcato con digossigenina.

I risultati di questa analisi Southern hanno confermato la presenza di bande di ibridazione più o meno intense in tutti gli isolati analizzati.

Risultati

Sono stati prodotti filtrati colturali di *T. atroviride* P1, *T. harzianum* T22, *T. atroviride* Fyto 822, e *T. viride* ed è stata valutata la presenza di proteine che avessero caratteristiche simili a quelle di AVR4, quali una dimensione di circa 10 kDa e la capacità di legare specificamente la chitina. Nei filtrati colturali di P1, T22 e Fyto822 erano presenti proteine di circa 10 kDa, ma solo nel filtrato colturale di T22 una di esse ha mostrato la capacità di legare la chitina (fig. 30).

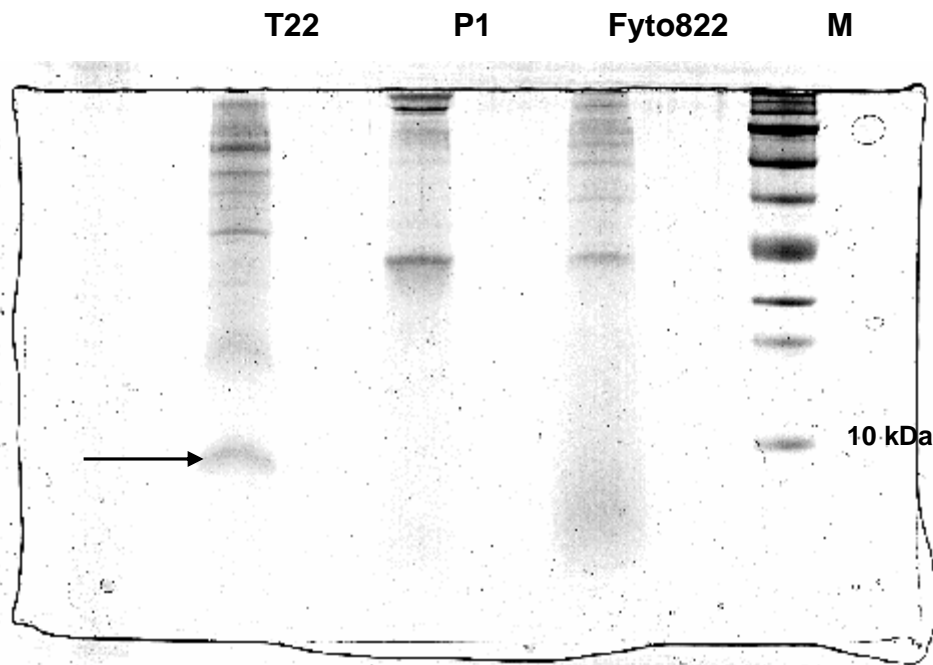


Figura 30. SDS-PAGE di frazioni proteiche che si legano alla chitina, provenienti da filtrati colturali di *T. atroviride* ceppo T22, P1, Fyto822. M: marker.

La banda corrispondente alla proteina di interesse è stata eluita dal gel di poliacrilammide e sequenziata. La sequenza amminoacidica ottenuta è **AVCPTGLEFSNPLCCS**.

I risultati ottenuti inserendo la sequenza peptidica in banca dati hanno rivelato un'alta omologia con proteine appartenenti alla famiglia delle idrofobine (fig. 31), una famiglia di proteine

Sequenza amminoacidica Hytra1

AVCPTGLFSNPLCCSTNVLDLVGVDCVTPTAAVPDGVFFQAH_CASKGKQPLCCVAPV
AKQ
GVLC_QKPIGTQ

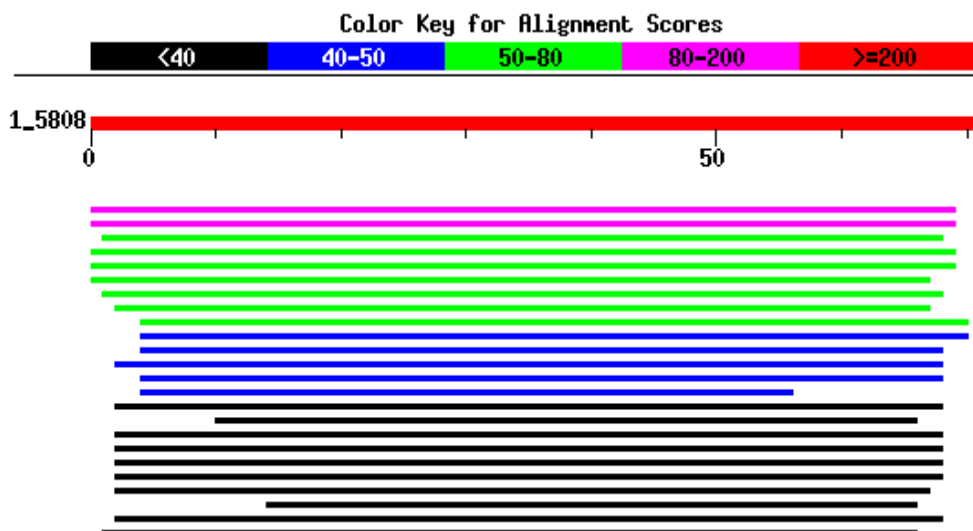
Figura 32. Sequenza di una nuova idrofobina di *T. atroviride* possibilmente coinvolta nell'interazione con la pianta. In giallo è mostrata la regione codificante (senza il peptide segnale) e in rosso, in blu, e in verde sequenze consenso per fattori di regolazione possibilmente attivi nel terminatore.

I risultati di una analisi tblastx (fig. 33), hanno suggerito che la sequenza in esame è relativa ad una nuova idrofobina, vista la mancanza di un'elevata identità con le sequenze di tali proteine presenti in database. Essa è comunque risultata omologa per l'80% all'idrofobina HFBII di *T. reesei*. È stata trovata, inoltre, un'omologia del 60% con, un'altra idrofobina di *T. reesei*, la HFBI, un'omologia del 52% con l'idrofobina QUID3 di *T. atroviride*, un'omologia del 50% con la tridrofobina CFTH1 di *Claviceps fusiformis*, un'omologia del 40% con una proteina appartenente alle magnaporine di *Magnaporthe grisea*, il 35% di omologia con una idrofobina di *C. fulvum*, un'omologia del 34% con un'idrofobina di *Gibberella moniliformis* e un omologia del 30% con l'idrofobina cerato-ulmina di *Ophiostoma ulmi*.



results of **BLAST**

Risultati



Sequenze aventi significanti livelli di omologia:

(bits) Value		
gi 6647555 sp P79073 HYP2_TRIRE	Hydrophobin II precursor (<i>T. reesei</i>)	95
4e-19		
gi 42543467 pdb 1R2M A	Chain A, Atomic Resolution Structure (<i>T. reesei</i>)	91
5e-18		
gi 1708378 sp P52754 HYP1_TRIRE	Hydrophobin I precursor (<i>T. reesei</i>)	72
2e-12		
gi 1903321 emb CAA72539.1	hydrophobin [<i>Hypocrea lixii</i>]	65
2e-10		
gi 24474507 emb CAD10781.1	pentahydrophobin [<i>Claviceps purpurea</i>]	62
3e-09		
gi 1709966 sp P52755 QID3_TRIHA	Cell wall protein QID3 (<i>T. harzianum</i>)	62
3e-09		
gi 2133305 pir S62621	hydrophobin HFBI - fungus (<i>T. reesei</i>)	61
4e-09		
gi 25091421 sp Q9UVI4 THYD_CLAFS	Trihydrophobin precursor (...)	56
2e-07		
gi 42545206 gb EAA68049.1	hypothetical protein FG01831.1 [...]	51
4e-06		
gi 37724083 gb AAN76355.1	hydrophobin [<i>Gibberella moniliformis</i>]	49
1e-05		
gi 4337063 gb AAD18059.1	magnaporin [<i>Magnaporthe grisea</i>] >...	49
2e-05		
gi 1706154 sp P52753 CRYP_CRYPA	Cryparin precursor >gi 3050...	47
1e-04		
gi 38100957 gb EAA48004.1	hypothetical protein MG09134.4 [...]	46
2e-04		
gi 32416840 ref XP_328898.1	probable magnaporin protein [<i>M. grisea</i>]	42
0.003		
gi 37723315 gb AAO16870.1	hydrophobin 4 [<i>Gibberella moniliformis</i>]	39
0.019		
gi 12584528 emb CAC27407.1	hydrophobin [<i>Cladosporium fulvum</i>]	39
0.023		
gi 2133325 pir S62753	cerato-ulmin precursor - fungus (<i>Ophiostoma ulmi</i>)	35
0.38		
gi 1705756 sp Q06153 CEUL_OPHUL	CERATO-ULMIN PRECURSOR	34
0.53		
gi 40644368 emb CAD58391.1	cerato-ulmin [<i>O. ulmi</i>]	34
0.70		
gi 1870028 emb CAB02151.1	cerato-ulmin [<i>O. ulmi</i>]	34
0.73		

Risultati

gi 2065353 emb CAB02147.1 cerato-ulmin [<i>O. ulmi</i>]	34
0.80	
gi 42552227 gb EAA75070.1 hypothetical protein FG06128.1	33
1.4	
gi 262916 gb AAB24789.1 cerato-ulmin [synthetic construct]	32
2.2	
gi 4499830 emb CAB39312.1 hydrophobin 5 [<i>C. fulvum</i>]	32 3.6

Fig. 33. Analisi tblastx della sequenza amminoacidica Hytra1.

Il gene codificante per la nuova idrofobina di *T. atroviride* è stato nominato *Hytra1*. La regione codificante, senza il peptide segnale, è costituita da 213 bp che codificano per una proteina di 71 amminoacidi. Nella sequenza di terminazione sono state individuate le sequenze consenso Nit2 (TATCAT) attiva in geni regolati dall'azoto, ADR1 (GGGAGG; AGGGGT), regolatrice nei geni che codificano per alcool deidrogenasi, e STRE (TGAGGGGT), consenso in geni attivati in risposta a stress (<http://motif.genome.ad.jp>).

La sequenza amminoacidica di HYTRA1 presenta la sequenza tipica delle idrofobie $X_n-C-X_{5-10}-C-C-X_{11-44}-C-X_{8-23}-C-X_{5-9}-C-C-X_{6-18}-C-X_m$, presentando infatti gli 8 residui di cisteina nelle posizioni conservate, tale da consentire la formazione di 4 ponti disolfuro. In figura 34 è mostrato il confronto tra la sequenza amminoacidica HFBII e la sequenza dell'idrofobina HFBI con la sequenza amminoacidica di Hytra1.

1

```
Hytra1: 1 AVCP TGLFSNPLCCSTNVLDLVGVDCVTPTAAV PDGVFFQAHCASKGKQPLCCVAPVAKQ 60
      AVCPTGLFSNPLCC+TNVLDL+GVDC TPT AV G FQAHCASKG + PLCCVAPVA Q
HFBI: 1 AVCP TGLFSNPLCCATNVLDLIGVDC K TPT I AVDTGAI FQAHCASKGSKPLCCVAPVADQ 60
```

```
Hytra1: 61 GVL CQKPIGT 70
      +LCQK IGT
HFBI: 61 ALL CQKAIGT 70
```

2

```
Hytra1: 2 VCP TGLFSNP LCCSTNVLDLVGVDCVTPTAAV PDGVFFQAHCASKGKQPLCCVAPVAKQG 61
      VCP GLFSNP CC+T VL L+G+DC P+ V DG F+ CA G QPLCCVAPVA Q
HFBI: 29 VCPPGLFSNPQCCATQVLGLIGLDCKVPSQNVYDGTDFRNVC AKTGAQPLCCVAPVAGQA 88
```

Risultati

Hytra1: 62 VLCQKPIG 69
+LCQ +G
HFBI: 89 LLCQTAVG 96

Figura 34. Confronto tra la sequenza amminoacidica Hytra1 e le idrofobine di *T. reesei* HFBI (1) e HFBI (2). I residui di cisteina sono contrassegnati in blu e gli amminoacidi identici in rosso.

4. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni i funghi appartenenti al genere *Trichoderma* hanno ricevuto considerevole attenzione come agenti di biocontrollo nei confronti di funghi patogeni di grande rilevanza economica. Le potenziali applicazioni di questi microrganismi in strategie alternative alla lotta chimica per il controllo di svariate fitopatie hanno indotto molteplici studi per la comprensione delle basi molecolari che regolano i processi di biocontrollo (Harman and Kubicek, 1998). Diversi autori hanno evidenziato che l'attività antagonistica e micoparassitica è in molti casi associata alla produzione di antibiotici ed enzimi degradativi la parete cellulare. Molti di questi composti, e i geni che li codificano, sono stati isolati e caratterizzati, consentendo di chiarire alcuni aspetti del complesso processo antagonistico. Tuttavia, la maggior parte degli studi realizzati fino ad ora si sono concentrati sull'interazione microbica *Trichoderma*-agente patogeno tralasciando gli effetti dell'interazione *Trichoderma*-pianta nei meccanismi che contrastano l'insorgenza della malattia. Recenti studi hanno inoltre evidenziato che diversi ceppi di *Trichoderma* sono in grado di stabilire un'interazione simbiotica con la pianta migliorandone la crescita e lo sviluppo. È stato, inoltre, dimostrato che la colonizzazione da parte di *Trichoderma* dei primi strati cellulari dell'epidermide radicale attiva una resistenza sistemica indotta (ISR) che rende l'intera pianta meno suscettibile all'attacco di patogeni ed a stress ambientali (Bigirimana *et al.*, 1997; Yedidia *et al.*, 1999; Yedidia *et al.*, 2000; Howell *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2000; Yedidia *et al.*, 2003). Nonostante la sua ovvia importanza, il meccanismo con cui *Trichoderma* interagisce con la pianta

stimolando le risposte di difesa è poco studiato e tuttora non sono ancora noti geni e prodotti genici coinvolti in tale interazione.

Alla luce di queste considerazioni, un primo obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di studiare i fattori che regolano l'interazione *Trichoderma*-pianta e, in modo particolare i meccanismi con cui questo fungo stimola le risposte di difesa. Sulla base di quanto noto dell'interazione tra il fungo patogeno *Cladosporium fulvum* ed il pomodoro e dei meccanismi che regolano il riconoscimento tra il patogeno e la pianta nelle combinazioni incompatibili, è stata realizzata una trasformazione di *Trichoderma* con il gene di avirulenza *Avr4* di *C. fulvum*. Il gene *Avr4* di *C. fulvum* codifica per un elicitore proteico razza-specifico, capace di indurre la risposta di difesa, inclusa la reazione di ipersensibilità, in piante di pomodoro che hanno il corrispondente gene di resistenza *Cf4*. In particolare, sono stati preparati trasformanti di *Trichoderma* contenenti il gene di avirulenza *Avr4* sia sotto il controllo del promotore costitutivo *gdp* di *Aspergillus nidulans*, sia sotto il controllo del promotore inducibile *ech42* di *T. atroviride*. In *A. nidulans*, il promotore *gdp* esprime costitutivamente il gene *gdp* che codifica per l'enzima gliceraldeide-3-fosfatodeidrogenasi. (Punt *et al.*, 1988). In *Saccaromices cerevisiae*, l'enzima gliceraldeide-3-fosfatodeidrogenasi rappresenta il 5% delle proteine cellulari totali (Krebs *et al.*, 1953). Il promotore *ech42* codifica per l'enzima chitinolitico *Chit42* considerato avere un ruolo chiave nel processo di biocontrollo in *Trichoderma* (Woo *et al.*, 1999), e che viene attivato nell'interazione micoparassitica tra *Trichoderma* e fungo patogeno (Carsolio *et al.*, 1994; Inbar e Chet 1995; Lorito *et al.*, 1996).

Per la trasformazione genetica di *Trichoderma* sono stati utilizzati due metodi, quello della permeabilizzazione dei protoplasti con PEG (Penttilä *et al.*, 1987) e quello della trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* (Zeilinger, 2004). Quest'ultimo è stato utilizzato anche per la trasformazione di *T. viride* con il gene *avr4* sotto il controllo del promotore inducibile *ech42*. Questo metodo di trasformazione mediata da *A. tumefaciens*, che tra l'altro è stato per la prima volta utilizzato per il *T. viride*, presenta notevoli vantaggi rispetto al metodo dei protoplasti. Infatti permette di:

1. Lavorare direttamente con spore, evitando la preparazione dei protoplasti.
2. Ridurre tempi e costi.
3. Aumentare l'efficienza di trasformazione (mediamente 3-4 volte più elevata rispetto all'altro metodo).
4. Aumentare la probabilità di inserzione di una copia singola del DNA eterologo, riducendo quindi la probabilità di attivare fenomeni di silenziamento genico.

I risultati delle analisi Southern e northern effettuati sui trasformanti con il gene *Avr4* sotto il controllo del promotore costitutivo *gdp* hanno consentito di identificare tre isolati (A 3/1, L 1/3 H, 3/2) che presentavano una forte espressione del gene eterologo. Nella frazione proteica intracellulare di due trasformanti è stata individuata una banda di 10 kDa corrispondente alla dimensione della proteina AVR4. Questi risultati indicano che il tradotto presente nei due trasformanti non viene secreto nel mezzo di crescita *in vitro* nonostante la proteina AVR4 presenti un peptide segnale per la secrezione extracellulare. Sorprendentemente anche

per i trasformanti di *C. fulvum* con il gene *Avr4* sotto il controllo del promotore costitutivo *gdp* la proteina AVR4 non viene secreta nel mezzo di crescita *in vitro* ma resta intracellulare (Van del Burg *et al.*, 2003). Inoltre è stato dimostrato che il gene di avirulenza *Avr4* in *C. fulvum* è altamente espresso durante la colonizzazione delle foglie di pomodoro mentre il livello di espressione del gene è appena rilevabile quando il fungo viene allevato *in vitro* (Joosten *et al.*, 1994; Van den Ackerveken and De Wit, 1994). Ciò potrebbe essere spiegato considerando che recenti studi rivolti alla determinazione delle funzioni intrinseche di questi elicitori riferiscono per la proteina AVR4 un'attività "chitin-binding" (Shen *et al.*, 1999). Sembra di fatto che in *C. fulvum* AVR4 si leghi alla chitina presente nella parete cellulare, proteggendola dalle chitinasi prodotte dalla pianta (Van del Burg *et al.*, 2003). Tuttavia, durante la crescita *in vitro* la chitina presente nella parete cellulare del fungo è inaccessibile all'azione idrolitica degli enzimi secreti dalla pianta (Joosten *et al.*, 1995), per cui la proteina AVR4 non viene prodotta. Durante il processo infettivo, invece, l'espressione del gene è indotta subito dopo la penetrazione nelle foglie di pomodoro (Joosten *et al.*, 1997) e la proteina AVR4 prodotta si lega alla parete cellulare del fungo e in particolare nelle zone dove la chitina è più esposta ed accessibile all'azione enzimatica. Solo quando si è raggiunta la completa saturazione in queste zone la proteina AVR4 viene liberata nello spazio apoplastico. (Van den Burg *et al.*, 2003).

Van den Burg e colleghi, (2003) hanno inoltre dimostrato che *in vitro* la proteina AVR4 è in grado di legare la chitina presente nelle parete cellulare sia di *T. viride* che *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* proteggendo tali funghi dall'azione degradativa degli enzimi chitinolitici prodotti dalla pianta. In accordo con tale

risultato, in questo lavoro di tesi i trasformanti ottenuti hanno mostrato capacità antagonistiche migliorate. I saggi di competizione *in vitro* hanno dimostrato che nei confronti di *A. alternata* i trasformanti hanno una maggiore capacità antagonistica rispetto al ceppo selvatico P1, riuscendo a colonizzare completamente il patogeno.

Gli effetti della presenza del gene di avirulenza *avr4* in *Trichoderma* sono stati valutati anche con saggi *in vivo* su linee di pomodoro in grado di riconoscere o meno il prodotto del gene *avr4*. I risultati di questo studio dimostrano, innanzitutto, la capacità di *T. atroviride* ceppo P1 di promuovere fortemente la crescita di piante di pomodoro indicando perciò una benefica interazione tra *Trichoderma* e le linee di pomodoro saggiate. Inoltre, quando le linee di pomodoro MM-Cf4, che riconoscono il prodotto del gene di avirulenza *avr4*, vengono trattate con le spore dei trasformanti, presentano una germinazione e uno sviluppo ritardato, una crescita stentata ed un'evidente riduzione dell'apparato radicale rispetto alle stesse cresciute in presenza del ceppo selvatico P1. Inoltre, sulle radici è stata riscontrata la presenza di piccole necrosi e suberificazioni simili a tipiche reazioni di ipersensibilità (HR) associate all'interazione incompatibile tra pianta e fungo fitopatogeno. Questo indica che il sistema di riconoscimento molecolare *avr4* - *Cf4* ha funzionato anche nell'interazione *Trichoderma* - pomodoro. È possibile quindi che l'espressione costitutiva del gene *Avr4* in *Trichoderma* abbia causato, in seguito al riconoscimento di AVR4 nelle piante MM-Cf4, una iperattivazione delle risposte di difesa normalmente associate anche alla colonizzazione delle radici da parte di *Trichoderma*, alterando così la benefica associazione tra il *Trichoderma* e la pianta. Questi

risultati sono inoltre particolarmente interessanti perché suggeriscono che le proteine Cf sono espresse anche nell'apparato radicale, dato questo che al momento non risulta presente in bibliografia. Da quanto esposto sembra evidente che esiste un sistema di riconoscimento ed interazione che si basa sul trasferimento di composti bioattivi dal *Trichoderma* alla pianta e viceversa. L'ipotesi che l'interazione *Trichoderma*-pianta coinvolga un meccanismo di riconoscimento molecolare è avvalorata anche dalle recenti scoperte che la percezione in pianta di batteri simbiotici e funghi micorrizici è mediata da recettori proteici simili nella struttura ai prodotti dei geni di resistenza (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002). Attualmente l'attivazione della resistenza sistemica indotta (ISR) sembra legata alla combinazione pianta-ceppo di *Trichoderma*. Inoltre in un recente studio di Harman e collaboratori (2004a) è stato dimostrato che solo specifiche linee di mais ricevono gli effetti benefici della colonizzazione di *Trichoderma*, come la promozione della crescita e l'induzione di resistenza sistemica. Sembra quindi che solo alcune specie e ceppi di *Trichoderma* sono capaci d'instaurare un'associazione di tipo simbiotica con la pianta (Harman *et al.*, 2004b).

I risultati ottenuti dai saggi *in vivo* assumono, quindi, una notevole importanza in relazione alla possibilità di usare *Trichoderma*, ed altri funghi antagonisti, per veicolare elicitori proteici in pianta allo scopo ad esempio di attivare l'ISR. I cromatogrammi, ottenuti dall'analisi con l'HPLC e la TLC degli estratti acetonicici di foglie di piante MM-Cf4 cresciute in presenza dei trasformanti e in presenza del ceppo selvatico, mostrano l'induzione della sintesi di diverse fitoalessine e costituiscono una ulteriore conferma di una reazione nelle piante MM-Cf4 alla

produzione di AVR4. È pertanto possibile indurre diverse risposte di difesa in pianta attraverso l'espressione eterologa di elicitori proteici al fine di aumentare il numero di patogeni controllati direttamente ed indirettamente da *Trichoderma*. Questo quindi apre la possibilità di selezionare ceppi di *Trichoderma* in grado di trasferire molecole utili alla pianta sotto il controllo di promotori costitutivi o inducibili dall'interazione con il patogeno (Mach *et al.*, 1999; Zeilinger *et al.*, 1999) o con la pianta (Lu *et al.*, 2004).

I risultati ottenuti durante questo lavoro di tesi hanno avviato la ricerca di geni di avirulenza in *Trichoderma*. I geni di avirulenza sono importanti determinanti molecolari nei meccanismi di riconoscimento tra il patogeno e l'ospite e possono codificare per piccole proteine ricche di cisterna (Luderer *et al.*, 2002). Per alcuni di essi è stato ipotizzato uno specifico ruolo nella biologia del patogeno. Infatti pur essendo determinanti molecolari di avirulenza, si ritiene che la loro funzione per il patogeno sia associata alla virulenza. Inoltre essi appaiono spesso ben conservati nell'evoluzione del patogeno, evidentemente perché sono stati in grado di fornire ad esso un vantaggio selettivo.

Il primo indizio di una presenza di geni *avr* -like in *Trichoderma* è stato ottenuto dall'analisi Southern effettuata per la caratterizzazione genetica - molecolare dei trasformanti. In questo esperimento, infatti, si sono ottenute bande di ibridazione con la sonda *avr4* nel DNA del ceppo selvatico P1. L'analisi Southern è stata quindi estesa a diversi isolati selvatici di *T. atroviride* ceppo P1, ottenendo chiari segnali d'ibridazione in tutti gli isolati analizzati. A conferma di ciò, anche Harman e colleghi, hanno successivamente individuato nel proteoma del ceppo T22 di *T. harzianum* una proteina simile ad AVR9 (dati non pubblicati).

Questi risultati suggeriscono, quindi, la presenza di omologhi di *avr4* e *avr9* in diverse specie di *Trichoderma*. Inoltre le microinfiltrazioni dei filtrati colturali dei trasformanti, o del ceppo selvatico P1, in piante che riconoscono o meno il prodotto del gene *avr4*, hanno sempre prodotto una reazione di ipersensibilità dovuta probabilmente alla presenza, anche nel ceppo selvatico, di elicitori proteici attivi nelle linee di pomodoro saggiate. Sulla base di queste osservazioni si è avviata la ricerca di proteine di *Trichoderma* con caratteristiche simili a quelle di AVR4 (dimensioni di circa 10 kDa e capacità di legare specificamente la chitina) in diversi isolati di *T. atroviride* (P1 e Fyto 822), *T. harzianum* (T22) e *T. viride*. Nel filtrato colturale del ceppo T22 di *T. harzianum* è stata trovata una proteina secreta di circa 10 kDa che si lega alla chitina e che ha mostrato un'elevata omologia di sequenza con idrofobine di altri funghi. È stata clonata l'intera sequenza codificante del gene, che è stato denominato *Hytra1*, e parte del terminatore. L'analisi in database (TblastX) ha mostrato un'omologia particolarmente alta (80%) con un'idrofobina di *T. reesei*.

Le idrofobine sono proteine specifiche dei funghi filamentosi caratterizzate da 8 residui di cisteine, in posizioni fortemente conservate, formanti 4 ponti disolfuro e che risultano indispensabili per la corretta acquisizione della struttura tridimensionale. Le idrofobine hanno una lunghezza che varia da 83 a 400 amminoacidi e normalmente mostrano un basso livello di similarità tra le loro sequenze nucleotidiche. Alcune formano nella struttura secondaria foglietti- β ed α -eliche (Witthof and Spanu, 2003). È stato dimostrato che hanno un importante ruolo nella diffusione delle spore, nella formazione di strutture aeree e nell'interazione fungo-pianta (Wösten, 2001). Queste proteine possono essere raggruppate

in due classi: classe I e classe II. Le idrofobine si auto-assemblano per formare aggregati, e si differenziano per il diverso grado di solubilità (Wessels, 1994).

L'elevata similarità della sequenza amminoacidica di Hytra1 con quella di HFBII suggerisce una simile struttura secondaria e terziaria delle due proteine. E' quindi possibile postulare che al pari della idrofobina HFBII, Hytra1 appartiene alla classe II e presenta una struttura globulare che è stabilizzata dai quattro ponti disolfuro (fig. 38).

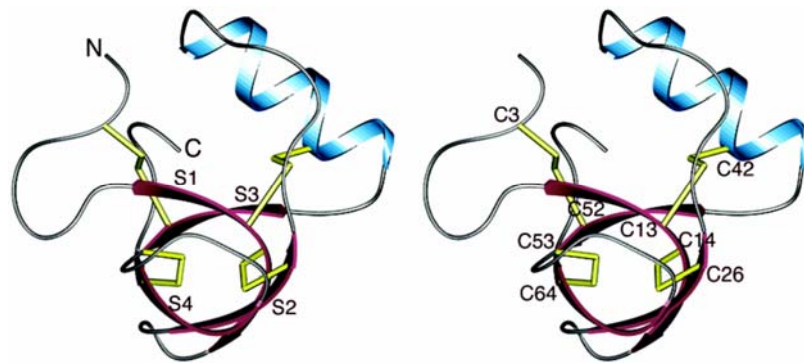


Fig. 38. Struttura di HFBII con i quattro ponti disolfuro in giallo, i residui di cisteina, i foglietti- β in rosso (S1, S2, S3, S4) e l' α -elica in azzurro (da Hakanpää *et al.*, 2004).

Una delle funzioni delle idrofobine è quella di conferire idrofobicità alla superficie dell'ifa del fungo a contatto con l'aria, e di mediare l'adesione del fungo sulla superficie idrofobica dell'ospite. Queste proteine anfifiliche vengono, infatti, secrete nello spazio extracellulare, si auto-assemblano a formare una sorta di membrana anfipatica e circondano la parete cellulare del fungo con la parte idrofilica, esponendo il dominio idrofobico nell'ambiente esterno (aria o superficie idrofobica dell'ospite) (Wösten, 2001). I monomeri di idrofobine, rilasciati nell'interfaccia

tra la parete del fungo e l'ambiente circostante, possono anche modulare l'interazione fungo – pianta, agendo come tossine od elicitori (Wösten, 2001). La fitotossina cerato-ulmina (CU) di *Ophiostoma ulmi* e *O. novoulmi* è un esempio di idrofobina localizzata sulla superficie del fungo e agisce da fattore di patogenicità, alterando la permeabilità della membrana delle cellule dell'ospite (Bolyard and Sticklen, 1992). Queste proteine, però, oltre ad avere un ruolo nella patogenicità e nella morfogenesi dei funghi potrebbero essere coinvolte nel riconoscimento fungo – pianta (Templeton *et al.*, 1994). Le idrofobine, infatti, sono proteine ricche di cisteina al pari di molti prodotti dei geni di avirulenza di funghi fitopatogeni (per esempio i geni *avr* di *C. fulvum*), ed essendo localizzate sulla parete cellulare del fungo, potrebbero mediare la percezione del patogeno da parte della pianta. L'idrofobina Hytra1 potrebbe quindi agire come il prodotto di un gene di avirulenza, e indurre le risposte di difesa associate all'interazione *Trichoderma* – pianta, come osservato per vari isolati di questi funghi (Harman *et al.*, 2004b). Ulteriori studi, come la distruzione genica mirata e la superespressione del gene *Hytra1* potranno chiarire il coinvolgimento di questa ed altre idrofobine nell'interazione tra funghi antagonisti e piante.

La ricerca di geni di avirulenza in *Trichoderma* può essere importante per lo sviluppo di nuove strategie biotecnologiche applicate alla difesa delle piante. Vi sono alcuni esempi in cui sono stati utilizzati geni di avirulenza, provenienti da virus, batteri e funghi patogeni, sotto il controllo di promotori inducibili da patogeno, per trasformare piante contenenti il corrispettivo gene di resistenza. È questo il caso del gene *hrmA* di *Pseudomonas syringae*, utilizzato sotto il controllo di un promotore inducibile da

nematodi per ottenere piante transgeniche di tabacco resistenti ad alcuni virus, funghi, e batteri patogeni (Shen *et al.*, 2000). Un'altra applicazione biotecnologica ben documentata è quella che vede la trasformazione di piante di pomodoro contenenti il gene di resistenza *Cf9* con il gene di avirulenza *Avr9* isolato da alcuni ceppi di *C. fulvum* (De Wit, 1992). Il sistema anche in questo caso si basa sulla presenza contemporanea nella stessa pianta del gene di resistenza e del gene di avirulenza inserito sotto il controllo di un promotore inducibile che funge da sensore per l'attacco dei patogeni. Il promotore inducibile viene così attivato da elicitatori non specifici prodotti da diversi patogeni vegetali. A seguito dell'interazione fra il prodotto genico *Avr9* ed il prodotto del gene di resistenza *Cf9* si otterrà l'attivazione di una risposta ipersensibile, e quindi, della resistenza verso patogeni suscettibili.

Inoltre è stato proposto da De Wit (1992) anche un sistema a due componenti che prevede la trasformazione di piante sia con un gene di avirulenza (per esempio i geni *avr* di *C. fulvum*) sotto il controllo di un promotore inducibile da patogeno, sia con il corrispettivo gene di resistenza (per esempio i geni *Cf* di pomodoro) sotto il controllo di un promotore costitutivo. Il linea generale queste strategie che sfruttano geni di avirulenza di un patogeno presentano, però, il limite di poter essere utilizzati solo in quelle specie di piante che sono in grado di riconoscere il prodotto del gene di avirulenza. Inoltre in queste piante deve essere presente il sistema di trasduzione del segnale che porta alla reazione d'ipersensibilità (HR) o ad altre risposte di difesa.

La ricerca e l'utilizzo di geni di avirulenza in funghi benefici/antagonisti come *Trichoderma* e che sono simbionti opportunisti ed avirulenti su una grande varietà di piante coltivate,

potrà consentire di superare la limitata applicabilità dei geni di avirulenza derivati da patogeni (in generale dovuta alla loro specificità) attraverso strategie transgeniche che permettano di sfruttare l'ampio spettro d'azione di questi nuovi geni *avr*. Infatti la trasformazione di piante con geni di avirulenza derivati da questo fungo, sotto il controllo di opportuni promotori inducibili, consentirebbe di attivare meccanismi di difesa in presenza di un'infezione da parte di un patogeno in tutte quelle specie di piante capaci di attivare uno stato di ISR a contatto con *Trichoderma*.

Questi geni di avirulenza possono anche essere utilizzati per la trasformazione di ceppi agenti di biocontrollo di *Trichoderma*, incluso quelli già applicati in agricoltura come biofitofarmaci, che non inducono resistenza sistemica, aumentando quindi la loro efficacia e spettro d'azione. Inoltre la possibilità di isolare e clonare geni di pianta che riconoscono molecole segnale di *Trichoderma* consentirebbe di modificare favorevolmente l'interazione tra questo fungo benefico e molte varietà di piante coltivate.

Con la presente tesi, inoltre, ci siamo posti l'obiettivo di verificare un eventuale coinvolgimento dei trasportatori ABC nei meccanismi fisiologici e molecolari che conferiscono resistenza a *Trichoderma* nei confronti di svariate sostanze tossiche. I trasportatori ABC sono proteine di membrana presenti in tutti gli organismi viventi. Nei funghi, una delle loro principali funzioni è rappresentata dall'efflusso attivo di composti tossici, di origine endogena o esogena, impedendone un accumulo intracitoplasmatico dannoso o mortale per la cellula (Nakaune *et al.*, 2002). I trasportatori ABC possono avere una larga specificità di substrato per i prodotti tossici e possono rappresentare una prima barriera difensiva per i microrganismi. Nei funghi fitopatogeni i

trasportatori ABC giocano un ruolo fondamentale nella resistenza alle sostanze di difesa della pianta e a numerosi fungicidi di sintesi (De Waard *et al.*, 1996; De Waard and Van Nistelrooy, 1979; 1980). Essi, inoltre, sono coinvolti nella secrezione di antibiotici, tossine, ormoni steroidei, etc (Del Sorbo *et al.*, 2000). In *Trichoderma* spp., la funzione dei trasportatori ABC è ancora totalmente sconosciuta. Il presente lavoro di tesi riporta i risultati ottenuti dall'identificazione e dalla caratterizzazione dei primi 4 geni codificanti per trasportatori ABC in *Trichoderma atroviride* P1. I quattro frammenti genici sono stati clonati, tramite PCR, utilizzando primers degenerati e disegnati su sequenze di trasportatori ABC già caratterizzati in diversi funghi filamentosi. I frammenti ottenuti sono stati denominati *Tabc1*, *Tabc2*, *Tabc3* e *Tabc4* (**T**richoderma **A**TP-**b**inding-**c**assette). L'analisi delle quattro sequenze, effettuata con il programma BlastX, ha rivelato, come atteso, che tali frammenti genici sono parte di geni codificanti per trasportatori ABC, che presentano, in particolare un elevato grado di omologia con trasportatori ABC di altri funghi fitopatogeni. La maggior parte di tali omologhi sono stati caratterizzati come importanti determinanti molecolari della polichemioresistenza a numerosi fungicidi e sostanze di difesa delle piante. Questo suggerisce la possibilità che anche in *Trichoderma* i trasportatori identificati in questo lavoro possano svolgere un ruolo simile, proteggendo il fungo da composti tossici esogeni, provenienti da attività antropiche o prodotti durante le complesse interazioni che il fungo stabilisce con la pianta, l'agente patogeno e il resto della microflora.

L'eventuale coinvolgimento dei geni in esame nei meccanismi che conferiscono resistenza a sostanze tossiche di origine antropica

è stata analizzata considerando che l'espressione dei trasportatori ABC viene indotta o incrementata in seguito all'aumento della concentrazione intracellulare di alcuni metaboliti. In base a ciò è stato valutato il livello di espressione dei suddetti geni allevando *Trichoderma* in mezzo liquido in presenza di diversi fungicidi.

I dati in nostro possesso indicano che i geni *Tabc1*, *Tabc2* e *Tabc3* sono espressi costitutivamente a bassi livelli. Il livello di trascritto dei tre geni aumenta notevolmente in seguito al trattamento del micelio con i fungicidi dicloran e benomyl. Quest'ultimo appartiene al gruppo dei fungicidi benzimidazolici, il cui meccanismo d'azione si basa sull'inibizione della mitosi (Hammerschlag *et al.*, 1973) mediante la formazione di complessi tra il principio attivo (benomyl) e le β -tubuline che impediscono la realizzazione dei microtubuli (Davids *et al.*, 1977). In molti casi, quindi, il meccanismo di resistenza ai fungicidi benzimidazolici prevede una mutazione nella sequenza amminoacidica delle β -tubuline (Adachi, 1995). Ad esempio, in *B. cinerea* la resistenza al benomyl è associata alla sostituzione, nella struttura proteica delle β -tubuline, dell'acido glutammico in posizione 198 con uno degli amminoacidi alanina, valina o lisina (Faretra *et al.*, 1991; Ishii 2002). Tuttavia, in accordo a quanto si verifica per i geni clonati in questo lavoro, la trascrizione dei geni *Pmr1* e *Pmr5*, codificanti per due trasportatori ABC, in *Penicillium digitatum* è indotta da fungicidi benzimidazolici (Nakaune *et al.*, 2002). Inoltre, mutanti difettivi per questi geni presentano una incrementata sensibilità nei confronti di fungicidi DMI (**D**e**M**ethylation **I**nhibitors o inibitori della demetilazione degli steroli) e di svariati altri composti, inclusa la fitoalessina resveratrolo e la camptotecina, un alcaloide naturale prodotto da *Camptotheca acuminata*. È possibile che molte di

queste sostanze possano essere potenziali substrati per i geni *Tabc* di *Trichoderma* e in particolare per *Tabc2*. Infatti, l'analisi BlastX ha evidenziato per quest'ultimo un elevato grado di omologia con il gene *Pmr5* di *P. digitatum* e con il gene *AtrbB* di *Aspergillus nidulans*. La funzione di *Atrb* in *A. nidulans*, è stata determinata valutando la sensibilità di mutanti difettivi, o che overesprimono il gene, nei confronti di diversi composti tossici. La trascrizione del gene nel micelio di *A. nidulans* è fortemente indotta dal trattamento con diverse sostanze tossiche, tra cui antibiotici (cicloesimmide), fungicidi sintetici e sostanze di difesa delle piante (pisatina, resveratrolo). Studi di complementazione in *S. cerevisiae* hanno inoltre dimostrato che l'espressione del gene *atrB* è in grado di sopperire all'ipersensibilità a diverse sostanze tossiche causata dalla distruzione nel lievito, del gene codificante per il trasportatore *Pdr5* (Del Sorbo *et al.*, 1997). Tali osservazioni dimostrano che *AtrB* è un omologo di *Pdr5*, e attribuiscono a questo gene un ruolo importante nella polichemioresistenza nei confronti di composti tossici di origine naturale e di diversi fungicidi. Le analogie tra la sequenza nucleotidica di *Tabc2* ed i suoi omologhi più stretti suggeriscono che tale gene in *Trichoderma* possa essere un importante fattore MDR (**M**ulti**D**rug **R**esistence). Tuttavia, diversamente da *Atrb*, *Tabc2* non sembra essere indotto da fungicidi appartenenti alla classe dei DMI. Infatti, la trascrizione del gene *Tabc2* sembra essere repressa dalla presenza del Procloraz che, invece, induce forti livelli di trascrizione per *Tabc1* e *Tabc3*. D'altro canto una simile specificità nei substrati è stata anche riportata per i trasportatori ABC *Pmr1* e *Pmr5* in *P. digitatum*. In particolare, i fungicidi DMI attivano specificamente l'espressione di *Pmr1* e non di *Pmr5*. Quest'ultimo è invece indotto da ditiochinone

e resveratrolo (Nakaune *et al.*, 2002). Anche i trasportatori ABC Pdr5 e Snq2 in *S. cerevisiae* sono indotti da diverse sostanze (Hirata *et al.*, 1994). Il prodotto del gene Snq2, ad esempio, quando sovraespresso conferisce resistenza a sostanze mutagene, come la 4-nitrochinolina N-ossido, il triazichinone, il sulfometuron metile e la fenantrolina (Servos *et al.*, 1993). Il prodotto del gene Pdr12 è invece coinvolto nella resistenza agli acidi organici come l'acido propionico e l'acido sorbico. In *S. cerevisiae* sono stati identificati almeno 29 geni codificanti per trasportatori ABC, anche se solo di alcuni di essi è stata studiata la funzione. È altamente probabile, quindi, che tutti i microrganismi, compreso *Trichoderma*, possiedano numerosi geni codificanti per trasportatori ABC con funzioni diverse e complementari. I nostri dati indicano che in *Trichoderma* alcuni di questi geni sono sicuramente coinvolti nella polichemioresistenza nei confronti di diversi fungicidi.

Dal punto di vista funzionale, ulteriori conferme sul ruolo svolto dai prodotti dei geni clonati potrebbero venire da studi di immunolocalizzazione. Altri approcci possibili, per studiare la funzione di questi geni, potrebbero includere strategie transgeniche quali il silenziamento, che permette di inibirne l'espressione genica e valutare le eventuali differenze nella fisiologia dei mutanti rispetto al ceppo selvatico in termini resistenza offerta a sostanze tossiche. Inoltre, con l'identificazione della sequenza nucleotidica completa potrebbe risultare possibile la realizzazione di mutanti sovraesprimenti i geni *Tabc*, e quindi valutare gli effetti di tale modificazione livello.

L'analisi di una libreria genomica di *T. atroviride* P1 ha permesso di clonare l'intera sequenza del gene *Tabc2*. La sequenza nucleotidica è di 6535 bp, di cui 1624 bp appartengono alla regione

promotrice e 642 bp a quella del terminatore. Sono inoltre stati evidenziati due introni. Precisamente, si tratta di due sequenze di 63 e 51 nucleotidi, posizionate rispettivamente tra il 699° e il 756° e tra il 1647° e il 1698° nucleotide a valle del codone di inizio.

La regione codificante corrisponde ad una sequenza di 1418 residui amminoacidici, e conserva tutte le caratteristiche delle proteine appartenenti ai trasportatori ABC, inclusi i motivi Walker A, Walker B e la sequenza “ABC signature”. L’analisi della regione promotrice ha permesso d’individuare diverse sequenze consenso per fattori di trascrizione, note anche in relazione a quelle del gene *ech42* codificante per la endochitinasi CHIT42 di *T. atroviride*, un importante enzima chitinolitico attivato durante i processi micoparassitici. In particolare sono state individuate sequenze consenso per motivi HSF (Heat Shock Factor), NIT-2, *adr1p*, *StuAp*, *Cre1* ed elementi *Stree*. Alcune di queste sequenze sono riconosciute da fattori trascrizionali necessari per l’attivazione dei geni in risposta a stress di varia natura (chimici, fisici e nutrizionali) (Marchler *et al.*, 1993). I fattori di trascrizione HSF, ad esempio, attivano l’espressione di geni coinvolti nella risposta a stress termici. Invece, *Nit-2*, in *Neurospora crassa*, è responsabile della riattivazione del catabolismo da azoto, quando i livelli cellulari dell’acido glutammico e/o di altri fonti di azoto sono limitati. Tale fattore riconosce e lega specifici elementi sul DNA costituiti da una sequenza TATCTA ripetuta in tandem. Sono state inoltre individuate sequenze consenso per il fattore trascrizionale *Cre1*, ampiamente studiato per il suo ruolo nel meccanismo di repressione da catabolita (Ilmen *et al.*, 1996). In particolare, Lorito e colleghi (1996) hanno dimostrato che durante il micoparassitismo l’espressione di *Ech-42* in *Trichoderma atroviride* è regolata dal

legame del repressore trascrizionale Cre1 a determinati siti del promotore di *Ech-42*. Prima del contatto con il fungo patogeno, Cre1 è legato alla sua sequenza target impedendo all'attivatore trascrizionale del gene *Ech-42* di legarsi al suo sito specifico. Dopo il contatto con il patogeno, Cre1 viene alterato strutturalmente e si dissocia dal sito target, permettendo la formazione del legame che induce l'espressione del gene *Ech-42*. Questo modello presenta notevoli similitudini con il meccanismo che regola, *in vivo*, l'espressione del gene *Alc* in *A. nidulans*. In questo caso, i siti di legame per il repressore CreA e l'attivatore trascrizionale AlcR sono molto vicini e l'occupazione di uno dei due siti, da parte della rispettiva proteina, preclude l'occupazione dell'altro. Per le analogie riscontrate, è possibile che *Tabc2* sia co-regolato con *Ech42* durante il micoparassitismo e che, sempre analogamente ad *Ech42*, esso svolga un importante ruolo in tale processo (Woo *et al.*, 1999). D'altro canto, i risultati ottenuti con la beauvaricina sostengono questa ipotesi, suggerendo un coinvolgimento del gene nei meccanismi che conferiscono resistenza alle sostanze tossiche rilasciate dai patogeni durante i processi di antagonismo. Tuttavia, una prima chiara indicazione del probabile coinvolgimento del gene *Tabc2* nel micoparassitismo emerge dai risultati delle analisi northern ed RT-PCR che hanno evidenziato un'induzione della trascrizione del gene *Tabc2* in presenza della biomassa o dei filtrati colturali di funghi fitopatogeni. Successive indagini hanno evidenziato che il gene è indotto dalla presenza nel mezzo di crescita di concentrazioni crescenti di N-acetilglucosamina, glucosio e fruttosio. Alla luce di questi dati è possibile prevedere che *Tabc2* sia coinvolto nel trasporto all'interno della cellula dei prodotti di degradazione della parete cellulare dei funghi

micoparassitizzati. È noto infatti che durante il micoparassitismo *Trichoderma* secreta una vasta gamma di enzimi litici in grado di degradare chitina e β -glucani presenti nella parete cellulare del fungo ospite, liberando, tra i prodotti finali, anche monomeri di N-acetilglucosamina e glucosio (De la Cruz *et al.*, 1992; Di Pietro *et al.*, 1993, Lorito *et al.*, 1993, 1994). La nostra ipotesi è avvalorata da recenti scoperte che riferiscono di altri trasportatori implicati nel trasporto di N-acetilglucosamina e di diversi zuccheri all'interno della cellula. Ad esempio, in *Streptomyces olivaceoviridis*, l'assorbimento all'interno della cellula dell'N-acetilglucosamina e chitobiosio è mediato non solo da un sistema PTS (**P**hosphoenol **T**ransferase **S**ystem) ma anche dall'attività del trasportatore ABC Ngc codificato dall'operone *ncgEFG* (Xiano X. *et al.*, 2002; Wang F. *et al.*, 2002; Saito A. e Schrempf H., 2004). Inoltre, in *Agrobacterium tumefaciens*, Kemmer *et al.* (1997) hanno evidenziato che il gene codificante per la proteina CHVE, coinvolta nei processi di trasporto di vari zuccheri, presenta un elevato livello di omologia con proteine appartenenti alla famiglia di trasportatori ABC. Ulteriori studi, sia funzionali, attraverso la distruzione genica mirata e la superespressione del gene, sia strutturali, rivolti all'identificazione nella struttura proteica, di domini noti per la capacità di legare l'N-acetilglucosamina, potranno chiarire il coinvolgimento del gene *Tabc2* nel micoparassitismo come fattore nutrizionale.

I risultati ottenuti in questo lavoro dimostrano che i trasportatori ABC identificati sono coinvolti in importanti processi e, quindi, forniscono un importante contributo per una maggiore comprensione dei meccanismi molecolari che regolano la capacità del fungo antagonista di resistere alle svariate sostanze tossiche.

Le possibili funzioni fisiologiche svolte dai trasportatori ABC identificati in *Trichoderma* potrebbero permettere di sviluppare nuove strategie per il controllo biologico. Una overespressione di geni codificanti per trasportatori ABC potrebbe potenziare le capacità antagonistiche di *Trichoderma* spp. o migliorare la sua attività di biocontrollo laddove è richiesta una maggiore tolleranza ai fungicidi chimici. Inoltre, tali trasportatori potrebbero essere utili in strategie transgeniche per l'ottenimento di piante resistenti alle tossine prodotte dai funghi fitopatogeni.

5. BIBLIOGRAFIA

Agrios, G.N. (1998). *Plant Pathology* 4° ed., Academic Press.

Ahmad J. S. and Baker R. (1988). *Implication of rhizosphere competence of Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 34: 229-234.

Alexander M. (1971). *Microbial ecology*. John Wiley and Sons, New York.

Altomare C., Norvell W.A., Bjorkman T. and Harman G.E. (1999). *Solubilization of phosphate and micronutrients by the plant-growthpromoting and biocontrol fungus Trichoderma harzianum Rifai* 1295–22. *Applied Environmental Microbiology*. 65: 2926–2933.

Andrade A. C., Del Sorbo G., Van Nistelrooy J. G. M. and De Waard M. A. (2000a). *The ABC transporter Atrb from Aspergillus nidulans mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds*. *Microbiology*. 146: 1987-1997.

Andrade A. C., Van Nistelrooy J. G. M., Perry R. B., Skatrud P. L. and De Waard M. A. (2000b). *The role of ABC transporter Atrb from Aspergillus nidulans in protection against cytotoxic agents and antibiotic production*. *Mol. Gen. Genet*. 263: 966-977.

Ashwell G. (1957). *Colorimetric analysis of sugar*. In *Colowich S.P., and Kaplan N.O. (Eds). Methods in enzymology*. Vol III. Academic Press: 73-105.

Baker K. F. and Cook R. J. (1982). *Biological control of plant pathogens*. The American Phthopathological Society, St Paul, MN.

Barak R., Elad Y. and Chet I. (1986). *The properties of L-fucose binding agglutinin associated with the cell wall of Rhizoctonia solani*. *Arch. Microbiol*. 144: 346-349.

Benhamou N. and Chet I. (1996). *Parasitism of Sclerotium rolfsii by Trichoderma harzianum: Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction*. *Phytopathology* 86: 405-416.

Bigirimana J., De Meyer G., Poppe J. Y. E. And Hofte M. (1997). *Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum**. Medicinal Faculty Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wet.University Gent. 62: 1001–1007.

Bisset J. F. (1991). *A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification*. Can. J. Bot. 69 : 2357-2372.

Bolyard M. G. and Sticklen M. B. (1992) *Expression of a modified Dutch elm disease toxin in *Escherichia coli**. Molecular Plant – Microbe Interaction. 5: 520-524.

Bonas U. and Lahaye T. (2002). *Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition*. Curr. Opin. Microbiol. 5: pg. 44-50.

Bourne H. R., Sanders D. A. and McCormick F. (1991). *The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism*. Nature. 349: 117-127.

Bowell G. P. (1999). *Role of active oxygen species and NO in plant defence responses*. Curr Opin Plant Biol. 2: 287-294.

Bull C. T., Wadsworth M. L., Sorensen K. N., Takemoto J. Y., Austin R. K & Smilanik J. L. (1998). *Syringomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons*. Biological Control. 12: 89-95.

Calvet C., Pera J., Barea J. M. (1989). *Interaction of *Trichoderma spp.* with *Glomus mousseae* and two wilt pathogenic fungi*. Agriculture, Ecosystem and Environment. 29: 59-65.

Carsolio C., Gutierrez A., Jimenez B., Van Montagu M. and Herrera Estrella A. (1994). *Characterization of *ech42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 10903-10907.

Carson M. R., and Welsh M. J. (1995). *Structural and functional similarities between the nucleotide-binding domains of CFTR and GTP-binding proteins*. Biophys. J. 69: 2443-2448.

Castoria R. et al. (2000). *Transferring of an endochitinase-encoding gene from *Trichoderma spp.*, to antagonistic yeasts*. 5th

Congress of the European Foundation for Plant Pathology. Taormina Italy, 83.

Chet I., Baker R. (1981). *Isolation and biocontrol potential of Trichoderma harzianum from soil naturally suppressive to Rhizoctonia solani*. Phytopatology. 71 : 286-290.

Chet I. (1987). *Trichoderma: applicazion, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi*. In: Innovative Approaches to Plant Disease Control (Series and Ecological and Applied Microbiology) (eds. I. Chet). New York: J. Wiley&Sons, 137-160.

Cook R., Baker K. F. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. APS, St Paul, 539.

Corke A.T. K. (1974). *The prospect for biotherapy in trees infected by silver leaf*. Journal of Horticulture Science. 49: 391-394.

Couteaudier Y. (1992). *Competition for carbon in soil and rhizosphere, a mechanism involved in biological control of Fusarium wilts*. In: Tjamos EC, Papavizas AC, Cook RJ, eds. Biological control of plant diseases. New York: Plenum Press, 99-104.

Davidse L. C. and Flach W. (1997). *Differential binding of methyl benzimidazole-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strain of Aspergillus nidulans*. J. Cell. Biol. 72: 174-193.

Davis R. F., Backman R. Rodriguez-Kabana, and Kokalis-Burelle. (1992). *Biological control of apple fruit disease by Chaetomium globosum formulations containing cellulose*. Biologic. Cont. 2 : 118-123.

De Groot M. J. A., Bundock P., Hooykaas P. J. J. and Beijersbergen A. (1998). *Agrobacterium tumefaciens – mediated transformation of filamentous fungi*. Nature Biotechnology. 15: 839-842.

De la Cruz J., Hidalgo-Gallego A., Lora J. M., Benitez. Pintor-Toro J. A., Llobell A. (1992). *Isolation and characterization of three chitinases from Trichoderma harzianum*. European Journal of Biochemistry, 206: 859-867.

De Waard M. A. and Van Nistelrooy J. G. M. (1979). *Mechanism of resistance to fenarimol in Aspergillus nidulans*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 10:219-229.

De Waard M. A. and Van Nistelrooy J. G. M. (1980). *An energy-dependent efflux mechanism for furanimol in wild type strain and fenarimol-resistant mutants of Aspergillus nidulans*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 13. 255-266.

De Waard M. A. and Van Nistelrooy J. G. M. (1981). *Induction of fenarimol-efflux activity in Aspergillus nidulans by fungicides inhibiting sterol biosynthesis*. *J. Gen. Microbiol.* 126: 483-489.

De Waard M. A., and Van Nistelrooy J. G. M., Langeveled C. R., Van Kan J. A. L. and Del Sorbo G. (1986). *Multidrug resistance in filamentous fungi. In Modern fungicides and antifungal compounds* (H. Lyr, P. E. Russel and H. D. Sisler Eds), pp 293-299. Intercept, Andover UK.

De Waard M. A. and Van Nistelrooy J. G. M. (1987). *Inhibitors of energy-dependent efflux of fungicides fenarimol by Aspergillus nidulans*. *Exp. Mycol.* 11: 1-10.

De Waard M. A. (1997). *Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance*. *Pestic. Sci.* 51: 271-275.

De Wit, P. J. G. M. and Flach, W. (1979). *Differential accumulation of phytoalexins in tomato leaves, but not in fruits after inoculation with virulent and avirulent races of Cladosporium fulvum*. *Physiological Plant Pathology.* 15: 257-267.

Del Sorbo G., Schoonbeek H., De Waard M. A. (2000). *Fungal Transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides*. *Fungal Genetic and Biology.* 30: 1-15

Di Pietro A., Lorito M., Hayes C. K., Broadway R. M., Harman G. E. (1993). *Endochitinase from Gliocladium virens: isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination gliotoxin*. *Phytopathology,* 83: 308-313.

Dixon M. S., Jones D. A., Keddie J. S., Thomas C. M., Harrison K. and Jones J. D. G. (1996). *The tomato Cf-2 disease*

resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. Cell 84: 451-459.

Dixon M. S., Golstein C., Thomas C.M., Van der Biezen E.A. and Jones J. D. G. (2000). *Genetic complexity of pathogen perception by plants: The example of Rcr3, a tomato gene required specifically by Cf-2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 8807-8814.*

Donzelli B., Sposato P., Scala F., Woo S.L. and Lorito M. (1997). *An antifungal glucan 1,3- β -glucosidase (78 kDa) from Trichoderma harzianum strain P1: Fast purification, characterization of the enzyme activity and cloning of the encoding gene. Phytopathology. 87: S 25.*

Driessen A. J. M., Rosen B. P. and Konings W. N. (2000). *Diversity of transport mechanisms: common structural principles. Trends Biochem. Sci. 25: 397-401.*

Dubos B. (1987). *Fungal antagonism in aerial agrobiocenoses. In: Innovative Approaches to Plant Disease Control. Chet,I. Wiley, New York, 107-135.*

Dudler R. e Sidler M. (1998). *Arabidopsis MDR genes: molecular cloning and protein chemical aspects. Methods Enzymol. 292: 162-173.*

Duijff B. J., Meijer J. W., Bakker P., Schippers B. (1993). *Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of Fusarium wilt of carnation by fluorescent Pseudomonas spp. Netherlands Journal of Plant Pathology. 99: 277-289.*

Elad Y., Kalfon A., Chet I. (1982). *Control of Rhizoctonia solani in cotton seed-coating with Trichoderma spores. Plant Soil. 66: 279-281*

Elad Y., Baker R. and Chet I. (1983a). *Possible role of lectins in mycoparasitism. Journal of Bacteriology. 154: 1431-1435.*

Elad Y., Chet I. and Hanis I. (1983b). *Parasitism of Trichoderma spp. on Rhizoctonia solani and Sclerotium rolfsii – scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathology. 73: 85-88.*

Elad Y & Kapat A. (1999). *The role of Trichoderma harzianum protease in the biocontrol of Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant Pathol. 105: 177-189.

Elad Y. et al. (1999). In *Modern Fungicides and Antifungal Compounds II* (ad Ly H), 459-467.

Endre G., Kereszt A., Kevei Z., Mihacea S., Kalo P., and Kiss G.B. (2002). *A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development*. Nature. 417: 962-966.

Eparvier A. and Alabouvette C. (1994). *Use of Elisa and Gus-transformed strains to study competition between pathogenic Fusarium oxysporum for root colonization*. Biocontrol Science and Technology. 4: 35-47.

Faretra F., Pollastro S. (1991). *Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in Botryotinia fuckeliana*. Mycol. Res. 95: 943-951

Fleissner A, Sopalla C, Weltring KM. (2002). *An ATP-binding cassette multidrug-resistance transporter is necessary for tolerance of Gibberella pulicaris to phytoalexins and virulence on potato tubers*. Mol. Plant Microbe Interact. 15 (2): 102-108.

Flor H. H. (1942). *Inheritance of pathogenicity in Melampsora lini*. Phytopathol. 32: 653-669.

Flor H. H. (1971). *Current status of the gene-for-gene concept*. Ann. Rev. Phytopathol. 9: 275-296.

Fogel R. and Hunt G. (1979). *Fungal and arboreal biomass in western Oregon Douglas - fir ecosystem: distribution pattern and turnover*. Can J. For. Res. 9: 245 – 256.

Fu Y. H. and Marzluf G. A. (1990). *Nit-2, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of Neurospora crassa, encodes a sequence-specific DNA-binding protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 5331-5335.

Gabriel D. W. (1999). *Why do pathogens carry avirulence genes?* Physiol. Mol. Plant Pathol. 55: 205-214.

Gabriel, C. J. and Cook, R. J. (1991). *Biological control of plant pathogens*. FAO Plant Protection Bulletin 38 : 95-99.

Goodall S. D., Gielkens M.M. C., Stergiopoulos I., Venema K., Zwieres L.H., and De Waard M. A. (1999). *ABC transporter of Mycosphaerella graminicola, a fungal pathogen of wheat*. In 2nd FEBS Advance Lecture Course – ATP binding Cassette Transporters: from Multidrug Resistance to Genetic Disease, 77.

Grove J. F., Pople M. (1980). *The insecticidal activity of Beauvericin and enniatin complex*. *Mycopathologia*.70: 103-105.

Gullino M. L. (1992). *Control of Botrytis rot of grapes and vegetables with Trichoderma spp.* In: *Biological Control of Plant Disease*. Tjamos, E.C., Papavizas, G.C. and Cook, R.J. Plenum Press, New York, 125-132.

Haanstra J. P. W., Meijer D.-F., Lauge R., Seetanah D. C., Joosten M. H. A. J., De Wit, P. J. G. M. and Lindhout P. (2000). *Mapping strategy for resistance genes against Cladosporium fulvum on the short arm of chromosome 1 of tomato: Cf-ECP5 near the Hcr9 Milky cluster*. *Theor. Appl. Genet.* 101: 661-668.

Hammerschlang R. S. and Sisler H. D. (1973). *Benomyl and methyl 2-benzimidazolecarbamate: Biochemical, cytological and chemical aspects of toxicity to Ustilago maydis and Saccharomyces cerevisiae*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 3: 42-54.

Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G. (1997). *Plant Disease resistance genes*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48. 573-607.

Haran S., Schickler H., Oppenheim A. And Chet I. (1994). *New components of the chitinolytic system of Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.* 99 : 441-446.

Harman G. E. (1991). *Seed treatments for biological control of plant disease*. *Crop Protection.* 10: 166-171.

Harman G. E. and Kubicek P. K. (1998). *Trichoderma & Gliocladium*. Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial applications. London: Taylor and Francis, 1-393.

Harman G. E. (2000). *Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions based on research with Trichoderma harzianum T-22*. Plant Disease. 84: 377-393.

Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I. and Lorito M. (2004b). *Trichoderma species – opportunistic, avirulent plant symbionts*. Nature Reviews Microbiology. 2: 43-56.

Harman G. E., Petzoldt R., Comis A., and Chen J. (2004a). *Interactions between Trichoderma harzianum strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by Pythium ultimum and Colletotrichum graminicola*. Phytopathology. 94: 147-153.

Harms C.T. (1992). *Engineering genetic disease resistance into crops:biotechnological approaches to crop protection*. Crop Protection 11: 291-306.

Heath M.C. (2000). *Hypersensitive response-related death*. Plant Molecular Biology. 44: 321-324.

Heldin C. H. (1995). *Dimerization of cell surface receptors in signal transduction*. Cell 80: 213-223.

Herr L. J. (1995). *Biological control of Rhizoctonia solani by binucleate Rhizoctonia spp. and hypovirulent R. solani agents*. Crop Protection. 14: 179-186.

Higgins C. F. (1992). *ABC transporter: from microorganisms to man*. Annu. Rev. Cell Biol. 8: 67-113.

Hirata D., Yano K., Miyahara K., Miyakawa T. (1994). *Saccharomyces cerevisiae YDR1, which encodes a member of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily, is required for multidrug resistance*. Curr Genet. 26: 285-294.

Howell C. R., Hanson L. E., Stipanovic R. D. & Puckhaber L. S. (2000). *Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of Rhizoctonia solani by seed treatment with Trichoderma virens*. Phytopathology. 90: 248–252 .

Hyde S.C., Emsley P., Hartshorn M.J. Mimmack M.M., Gileadi U., Pearce S.R. Gallagher M.P., Gill D.R., Hubbard R.F. e Higgins C.F. (1990). *Structural model of ATP-binding*

proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. Nature. 346: 362-366.

Ilmen M., Thrane C., Pentilla M. (1996). *The glucose repressor gene Cre1 of Trichoderma: isolation and expression of a full-length and truncated mutant form. Mol. Gen. Genet. 251: 451-460.*

Inbar J. and Chet, I. (1991). *Detection of chitinolytic activity in the rizosphere using image analysis. Siol Biol. Biochem. 23: 239-242.*

Inbar J. and Chet I. (1992). *Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. J. Bacteriol. 174: 1055-1059.*

Inbar J., Abramsky M. and Chet I. (1994). *Plant growth enhancement and disease control by Trichoderma harzianum in vegetable seedlings under commercial conditions. European Journal of Plant Pathology. 100: 337-346.*

Inbar J., Chet I. (1995). *The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism of specific chitinases during mycoparasitism of Trichoderma harzianum. Microbiology. 141: 2823-2829.*

Ishii H. (2002). *DNA-based approaches for diagnosis of fungicide resistance. Agrochemical resistance. Eds. Clark, J. M., Yamaguchi I., American Society of microbiology, Washington D.C., USA, 242-259.*

Jia Y., McAdams S. A., Bryan G. T., Hershey H. P. and Valent B. (2000). *Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. EMBO J. 19: 4004-4014.*

Jones D. A. and Jones J. D. G. (1997). *The roles of leucine-rich repeat proteins in plant defences. Adv. Bot. Res. Inc. Adv. Plant Pathol. 24: 89-167.*

Joosten M. H. A. J., Cozijnsen T. J. and De Wit P. J. G. M. (1994). *Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. Nature. 367: 384-386.*

Joosten M. H. A. J., Verbakel H. M., Nettekoven M. E., Van Leeuwen J., Van der Vossen R. T. M. and De Wit P. J. G. M. (1995). *The phytopathogenic fungus Cladosporium fulvum is not sensitive to the chitinase and β -1,3-glucanase defense proteins of its host tomato*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46: 45-59.

Joosten M. H. A. J., Vogelsang R., Cozijnsen J. T., Verberne C. M. and De Wit P. J. G. M. (1997). *The biotrophic fungus Cladosporium fulvum circumvents Cf-4 mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors*. *The Plant Cell.* 9: 367-379.

Joosten, M. H. A. J. and De Wit, P. J. G. M. (1999). *The tomato-Cladosporium fulvum interaction: A versatile experimental system to study plant-pathogen interactions*. *Annual Review of Phytopathology.* 37: 335-367.

Kemmer D., Liang X., Nester E. W. (1997). *The agrobacterium tumefaciens virulence gene chvE is part of a putative ABC-type sugar transport operon*. *J. Bacteriol.* 179: 2452-2458.

Kirk J. J. and Deacon J. W. (1987). *Control of the take-all fungus Microdochium bolleyi and interaction involving M. bolleyi, Phialophora graminicola and Periconia macrospinoso on cereal roots*. *Plant and soil.* 98: 231-237.

Kjemtrup S., Nimchuk Z. and Dangl J. L. (2000). *Effector proteins of phytopathogen bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition*. *Curr Opin Microbiol.* 3: 73-78.

Kleifeld O. and Chet I. (1992). *Trichoderma – plant interaction and its effect on increased growth response*. *Plant Soil.* 144: 267–272.

Kolaczkowski M., Van der Rest M., Cybularz-Kolaczowska A., Soumillion J. P., Konings W. N. e Goffeau A. (1996). *Drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter pdr5p*. *J. Biol. Chem.* 271: 31543-31548.

Kooman-Gersmann M., Honorée G., Bonnema G. and De Wit P. J. G. M. (1996). *A high-affinity binding site for the AVR9 peptide elicitor of Cladosporium fulvum is present on plasma*

membranes of tomato and other solanaceous plants. Plant Cell. 8: 929-938.

Kooman-Gersmann, M., Vogeslang, R., Hoogendijk, E. C. and De Wit, P. J. G. M. (1997) *Assignment of amino acid residues of the AVR9 peptide of Cladosporium fulvum determine elicitor activity.* Mol. Plant-Microbe Interact. 10: 821-829.

Krebs E. G, Rafter G. W, Jungle J. M. (1953). *Yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.* Yeast protein. II. J Biol Chem 200: 479-492.

Krüger J., Thomas C. L., Golstein C., Dixon M. S., Smoker M., Tang S., Mulder L. and Jones J. D. G. (2002). *A tomato cystein protease required for Cf-2 dependent disease resistance and suppression of autonecrosis.* Science. 296: 744-746.

Kubicek C. P., Mach R. L., Peterbauer C. K. and Lorito M. (2001). *Trichoderma from gene to biocontrol.* Journal of Plant Pathology. 83 (2): 11-23.

Kullinig C., Mach R.L., Lorito M. and Kubicek C. P. (2000). In Applied and Enviromental Microbiology. 5: 2232-2234.

Lamb C. and Dixon R. A. (1997). *The oxidative burst in plant resistance.* Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 48: 251-257.

Lamb D. C., Kelly D. E., Schuncck W., Shyadehi A. Z. Akhtatar M., Lowe D. J. Baldwin B. C. and Kelly S. L. (1997). *The mutation T 315A in Candida albicans sterol 14 α -demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity.* J. Biol. Chem. 272:5682-5688.

Lamb C. J. (1994). *Plant disease resistance genes in signal perception and transduction.* Cell. 76: 419-422.

Laugè R., Joosten M. H. A. J., Van den Ackerviken G. F. J. M., Van den Broek H. W. and De Wit P. J. G. M. (1997). *The in planta-produced extracellular proteins ECP1 and ECP2 of Cladosporium fulvum are virulence factors.* Mol. Plant-Microbe Interact. 10: 725-734.

Laugè R. and De Wit P. J. G. M. (1998). *Fungal avirulence genes: structure and possible functions*. Fungal Genet. and Biol. 24: 285-297.

Laugè R., Goodwin P. H., De Wit P. J. G. M. and Joosten, M. H. A. J. (2000). *Specific H-R associated recognition of secreted proteins from Cladosporium fulvum occurs in both host and non-host plants*. Plant J. 23: 735-745.

Lee K. L. L, Erickson B. K., Klucas R. V. (1995). Plant Physiol, 109(1): 261-267.

Li Z. S., Szczypka M., Lu Y. P., Thiele D. J., Rea P. A. (1996). *The Yeast Cadmium Factor Protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump*. J.Biol.Chem. 271: 6509-6517.

Lindsey D. L. and Baker R. (1967). *Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic condition*. Phytopathology. 57: 1262-1263.

Lo C. T., Liao T. F. and Deng T. C. (2000). *Induction of systemic resistance of cucumber to cucumber green mosaic virus by the root-colonizing Trichoderma spp.* Phytopathology. 90 (Suppl.), S 47.

Longemann J., Schell J., and Willmitzer L. (1987) *Improved method for the isolation of RNA from plant tissues*. Analytical Biochemistry. 163: 16-20.

Loo T. W. and Clarke D. M. (1995). *Covalent modification of human P-glicoprotein mutants containing a single cysteine in either nucleotide binding fold abolishes drug-stimulated ATP-ase activity*. J. Biol. Chem. 270: 22957-22961.

Loper J. E. and Buyer J. S. (1991). *Siderophores in microbial interactions on plant surfaces*. Molecular Plant-Microbe Interaction. 4: 5-13.

Lora J. M., de la Cruz J., Benitez T., Llobell A. and Pintor-Toro J. A. (1994). *Molecular characterization and heterologous expression of an endo β -1,6-glucanase gene from the mycoparasitic fungus Trichoderma harzianum*. Mol. Gen. Genet. 242: 461-466.

Lorito M., Hayes C. K., Peterbauer C., Tronsmo, A., Klemsdal, S., and Harman, G. E. (1993). *Antifungal chitinolytic enzymes from T. harzianum and G. virens . Purification, characterization, biological activity, and molecular cloning.* In R.A.A. Muzzarelli (ed.), Chitin Enzymology European Chitin Society, Lyon and Ancona, 383-392.

Lorito M. et al. (1993). *Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from Trichoderma harzianum and Enterobacter cloacae.* Phytopathology. 83: 721-728.

Lorito M., Hayes C. K., Di Pietro A., Woo, S. L. and Harman G. E. (1994). *Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from Trichoderma harzianum.* Phytopathology. 84: 398-405.

Lorito M., Robert L. M., Sposato P., Strauss J., Peterbauer C. K. And Kubicek P. C. (1996). *Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the ech42 (endochitinase-encoding) gene in Trichoderma harzianum.* Microbiology. Vol. 93: 14868-14872.

Lorito M., Harman G. E., Hayes C. K., Broadway R. M., Tronsmo A., Woo S. L., Di Pietro A. (1996). *Chitinolytic enzymes of Trichoderma harzianum: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase.* Phytopathology. 83: 302-307.

Lorito M. (1998). *Chitinolytic enzymes and their genes.* In *Trichoderma and Gliocladium* G.E. Harman and C.P. Kubicek, eds. 2: 73-99, Taylor & Francis, London.

Lorito M., Woo S. L., Garcia Fernandez I., Colucci G., Harman G. E., Pintor-Toro J. A., Filippone E., Muccifora S., Lawrence, C. B., Zoina, A., Tuzun S, Scala F. (1998). *Genes from mycoparasitic fungi as a novel source for improving plant resistance to fungal pathogens.* Proceeding of the National Academy of Sciences USA. 95: 7860-7865.

Lorito M. et al. (2000). *Pseudomonas lipodepsipeptides (LPDs) and Trichoderma cell wall-degrading enzymes are synergistic in the inhibition of fungal growth.* 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology. Taormina, Italy, 91.

Lorito M., F. Scala., A. Zoina And S. L. Woo. (2001). *Enhancing Biocontrol Of Fungal Pests By Exploiting The Trichoderma Genome*. In *Enhancing Biocontrol Agents And Handling Risks*, M. Vurro And J. Gressel (Eds.), Ios Press, Amsterdam. 22: 248-259.

Lorito M., Scala F., Zoina A., Woo S. L. (2001). *Enhancing biocontrol of fungal pest by Exploiting the Trichoderma genome*. *Enhancing biocontrol agent and handling risks*, 248-258.

Lu Z., Tombolini R., Woo S. L., Zeilinger S., Lorito M. and Jansson J. K. (2004). *In vivo study Trichoderma-pathogen-plant interactions whit constitutive and inducibile GFP reporter system*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3073-3081.

Luderer R., et al. (2002). *The Cladosporium fulvum-tomato interaction: elicitor proteins and their perception*. Submitted for publication.

Luderer R., Takken F. L., De Wit P. J. G. M. and Joosten M. H. A. J. (2002). *Cladosporium fulvum overcomes Cf-2 mediated resistance by producing truncated AVR2 elicitor proteins*. *Mol Microbiol.* 45: 875-884.

Mach R. L., Schindler, M., Kubicek, C.P. (1994). *Transformation of Trichoderma reesei based on hygromycin B resistance using homologous expression signals*. **Current Genetics.** 25: 567-570.

Mach R. I. et al. (1996) *Expression of two major chitinase genes of Trichoderma atroviride is triggered by different regulatory signals*. *Applied Enviromental Microbiology.* 65:1858-1863.

Mach R. L., Peterbauer C. K., Payer K., Jaksist S., Woo S. L., Zeilinger S., Kullnig C. M., Lorito M. and Kubicek C. P. (1999). *Expression of two major chitinase genes of Trichoderma atroviride (T. harzianum P1) is triggered by different regulatory signal*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 1858-1863.

Mandeel Q. and Baker R. (1991). *Mechanism involved in biological control of Fusarium wilt on cucumber whit strains of non pathogenic Fusarium oxysporum*. *Phytopathology.* 81: 462-469.

Marchler G., Shuller C., Adam G., Ruis H. (1993). *A Saccahromyces cerevisiae AUS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress condition*. Embo J. 12: 1997-2003

Martin G. B. (1999). *Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors*. Curr Opin Plant Biol. 2: 273-279.

Martinoia E., Grill E., Tommasini R., Kreuz K., Amrhein N. (1993). *An ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants*. Nature. 364: 247-249.

McClure N. C., Ahmadi A. R., Clare B. G. (1998). *Construction of a range of derivates of the biological control strain Agrobacterium rhizogenus K84: a study of factors involved in biological control of crown gall disease*. Applied and Environmental Microbiology. 64: 3977-3982.

Mendez C. e Salas J. A. (2001). *The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms*. Res. Microbiol. 152: 341-50.

Mighelli Q., González-Candelas L., Dealessi L., Camponogara A., Ramòn-Vidal D. (1998). *Trasformants of Trichoderma longibrachiatum overexpressing the β -1,4-endoglucanase gene egl1 show enhanced biocontrol of Pythium ultimum on cucumber*. Phytopatology. 88: 673-677.

Moretti A., Logrieco A., Bottalico A., Ritieni A., Randazzo G. (1994). *Production of beauvericin by Fusarium proliferatum from maize in Italy*. Mycotoxin Res. 10: 73-78.

Morrissey J.H. (1981) *Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity*. Analytical Biochemistry. 117: 307-310.

Nakaune R., Adachi K., Nawata O., Tomiyama M., Akutsu K. and Hibi T. (1998). *A novel ATP-binding cassette transporter involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus Pennicillium digitatum*. Appl Environ Microbiol. 64: 3983-3988.

Nakaune R., Hamamoto H., Imada J., Akutsu K. And Hibi T. (2002). *A novel ABC transporter gene, PMR5, is involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus Penicillium digitatum.* Mol Genet Genomics 267: 179-185.

NAS. (1987). *Report of the research briefing panel on biocontrol in managed ecosystems.* Washington: National Academy of Sciences.

Oldroyd G. E., Long, S. R. (2003). Plant Physiol. 131: 1027-1032.

Orbach M. J., Farrall L., Sweigard J. A., Chumley F. G. and Valent B. (2000). *A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta.* Plant Cell. 12: 2019-2032.

Peñalver R., Vicedo B., Salced C. I., Lopez M. M. (1994). *Agrobacterium radiobacter strain K84, K 1026 and K84 Agr produce an antibiotic-like substance, active in vitro against A. tumefaciens and phytopathogenic Erwinia and Pseudomonas spp.* Biocontrol Science and Technology 4: 259-267.

Peñalver R. and Lopez M. M. (1999). *Cocolonization of the rhizosphere by pathogenic Agrobacterium strain K84 and K 1026 used for crown gall biocontrol.* Applied and Environmental Microbiology. 65: 1936-1940.

Penttilä M., Nevalainen H., Ratto M., Salminen E. and Knowles J. (1987). *A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus Trichoderma reesei.* Gene 61: 155-164.

Pérez-García A., Snoeijers S. S., Joosten M. H. A. J., Goosen T. and De Wit P. J. G. M. (2001). *Expression of the avirulence gene Avr9 of the fungal tomato pathogen Cladosporium fulvum is regulated by the global nitrogen response factor NRF1.* Mol. Plant-Microbe Interact. 14: 316-325.

Peterbauer C. K., Lorito M., Hayes C. K., Harman G. E., and Kubicek C. P. (1996). *Molecular cloning and expression of the nagI gene (N-acetyl- β -D-glucosaminidase-encoding gene from Trichoderma harzianum P1.* Current Genetics. 30: 325-331.

Piedras P., Rivas S., Dróge S., Hillmer S. and Jone J. D. G. (2000). *Functional, c-myc-tagged-Cf9 resistance gene products are plasma-membrane localized and glycosylated*. Plant J. 21: 529-536.

Pollastro S., Faretra F., Di Canio V. and De Guido A. (1996). *Characterization and genetic analysis of field isolates of Botryotinia fuckeliana (Botrytis cinerea) resistant to dichlofluanid*. Eur. J. Plant Pathol. 102: 607-613.

Pozo M. J. et al. (2002). *Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses of Phytophthora infection in tomato plants*. Journal of Exp. Bot. 53: 525–534

Punt P.J., Oliver R., Dingemans M. A., Pouwels P. H. and van den Hondel C. A. M. J. J. (1987). *Transformation of Aspergillus based on the hygromycin resistance marker from Escherichia coli*. Gene. 56:117-124.

Punt P. J., Dingemans M. A., Jacobs-Meijsing B. J. M., Pouwels P. H., Van den Hondel C. A. M. J. J. (1988) *Isolation and characterization of the gliceraldeide-3-phosphate dehydrogenase gene of Aspergillus nidulans*. Gene 69: 49-57.

Ryals J. A., Neuenschwander U. H., Willis M. G., Molina A., Steiner H. Y. and Hunt M. D. (1996). *Systemic acquired resistance*. The Plant Cell 8: 1809-1819.

Ryan A. D. and Kinkel L. L. (1997). *Inoculum density and population dynamics of suppressive and pathogenic Streptomyces strains and their relationship to biological control of potato scab*. Biological Control. 10: 180-186.

Sahai A. S. and Manocha M. S. (1993). *Chitinases of fungi and plants: their involvment in morphogenesis and host-parasite interaction*. FEMS Microbiol. Rev. 11: 317-338.

Saito A. and Schrempf H. (2004). *Mutational analysis of the binding affinity and transport activity for N-acetylglucosamine of the novel ABC trasporter Ngc in the chitin-degrader Streptomyces olivaceoviridis*. Mol Genet Genomics. 271(5): 545-53.

Salmeron J. M., Oldroyd G. E. D., Rommensen C. M. T., Scofield S. R., Kim H. S., Lavelle D. T., Dahlbeck D and

Staskawicz B. J. (1996). *Tomato Prf is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto kinase gene cluster*. Cell 86: 123-133.

Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Schindler M., Mach R. L., Vollenhofer S. K., Hodits R., Gruber F., Visser J., De Graaff L., Kubicek C.P. (1993). *Characterization of the pyruvate kinase-encoding gene (pki1) of Trichoderma reesei*. Gene. Aug 25; 130(2):271-275.

Schnabel G, Dait Q, Paradkar M. R. (2003). *Cloning and expression analysis of the ATP-binding cassette transporter gene MFABC1 and the alternative oxidase gene MfAOX1 from Monilinia fructicola*. Pest Manag Sci. 59(10): 1143-1151.

Scholtens-Toma I. M. J. and De Wit P. J. G. M. (1988). *Purification and primary structure of a necrosis-inducing peptide from the apoplastic fluid of tomato infected with Cladosporium fulvum*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 33: 59-67.

Schoonbeek H., Del Sorbo G., De Waard M.A. (1998). *The role of ABC transporters in pathogenesis of Botrytis cinerea*. In 12th International Rheinhardbrunn Symposium, 143-149. Friedrichroda: Intercept, UK.

Schoonbeek H., Del Sorbo G. and De Waard M. A. (2001). *The ABC Transporter BcatrB affects the sensitivity of Botrytis cinerea to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil*. MPMI. 14 (4): 562-571.

Schoonbeek H. J., Raaijmakers J. M. e De Waard, M. A. (2002). *Fungal ABC transporter and microbial interactions in natural environments*. Am Phytop. Soc. 15: 1165-1172.

Sheen J., Hwang S., Niwa Y., Kobayashi H. and Galgrath, D. W. (1995). *Green fluorescent protein as a new vital marker in plant cells*. The Plant J. 8: 777-784.

Shen Z. and Jacobs-Lorena M. (1999). *Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates*. J. Mol. Evol. 48: 341 – 347.

Shen S. H., Li Q. S., He S. Y., Barker K. R., Li D. B. and Hunt A. G. (2000). *Conversion of compatible plant-pathogen interactions into incompatible interactions by expression of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 hrmA gene in transgenic tobacco plants.* Plant Journal. 23: 205-213.

Shivanna M. B., Meera M. S., Hyakumachi M. (1996). *Role of root colonization ability of plant growth promoting fungi in the suppression of take-all and common root rot of wheat.* Crop Protection. 15: 497-504.

Sivasithamparam K. and Ghisalberti E. I. (1998). *Secondary metabolism in Trichoderma and Gliocladium.* In: *Trichoderma and Gliocladium.* Harman G. E. and Kubicek C. P.1: 139-191, Taylor & Francis, London.

Song W. Y., Wang G. L., Chen L. L., Kim H. S., Pi L. Y., Holsten T., Gardner J., Wang B., Zhai W .X., Zhu L.H., Fauquet C., Ronald P. (1995). *A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21.* Science. 270: 1804-1806.

Stergiopoulos I., Gielkens M. M. C., Goodall S. D. Venema K. and De Waard M. A. (2002). *Molecular cloning and characterisation of three new ATP-binding cassette transporter genes from the wheat pathogen Mycosphaerella graminicola.* Gene. 289: 1-2, 141-149.

Stracke S., Kistner C., Yoshida S., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Szczyglowski K. and Parniske M. (2002). *A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis.* Nature. 417: 959-962.

Takken F. L. W. and Joosten M. H. A. J. (2000). *Plant resistance genes: their structure, function and evolution.* European Journal of Plant Pathology. 106: 699-713.

Tang X., Frederick R. D., Zhou J., Halterman D. A., Jia Y. and Martin, G. B. (1996). *Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase.* Science. 274: 2060-2063.

Templeton D., Rikkerink E.H.A. and Beever R. E. (1994). *Small, cysteine – rich proteins and recognition in fungal – plant interaction*. *Molecular Plant – Microbe Interaction*. 7: 320-325.

Thomas C. M. Jones D. A., Parniske M., Harison K., Balint-Kurti P. J., Hatzixanthis K. and Jones J. D. G. (1997). *Characterization of the tomato Cf-4 gene for resistance to Cladosporium fulvum identifies sequences that determine recognitional specificity in Cf-4 and Cf-9*. *Plant Cell*. 9: 2209-2224.

Thomas C. M., Dixon M. S., Parniske M., Golstein C. and Jones J. D. G. (1998). *Genetic and molecular analysis of tomato Cf genes for resistance to Cladosporium fulvum*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 353: 1413-1424.

Thrane C. & Jensen D. F. (1997). *Endo-1,3- β -glucanase and cellulase from Trichoderma harzianum: purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic Pythium spp.* *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 331-344.

Tronsmo A. (1989). *Trichoderma harzianum used for biological control of storage rot on carrots*. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*. 3: 157-161.

Tronsmo A. (1991). *Biological and integrated controls of Botrytis cinerea on apple with Trichoderma harzianum*. *Biological Control*. 1: 59-62.

Urban M., Bhargava T. and Hamer J. E. (1999). *An Atp-driver efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease*. *The EMBO Jurnal*. 18: 512-521.

Van 't Slot K. A. E. and Knogge W. (2002). *A dual role of microbial pathogen derived proteins in plant disease and resistance*. *Crit. Rev. Plant Sci.*, in press.

Van den Ackerveken G. F. J. M., Van Kan J.A.L., Joosten M. H. A. J., Muiseres, J.M., Verbakel, H.M. and De Wit, P.J.G.M. (1993a). *Characterization of two putative pathogenicity genes of the fungal tomato pathogen Cladosporium fulvum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6, 210-215.

Van den Ackerveken G. F. J. M., Vossen J. P. M. J. and De Wit P. J. G. M. (1993b). *The AVR9 race-specific elicitor of*

Cladosporium fulvum is processed by endogenous and plant proteases. *Plant Physiol.* 103: 91-96. **Van den Ackerveken G. F. J. M. and De Wit P. J. G. M.** (1994). *The Cladosporium fulvum-tomato interaction: A model system for fungus-plant specificity*. In *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Disease*, K. Kohmoto, R. P. Singh, and U. S. Singh, eds (Oxford, UK: Pergamon Press): 145-160.

Van den Burg H. A., Harrison S. J., Joosten M. H. A. J., Vervoot J. and de Wit P. J. G. M. (2003). *Avirulence factor AVR4 of the tomato pathogen Cladosporium Fulvum is a chitin-binding lectin that protects fungi against plant chitinase*. Submitted for publication.

Van den Hooven H. V., Van den Burg H. A., Vossen P., Boeren S. De Wit P. J. G. M. and Vervoort J. (2001) *Disulfide bond structure of the fungal tomato pathogen Cladosporium fulvum: Evidence for a cystine knot*. *Biochemistry.* 40: 3458-3466.

Van der Biezen E. and Jones J. D. G. (1998). *Plant disease-resistance proteins and the gene for gene concept*. *Trends Biochem. Sci.* 23: 454-456.

Viterbo A., Montero M., Ramot O., Friesem D., Monte E., Llobell A., Chet I. (2002). *Expression regulation of the endochitinase chit36 from Trichoderma asperellum (T. harzianum T-203)*. *Current Genetics.* 42: 114-122.

Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J. and Gay N. J. (1982). *Distantly related sequence in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold*. *EMBO J.* 1. 945-951.

Wang F, Xiao X, Saito A, Schrempf H. (2002). *Streptomyces olivaceoviridis possesses a phosphotransferase system that mediates specific, phosphoenolpyruvate-dependent uptake of N-acetylglucosamine*. *Mol. Genet. Genomics.* 268 (3): 344-51.

Wessels J. G. H. (1994). *Developmental regulation of fungal cell wall formation*. *Annual Reviews of Phytopathology*, 32: 413-437.

Wevelsiep L., Ruppig E. and Knogge W. (1993). *Simulation of barley plasmalemma H⁺-ATPase by phytotoxic*

peptides from the fungal pathogen Rhynchosporium secalis. Plant Physiol. 101: 297-301.

White F. F., Yang B. and Johnson L. B. (2000). *Prospects for understanding avirulence gene function*. Curr Opin Plant Biol. 3: 291-298.

White T. C. (1997). *The presence of an R467K aminoacid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14 α -demethylase in Candida albicans*. Antimicrob. Agent Chemother. 41: 1488-1494.

Whiteford J. R. and Spanu P. (2002). *Hydrophobins and interaction between fungi and plants*. Molecular Plant Pathology. 3: 391-400.

Wilhite S. E., Lumsden R. D., and Straney D. C. (1994) *Mutational analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungus Gliocladium virens in relation to suppression of Pythium damping-off*. Phytopathology. 84: 816-821.

Woo S. L., Donzelli B., Scala F., Mach R., Kubicek C. P., Del Sorbo G. and Lorito M. (1999). *Disruption of ech2 (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in Trichoderma harzianum P1*. Molec. Plant Microbe Interac. 5: 419-429.

Wösten H. A. B. (2001). *Hydrophobin: Multipurpose proteins*. Annual Reviews of Microbiology, 55: 625-646.

Xiao X, Wang F, Saito A, Majka J, Schlosser A, Schrempf H. (2002). *The novel Streptomyces olivaceoviridis ABC transporter Ngc mediates uptake of N-acetylglucosamine and N,N'-diacetylchitobiose*. Mol. Genet. Genomics. 267 (4): 429-39.

Xiao S., Ellwood S., Calis O., Patrick E., Li T., Coleman M. and Turner J. G. (2001). *Broad-spectrum mildew resistance in Arabidopsis thaliana mediated by RPW8*. Science. 291: 118-120.

Yedidia I., Benhamou N., Chet I. (1999). *Induction of defense responses in cucumber plants (Cucumis sativus L.) by the biocontrol agent Trichoderma harzianum*. Applied Environment Microbiology. 65: 1061–1070.

Yedidia I., Benhamou N., Kapulnik Y., Chet I. (2000). *Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite Trichoderma harzianum strain T-203*. Plant Physiology Biochemistry. 38: 863–873

Yedidia I., Srivastva A. K., Kapulnik Y. and Chet I. (2001). *Effect of Trichoderma harzianum on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants*. Plant Soil. 235: 235–242.

Yedidia I., Shores M., Kerem Z., Benhamou N., Kapulnik Y., Chet I. (2003). *Concomitant induction of systemic resistance to Pseudomonas syringae pv. lachrymans in cucumber by Trichoderma asperellum (T-203) and the accumulation of phytoalexins*. Applied Environmental Microbiology. 69: 7343-7353.

Zeilinger S., Galhaup C., Payer K., Woo S. L., Mach R. L., Fekete C., Lorito M. and Kubicek C. P. (1999). *Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of Trichoderma harzianum with its host*. Fung. Genet. Biol. 26: 131-140.

Zeilinger S. (2004). *Gene disruption in Trichoderma atroviride via Agrobacterium-mediated transformation*. Current Genetics. 45:54-60.

Introduzione

Negli ultimi anni i funghi appartenenti al genere *Trichoderma* hanno ricevuto considerevole attenzione come agenti di biocontrollo nei confronti di funghi patogeni di grande rilevanza economica. Le potenziali applicazioni di questi microrganismi in strategie alternative alla lotta chimica per il controllo di svariate fitopatie hanno indotto molteplici studi per la comprensione delle basi molecolari che regolano i processi di biocontrollo (Harman and Kubicek, 1998). Diversi autori hanno evidenziato che l'attività antagonistica e micoparassitica è in molti casi associata alla produzione di antibiotici ed enzimi degradativi la parete cellulare. Molti di questi composti, e i geni che li codificano, sono stati isolati e caratterizzati, consentendo di chiarire alcuni aspetti del complesso processo antagonistico. Tuttavia, la maggior parte degli studi realizzati fino ad ora si sono concentrati sull'interazione microbica *Trichoderma*-agente patogeno tralasciando gli effetti dell'interazione *Trichoderma*-pianta nei meccanismi che contrastano l'insorgenza della malattia. Recenti studi hanno inoltre evidenziato che diversi ceppi di *Trichoderma* sono in grado di stabilire un'interazione simbiotica con la pianta migliorandone la crescita e lo sviluppo. È stato, inoltre, dimostrato che la colonizzazione da parte di *Trichoderma* dei primi strati cellulari dell'epidermide radicale attiva una resistenza sistemica indotta (ISR) che rende l'intera pianta meno suscettibile all'attacco di patogeni ed a stress ambientali (Bigirimana *et al.*, 1997; Yedidia *et al.*, 1999; Yedidia *et al.*, 2000; Howell *et al.*, 2000; Yedidia *et al.*, 2003). Nonostante la sua ovvia importanza, il meccanismo con cui *Trichoderma* interagisce con la pianta stimolando le risposte di difesa è poco studiato e tuttora non sono ancora noti geni e prodotti genici coinvolti in tale interazione.

Alla luce di queste considerazioni questo lavoro di tesi si prefigge l'obiettivo di potenziare le conoscenze relative al meccanismo di controllo biologico messo in atto da funghi antagonisti nei loro processi di interazione con la pianta e con l'agente patogeno, al fine di migliorare il controllo di importanti fitopatie.

In particolare, si è inteso studiare le basi molecolari dei meccanismi di interazione e identificare geni potenzialmente coinvolti in questi processi.

Lo studio dei meccanismi molecolari dell'interazione *Trichoderma* – pianta è stato realizzato utilizzando la coppia *avr4* – *cf4* come sistema modello basato sul riconoscimento specifico gene per gene. Il gene *Avr4* di *C. fulvum* codifica per un elicitore proteico razza-specifico, capace di indurre la risposta di difesa, inclusa la reazione di ipersensibilità, in piante di pomodoro che hanno il corrispondente gene di resistenza *Cf4*. Sono stati, quindi, preparati trasformanti di *Trichoderma* esprimenti il gene di avirulenza *Avr4* sia sotto il controllo del promotore costitutivo *gdp* di *Aspergillus nidulans*, sia sotto il controllo del promotore inducibile *ech42* di *T. atroviride*. Tali mutanti sono stati saggiati al fine di:

- verificare la possibilità di migliorare l'attività antagonista di *T. atroviride* ceppo P1, mediante l'espressione del gene *Avr4*;
- individuare e chiarire i meccanismi molecolari dell'interazione *Trichoderma*–pianta;
- dimostrare la possibilità di veicolare elicitori proteici da *Trichoderma* alla pianta;
- aumentare la resistenza delle piante ai patogeni, attraverso l'alterazione dell'interazione pianta-fungo antagonista e l'induzione di fenomeni di resistenza sistemica (ISR).

Inoltre, si è cercato di individuare in *Trichoderma* omologhi di *Avr4* e *Avr9* di *C. fulvum* (*avr-like*).

Nel presente studio si è anche inteso verificare l'eventuale coinvolgimento nei processi di interazione, di geni codificanti per trasportatori ABC. I trasportatori ABC sono proteine di membrana presenti in tutti gli organismi viventi. Nei funghi, una delle loro principali funzioni è rappresentata dall'efflusso attivo di composti tossici, di origine endogena o esogena, impedendone un accumulo intracitoplasmatico dannoso o mortale per la cellula (Nakaune *et al.*, 2002). I trasportatori ABC possono avere una

larga specificità di substrato per i prodotti tossici e possono rappresentare una prima barriera difensiva per i microrganismi. Nei funghi fitopatogeni i trasportatori ABC giocano un ruolo fondamentale nella resistenza alle sostanze di difesa della pianta e a numerosi fungicidi di sintesi (De Waard *et al.*, 1996; De Waard and Van Nistelrooy, 1979; 1980). Essi, inoltre, sono coinvolti nella secrezione di antibiotici, tossine, ormoni steroidei, etc (Del Sorbo *et al.*, 2000). In *Trichoderma* spp., la funzione dei trasportatori ABC è ancora totalmente sconosciuta. La nostra ipotesi è che tali proteine in *Trichoderma* spp. svolgano un ruolo importante in numerosi processi, dalla secrezione di fattori (micotossine, enzimi idrolitici, ormoni ecc.) necessari per stabilire un'interazione compatibile tra il micoparassita, il fungo ospite e/o la pianta, alla resistenza a sostanze tossiche prodotte dalla microflora o introdotte da attività antropiche (fungicidi e metalli pesanti).

In particolare in questo lavoro sono state clonate 4 parziali sequenze di trasportatori ABC (TABC1, TABC2, TABC3 e TABC4) in *Trichoderma atroviride*, avviando inoltre, per una di esse, la caratterizzazione funzionale.

Materiali e Metodi

Ottenimento dei trasformanti di *Trichoderma* con il gene *Avr4*

Per la trasformazione genetica di *Trichoderma* sono stati utilizzati due metodi, quello della permeabilizzazione dei protoplasti con PEG (Penttilä *et al.*, 1987), co-trasformando con il plasmide PAN7.1 contenente il gene per la resistenza all'igromicina e con il plasmide GA4W6, contenente il gene *Avr-4* sotto il controllo del promotore costitutivo P_{gpd} di *Aspergillus nidulans* e quello della trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* (Zeilinger, 2004) con il plasmide pURA4E, ottenuto dal clonaggio del gene *Avr4* (sotto il controllo del promotore inducibile *ech42* e del terminatore *cbh2*) in pUR5750.

Caratterizzazione Molecolare dei Trasformanti

I trasformanti selezionati sono stati sottoposti ad analisi genetico-molecolare mediante PCR, RT-PCR, Southern e northern blotting.

Le analisi Southern e northern sono state effettuate utilizzando come sonda l'intero gene *Avr4* marcato con la digossigenina secondo i protocolli Roche.

Caratterizzazione Biochimica dei Trasformanti

Sono state preparate estrazioni di proteine totali dal filtrato colturale e dal micelio sia dei trasformanti che del ceppo selvatico P1. I profili proteici sono stati valutati tramite SDS-PAGE.

Caratterizzazione Fisiologica dei Trasformanti

I saggi *in vitro* sono stati condotti su piastre petri contenenti Salt Medium + saccarosio 1% come substrato nutritivo. La crescita dei funghi è stata valutata ogni 24 h mantenendo le piastre a 25 °C.

I saggi *in vivo* sono stati condotti ponendo a germinare in terreno sterile, semi di linee di pomodoro MM-Cf4 (che riconoscono il prodotto del gene di avirulenza *avr4*) e MM-Cf5 (che non riconoscono il prodotto del gene di avirulenza *avr4*), ricoperti da una sospensione di spore dei trasformanti A 3/1, H 3/2, L 1/3 e del ceppo selvatico P1.

Produzione di fitoalessine

L'estrazione delle fitoalessine è stata realizzata utilizzando il protocollo di De Witt et al. (1979). Gli estratti ottenuti sono stati sottoposti ad analisi cromatografiche quali TLC (Thin Layer ed HPLC (High Performance Liquid Chromatography)). Uno dei picchi differenziali, raccolto l'HPLC, stato sottoposto ad analisi MALDI-Tof mass spectrometry.

Microiniezione di Filtrati Colturali in Pianta

Il filtrato colturale ottenuto dalla crescita dei trasformanti è stato infiltrato con microsiringhe nelle foglie delle due linee di pomodoro, 4E1 e 4D2, di piantine di 5 settimane.

Ricerca di geni Avr-like in Trichoderma

L'analisi Southern è stata condotta sul DNA genomico di diversi isolati selvatici di *Trichoderma* utilizzando la sonda Avr4 marcata con digossigenina secondo i protocolli Roche

Sono stati prodotti filtrati colturali di *T. atroviride* P1, *T. harzianum* T22, *T. atroviride* Fyto 822, e *T. viride* ed è stata valutata la presenza di proteine che avessero caratteristiche simili a quelle di AVR4, (dimensione di circa 10 kDa e la capacità di legare la chitina). I profili proteici sono stati valutati tramite SDS-PAGE.

Clonaggio di geni codificanti per trasportatori ABC in Trichoderma

L'isolamento di geni di *T. atroviride* ceppo P1 codificanti per trasportatori ABC, è stato realizzato mediante PCR utilizzando primers degenerati disegnati sulle sequenze conservate di geni codificanti per trasportatori ABC. I prodotti di PCR ottenuti, sono stati purificati per elettroforesi in gel di agarosio, eluiti dallo stesso, clonati in opportuno vettore plasmidico e sequenziati. L'analisi BLASTX delle sequenze ottenute ha permesso di individuare 4 differenti trasportatori ABC denominati TABC1, TABC2, TABC3 e TABC4.

Caratterizzazione Molecolare per *Tabc2*

Sulla parziale sequenza del gene *Tabc2* sono stati disegnati dei primers specifici che amplificano un frammento di 354 pb. Tale frammento, è stato utilizzato come sonda per un'analisi Southern blotting e per isolare l'intero gene da una libreria genomica di *Trichoderma atroviride* ceppo P1 contenuta nel fago lambda EMBL3 SP6/T7

Studi di Espressione

L'espressione dei quattro geni codificanti per trasportatori ABC è stata studiata mediante RT-PCR e analisi northern blotting.

Per le reazioni di RT-PCR sono state disegnate coppie di primers specifici per ciascuno dei quattro geni. Per l'analisi northern blotting è stata utilizzata come sonda la parziale sequenza del gene *Tabc2*.

Risultati

Caratterizzazione molecolare, biochimica e fisiologica dei trasformanti

I trasformanti ottenuti sono stati caratterizzati a livello molecolare per verificare la presenza del gene *avr4* e del suo trascritto mediante PCR, Southern e northern blotting. All'analisi northern i trasformanti A3/1, H3/2, L1/3 hanno mostrato un forte segnale di ibridazione.

Tali trasformanti sono stati sottoposti ad ulteriori analisi biochimiche per verificare la presenza del prodotto del transgene. AVR4 è una proteina di circa 10 kDa che si lega alla chitina e presenta un peptide segnale per la secrezione extracellulare (Van den Burg *et al.*, 2003). Sono state preparate estrazioni di proteine totali dal filtrato colturale e dal micelio sia dei trasformanti che del ceppo selvatico P1. I profili proteici relativi ai filtrati colturali non hanno mostrato bande differenziali tra i trasformanti ed il ceppo selvatico P1, sia nelle frazioni proteiche che non legano la chitina sia in quelle che la legano. Al contrario i profili ottenuti dalle proteine intracellulari mostrano una banda differenziale di circa 10 kDa nei trasformanti A 3/1 ed L 1/3, che non è presente nel ceppo selvatico P1 e nel trasformante H 3/2.

La caratterizzazione fisiologica dei trasformanti selezionati è stata eseguita sia con saggi *in vitro* che *in vivo*.

Saggi di competizione in vitro

L'attività antagonista dei trasformanti è stata valutata mediante saggi di competizione in piastra contro i funghi patogeni *B. cinerea*, *R. solani*, *A. alternata* e *Penicillium* spp.

I risultati ottenuti mostrano una maggiore velocità di crescita dei trasformanti rispetto al ceppo selvatico ed un apprezzabile miglioramento della attività antagonista soprattutto nei confronti di *Alternaria* spp.

Saggi in vivo con diverse linee di pomodoro

Nei saggi *in vivo* è stata valutata la reazione delle linee MM-Cf4 (che riconoscono il prodotto del gene di avirulenza *Avr4*) e MM-Cf5 (che non riconoscono il prodotto del gene di avirulenza *Avr4*) in presenza dei trasformanti A 3/1, H 3/2, L 1/3 e del ceppo selvatico P1. I risultati ottenuti hanno mostrato, per le piantine delle linee MM-Cf5 e MM-Cf4 germinate in presenza del ceppo selvatico P1, un maggiore sviluppo rispetto alle stesse linee germinate in assenza di *Trichoderma*

Le piantine della linea MM-Cf4 cresciute in presenza dei trasformanti hanno presentato invece, una germinazione ritardata ed un rallentamento della crescita, che in alcuni casi si è addirittura bloccata. Le linee germinate in presenza del ceppo selvatico, e le piantine della linea MM-Cf5 cresciute con gli stessi trasformanti hanno mostrato uno sviluppo ed una crescita paragonabile a quella delle piante sviluppatasi in presenza di P1.

Le piantine MM-Cf4 inoculate con i trasformanti e con il ceppo selvatico sono state spiantate, e ne è stato valutato sviluppo e morfologia dell'apparato radicale. Come si può osservare nella figura 1F, l'apparato radicale della piantina MM-Cf4 germinata in presenza di P1 è risultato molto più sviluppato rispetto all'apparato radicale della piantina MM-Cf4 germinata in presenza dei trasformanti.

Le stesse radici sono state quindi osservate al microscopio ottico. Sulle radici di piante germinate in presenza dei trasformanti nei punti di fuoriuscita delle radichette secondarie sono state osservate piccole necrosi e zone di suberificazione,

ed una emissione “a ciuffetti” delle radici secondarie (fig.1A, B, C). Nelle piante germinate con il ceppo selvatico P1 ed in quelle controllo senza *Trichoderma* (fig. 1 D, E) non sono state osservate ne lesioni ne uno sviluppo anomalo dell'apparato radicale.

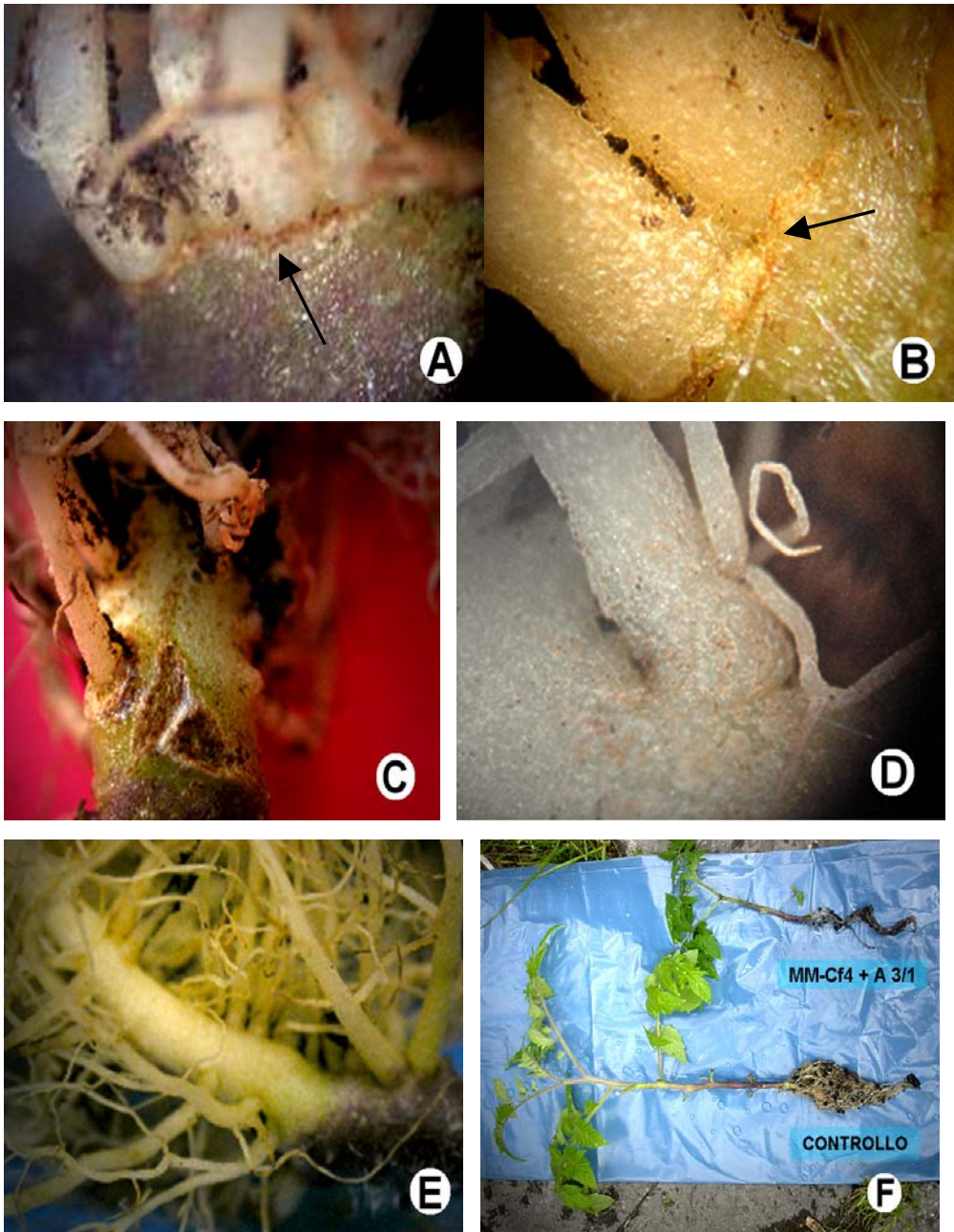


Figura 1. Apparati radicali di piante MM-Cf4 germinate in presenza del trasformatante A 3/1 e del ceppo selvatico P1. **(A) (B) (C)** Radici secondarie di piante MM-Cf4 germinate con il trasformatante A 3/1 (MM-Cf4+A3/1). Le frecce indicano zone necrotiche nel punto di fuoriuscita delle radici secondarie; **(D)** Ingrandimento di radici secondarie di piante MM-Cf4 germinate con il ceppo selvatico P1 (MM-Cf4+P1) che appaiono prive di evidenti necrosi; **(E)** Apparato radicale di piante controllo (MM-Cf4 senza *Trichoderma*), che non mostra evidenza di lesioni o zone necrotiche; **(F)** Confronto tra piante MM-Cf4 germinate in presenza di P1 (MM-Cf4 + P1) o in presenza del trasformatante A 3/1 (MM-Cf4 + A3/1).

Microiniezione di filtrati colturali in pianta

Aliquote dei filtrati colturali dei trasformanti A 3/1, H 3/2, L1/3 e del ceppo selvatico P1, sono state microinfiltrate in foglie di piante di pomodoro della linea 4D2 (contenente il gene *Cf-4*) e della linea 4E1 (senza il gene *Cf-4*) allo scopo di evidenziare una eventuale reazione di ipersensibilità (HR) associata alla presenza del prodotto del gene *avr4* nel filtrato culturale. Tutte le infiltrazioni hanno prodotto necrosi su entrambe le linee di pomodoro e ciò non ha permesso di apprezzare differenze tra i trasformanti e il ceppo selvatico P1.

Induzione di fitoalessine

I trasformanti A 3/1, H 3/2, L1/3 sono stati valutati anche per la loro capacità di indurre risposte di difesa sistemiche nella linea di pomodoro MM-Cf4. Da studi di De Wit e colleghi, (1979) risulta che nelle combinazioni incompatibili tra *C. fulvum* e pomodoro si ha una forte produzione della fitoalessina riscitina. E' stata quindi effettuata un'estrazione di fitoalessine riscitina-simili da foglie di pomodoro delle linea MM-Cf4 cresciuta in presenza dei trasformanti, del ceppo selvatico P1 e in assenza di *Trichoderma*. Gli estratti acetonicici sono stati analizzati mediante cromatografia su strato sottile (TLC) ed HPLC. Tali analisi hanno prodotto cromatogrammi differenti per gli estratti provenienti da piante MM-Cf4 cresciute con il trasformante A 3/1 rispetto a quelli ottenuti in presenza di P1. All'analisi HPLC uno dei picchi differenziali è stato raccolto ed analizzato con MALDI-TOF. La massa ottenuta per questa possibile nuova fitoalessina, la cui produzione è indotta dalla presenza della proteina AVR4 espressa dai trasformanti di *Trichoderma*, è di 656.9.

Ricerca di geni Avr-like in Trichoderma

I risultati di un'analisi Southern, effettuata sul DNA genomico di diversi isolati selvatici di *Trichoderma*, hanno evidenziato la presenza di bande di ibridazione più o meno intense con la sonda *Avr4*. Sono stati, quindi, prodotti filtrati colturali di *T.*

atroviride P1, *T. harzianum* T22, *T. atroviride* Fyto 822, e *T. viride* ed è stata valutata la presenza di proteine che avessero caratteristiche simili a quelle di AVR4. Solo nel filtrato colturale di T22 è stata ritrovata una proteina di circa 10 kDa con la capacità di legare la chitina.

La banda corrispondente alla proteina di interesse è stata eluita dal gel di poliacrilammide e sequenziata.

L'analisi della sequenza amminoacidica in database ha rivelato un'alta omologia con proteine appartenenti alla famiglia delle idrofobie.

Il gene relativo all'idrofobina è stato clonato e sequenziato. I risultati di una analisi tblastx, hanno suggerito che la sequenza in esame è relativa ad una nuova idrofobina, vista la mancanza di un'elevata identità con le sequenze di tali proteine presenti in database. Essa è comunque risultata omologa per l'80% all'idrofobina HFBII di *T. reesei*. È stata trovata, inoltre, un'omologia del 60% con, un'altra idrofobina di *T. reesei*, la HFBI, un'omologia del 52% con l'idrofobina QUID3 di *T. atroviride*.

Il gene codificante per la nuova idrofobina di *T. atroviride* è stato nominato *Hytra1*. La regione codificante, senza il peptide segnale, è costituita da 213 bp che codificano per una proteina di 71 amminoacidi. Nella sequenza di terminazione sono state individuate le sequenze consenso Nit2, ADR1, e STRE, consenso in geni attivati in risposta a stress (<http://motif.genome.ad.jp>).

La sequenza amminoacidica di HYTRA1 presenta la sequenza tipica delle idrofobie $X_n-C-X_{5-10}-C-C-X_{11-44}-C-X_{8-23}-C-X_{5-9}-C-C-X_{6-18}-C-X_m$, presentando infatti gli 8 residui di cisteina nelle posizioni conservate, tale da consentire la formazione di 4 ponti disolfuro.

Isolamento dei frammenti genici codificanti per nuovi trasportatori ABC in *Trichoderma* spp.

L'uso di nucleotidi degenerati, disegnati sulle sequenze conservate di trasportatori ABC fungini (Dudler *et al.*, 1998), ha reso possibile l'isolamento di geni appartenenti a tale famiglia con le tecniche della PCR. Utilizzando tale strategia sono stati clonati quattro frammenti genici di *Trichoderma atroviride* denominati rispettivamente, *Tabc1*, *Tabc2*, *Tabc3*, *Tabc4* (**T**richoderma **A**TP-**b**inding-**c**assette)

Studio delle omologie di sequenza dei frammenti genici *Tabc1-2-3-4*

L'analisi BlastX delle sequenze dedotte dei quattro frammenti, di dimensioni comprese tra le 400 e le 600 bp, ha rivelato che tutti e quattro i prodotti di amplificazione sono altamente omologhi a geni codificanti per trasportatori ABC. In particolare l'analisi BLASTX delle sequenze ottenute rivela per:

- **TABC1** una identità del 94% ed una similitudine del 97 % con il gene ABC1 di *Magnaporthe grisea*, un trasportatore ABC fattore di patogenicità nella patologia causata al riso, e l'89 % di identità ed il 94 % di similitudine con il gene Gpabc1 di *Giberella pulicaris* un trasportatore ABC che conferisce alla *Giberella* la tolleranza alle fitoalessine riscitina e lubimina e la virulenza su tuberi di patata.
- **TABC2** ha l' 89% di identità e il 91% di similitudine con il gene *AtrbB* di *Aspergillus nidulans*, e l'84% di identità e una similitudine dell'89% con il gene *PMR5* di *Penicillium digitatum*. Entrambi i trasportatori svolgono un ruolo fondamentale nella MDR, conferendo resistenza a molti fungicidi e composti tossici naturali.
- **TABC3** ha l'89% di identità e il 94% di similitudine con il trasportatore BMR1 di *Botrytis cinerea* non ancora caratterizzato, e l'89% d' identità e il 97% di similitudine con *Atr4* di *Mycosphaerella graminicola*. Quest'ultimo è coinvolto nella resistenza a diversi fungicidi sintetici (imazalil, ciproconazolo), di sostanze di difesa della pianta (eugenolo e pisatina), e degli antibiotici cicloesimmide e neomicina (Stergiopoulos *et al.*, 2002).

- **TABC4** presenta l'85% di omologia e l'83% di similitudine con il gene *Pmr5* di *P. digitatum* e il 78% d'identità e l'83% di omologia con il gene *AtrB* di *Monilia fructicola*. Entrambi i geni codificano per trasportatori ABC implicati nella polichemioresistenza a diversi fungicidi.

Caratterizzazione Genetico-Molecolare di *Tabc2*

Southern blotting

L'analisi Southern del DNA genomico del ceppo selvatico P1, ha messo in evidenza che il gene *Tabc2* è presente nel genoma di *T. atroviride P1* in un'unica copia.

Screening di una libreria genomica

L'analisi della libreria genomica di *T. atroviride* ceppo P1 ha permesso di isolare diversi cloni che mostravano un forte segnale di ibridazione con la sonda *Tabc2*. Il sequenziamento del DNA estratto da uno dei cloni ha permesso ottenere l'intera sequenza del gene *Tabc2*.

Analisi della sequenza nucleotidica e amminoacidica di *Tabc2*

La sequenza completa del gene è di 6535 bp, di cui 1624 appartengono alla regione del promotore e 642 bp a quella del terminatore. La regione codificante è di 4264 bp e contiene 2 introni.

Attraverso il programma ClustelW (WWW.EBI.AC.UK), sono stati identificati i siti di inizio e fine trascrizione. Con il programma Motif genome (<http://motif.genome.jp>) sono state individuate, nella regione promotrice, sequenze consenso per fattori di trascrizione, note anche in relazione a quelle del gene *ech42* codificante per la endochitinasi CHIT42 di *Trichoderma atroviride*.

In particolare sono state individuate sequenze consenso per motivi HSF (Heat Shock Factor), NIT-2, adr1p, StuAp, Cre1 ed elementi STREE.

La sequenza amminoacidica di *Tabc2* è costituita da 1418 residui e possiede tutte le caratteristiche tipiche dei trasportatori ABC. L'analisi dei profili

trasmembrana ottenuta mediante il programma TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) indica che la proteina risulta costituita da 12 domini transmembranalmente in accordo con la comune architettura mostrata dalle proteine appartenenti alla famiglia di trasportatori ABC.

L'allineamento ClustalW fra la sequenza amminoacidica di *Tabc2* e quella di altri trasportatori ABC identificati in diversi funghi filamentosi ha rivelato che le sequenze tipiche della cassetta per il legame e l'idrolisi dell'ATP, contenente i caratteristici motivi Walker A, Walker B (Walker *et al.*, 1982) e la sequenza identificativa o "ABC signature" (Higgins, 1992), sono completamente conservate.

Studi di espressione dei geni T-abc

Effetti del trattamento con fungicidi sull'espressione dei geni *Tabc*

Sono stati condotti, mediante la tecnica RT-PCR, studi di espressione *in vitro* in risposta ad alcuni principi attivi (dicloran, benomyl, procloraz) di formulazioni di fungicidi comunemente impiegati in agricoltura.

Nelle condizioni sperimentali da noi utilizzate, il Procloraz ha causato un aumento sensibile del livello di trascritto per *Tabc1* e *Tabc3*, mentre sembra esercitare un effetto leggermente repressivo per la trascrizione di *Tabc2*. Dicloran e benomyl hanno stimolato la trascrizione dei tre geni di *Trichoderma*, avendo essi prodotto un livello di trascritto più elevato rispetto alla condizione di non induzione.

Effetti del trattamento con micelio di funghi patogeni e loro metaboliti secondari sull'espressione del gene *Tabc2*

Per valutare se il gene *Tabc2* possa essere coinvolto nella detossificazione di metaboliti secondari prodotti da funghi patogeni, abbiamo verificato l'effetto sull'espressione del gene in seguito al trattamento con beauvaricina. Quest'ultima è una micotossina prodotta da alcune specie del genere *Fusarium*, in particolare *F. proliferatum* (Moretti A., *et al* 1994), che infettano diversi cereali.

L'analisi northern, ha indicato che la trascrizione del gene *Tabc2* è fortemente influenzata dalla bovaricina e che il livello di trascritto aumenta all'aumentare del tempo di esposizione alla micotossina.

Ulteriori indagini sono state realizzate al fine di evidenziare un eventuale coinvolgimento del gene *Tabc2* nel meccanismo di micoparassitismo. In particolare si è valutato, mediante la tecnica RT-PCR e northern blotting, il livello di espressione del gene quando *Trichoderma* viene allevato in presenza di biomassa di funghi patogeni o in presenza dei loro metaboliti rilasciati nei filtrati colturali. I risultati mostrano che la trascrizione del gene è attivata quando *Trichoderma* cresce nel filtrato colturale (F.C.) di *B. cinerea*, *R. solani*, e *P. ultimum*. Gli stessi risultati sono stati ottenuti quando il fungo antagonista cresce in presenza di micelio di *B. cinerea* e *R. solani*.

Inoltre, analisi northern (Fig 2) fatte su mRNA di *Tabc2* ottenuto allevando *Trichoderma* in presenza di concentrazioni crescenti di N-acetil-D-glucosamina, glucosio e fruttosio, quali principali prodotti della degradazione enzimatica delle pareti cellulari dei funghi fitopatogeni, dimostrano che la trascrizione del gene è fortemente influenzata dalla presenza di queste sostanze nel substrato di crescita. In particolare il livello di trascritto aumenta all'aumentare della concentrazione di queste sostanze inducenti.

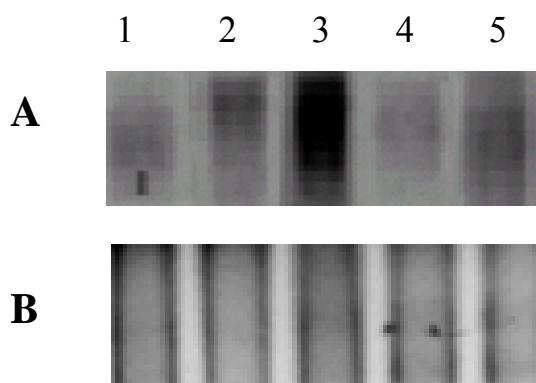


Figura 2. Analisi northern blotting sul gene *Tabc2*. Gli mRNA sono stati ottenuti allevando *Trichoderma* nelle condizioni (A): 1= Sacc 1% ; 2= glucosio 1% ; 3= glucosio al 4% ; 4= fruttosio 0,5% ; 5 = fruttosio 1%. (B): Controllo quantizzazione degli RNA su gel elettroforetico colorato con bromuro di etidio.

DISCUSSIONE

I risultati delle analisi Southern e northern effettuati sui trasformanti con il gene *Avr4* sotto il controllo del promotore costitutivo *gdp* hanno consentito di identificare tre isolati (A3/1, L1/3, H3/2) che presentavano una forte espressione del gene eterologo. Nella frazione proteica intracellulare di due trasformanti è stata individuata una banda di 10 kDa corrispondente alla dimensione della proteina AVR4. Questi risultati indicano che il tradotto presente nei due trasformanti non viene secreto nel mezzo di crescita *in vitro* nonostante la proteina AVR4 presenti un peptide segnale per la secrezione extracellulare. Sorprendentemente anche per i trasformanti di *C. fulvum* con il gene *Avr4* sotto il controllo del promotore costitutivo *gdp* la proteina AVR4 non viene secreta nel mezzo di crescita *in vitro* ma resta intracellulare (Van del Burg *et al.*, 2003). Inoltre è stato dimostrato che il gene di avirulenza *Avr4* in *C. fulvum* è altamente espresso durante la colonizzazione delle foglie di pomodoro mentre il livello di espressione del gene è appena rilevabile quando il fungo viene allevato *in vitro* (Joosten *et al.*, 1994; Van den Ackerveken and De Wit, 1994). Ciò potrebbe essere spiegato considerando che recenti studi rivolti alla determinazione delle funzioni intrinseche di questi elicitori riferiscono per la proteina AVR4 un'attività "chitin-binding" (Shen *et al.*, 1999). Sembra di fatto che in *C. fulvum* AVR4 si leghi alla chitina presente nella parete cellulare, proteggendola dalle chitinasi prodotte dalla pianta (Van del Burg *et al.*, 2003). Tuttavia, durante la crescita *in vitro* la chitina presente nella parete cellulare del fungo è inaccessibile all'azione idrolitica degli enzimi secreti dalla pianta (Joosten *et al.*, 1995), per cui la proteina AVR4 non viene prodotta.

Van den Burg e colleghi, (2003) hanno inoltre dimostrato che *in vitro* la proteina AVR4 è in grado di legare la chitina presente nelle parete cellulare sia di *T. viride* che *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* proteggendo tali funghi dall'azione degradativa degli enzimi chitinolitici prodotti dalla pianta. In accordo con tale risultato, in questo lavoro di tesi i trasformanti ottenuti hanno mostrato capacità antagonistiche

migliorate. I saggi di competizione *in vitro* hanno dimostrato che nei confronti di *A. alternata* i trasformanti hanno una maggiore capacità antagonistica rispetto al ceppo selvatico P1, riuscendo a colonizzare completamente il patogeno.

Gli effetti della presenza del gene di avirulenza *Avr4* in *Trichoderma* sono stati valutati anche con saggi *in vivo* su linee di pomodoro in grado di riconoscere o meno il prodotto del gene *Avr4*. I risultati di questo studio dimostrano, innanzitutto, la capacità di *T. atroviride* ceppo P1 di promuovere fortemente la crescita di piante di pomodoro indicando perciò una benefica interazione tra *Trichoderma* e le linee di pomodoro saggiate. Inoltre, quando le linee di pomodoro MM-Cf4, che riconoscono il prodotto del gene *avr4*, vengono trattate con le spore dei trasformanti, presentano una germinazione e uno sviluppo ritardato, una crescita stentata ed un'evidente riduzione dell'apparato radicale rispetto alle stesse cresciute in presenza del ceppo selvatico P1. Inoltre, sulle radici è stata riscontrata la presenza di piccole necrosi e suberificazioni simili a tipiche reazioni di ipersensibilità (HR) associate all'interazione incompatibile tra pianta e fungo fitopatogeno. Questo indica che il sistema di riconoscimento molecolare *Avr4* - *Cf4* ha funzionato anche nell'interazione *Trichoderma* - pomodoro. È possibile quindi che l'espressione costitutiva del gene *Avr4* in *Trichoderma* abbia causato, in seguito al riconoscimento di AVR4 nelle piante MM-Cf4, una iper-attivazione delle risposte di difesa normalmente associate anche alla colonizzazione delle radici da parte di *Trichoderma*, alterando così la benefica associazione tra il *Trichoderma* e la pianta. Da quanto esposto sembra evidente che esiste un sistema di riconoscimento ed interazione che si basa sul trasferimento di composti bioattivi dal *Trichoderma* alla pianta.

Attualmente l'attivazione della resistenza sistemica indotta (ISR) sembra legata alla combinazione pianta-ceppo di *Trichoderma*. Inoltre in un recente studio di Harman e collaboratori (2004a) è stato dimostrato che solo specifiche linee di mais ricevono gli effetti benefici della colonizzazione di *Trichoderma*, come la promozione della crescita e l'induzione di resistenza sistemica. Sembra quindi che

solo alcune specie e ceppi di *Trichoderma* sono capaci d'instaurare un'associazione di tipo simbiotica con la pianta (Harman *et al.*, 2004b).

I risultati ottenuti dai saggi *in vivo* assumono, quindi, una notevole importanza in relazione alla possibilità di usare *Trichoderma*, ed altri funghi antagonisti, per veicolare elicitori proteici in pianta allo scopo ad esempio di attivare l'ISR. I cromatogrammi, ottenuti dall'analisi con l'HPLC e la TLC degli estratti acetonicici di foglie di piante MM-Cf4 cresciute in presenza dei trasformanti e in presenza di P1, mostrano l'induzione della sintesi di diverse fitoalessine e costituiscono una ulteriore conferma di una reazione nelle piante MM-Cf4 alla produzione di AVR4. È pertanto possibile indurre diverse risposte di difesa in pianta attraverso l'espressione eterologa di elicitori proteici al fine di aumentare il numero di patogeni controllati direttamente ed indirettamente da *Trichoderma*. Questo quindi apre la possibilità di selezionare ceppi di *Trichoderma* in grado di trasferire molecole utili alla pianta sotto il controllo di promotori costitutivi o inducibili dall'interazione con il patogeno (Mach *et al.*, 1999; Zeilinger *et al.*, 1999) o con la pianta (Lu *et al.*, 2004).

I risultati ottenuti durante questo lavoro di tesi hanno avviato la ricerca di geni di avirulenza in *Trichoderma*.

Il primo indizio di una presenza di geni *avr-like* in *Trichoderma* è stato ottenuto dall'analisi Southern effettuata per la caratterizzazione genetico-molecolare dei trasformanti. In questo esperimento, infatti, si sono ottenute bande di ibridazione con la sonda *Avr4* nel DNA del ceppo selvatico P1. L'analisi Southern è stata quindi estesa a diversi isolati selvatici di *T. atroviride* ceppo P1, ottenendo chiari segnali d'ibridazione in tutti gli isolati analizzati. A conferma di ciò, anche Harman e colleghi, hanno successivamente individuato nel proteoma del ceppo T22 di *T. harzianum* una proteina simile ad AVR9 (dati non pubblicati). Questi risultati suggeriscono, quindi, la presenza di omologhi di *avr4* e *avr9* in diverse specie di *Trichoderma*. Inoltre le microinfiltrazioni dei filtrati culturali dei trasformanti, o del ceppo selvatico P1, in piante che riconoscono o meno il prodotto del gene *avr4*, hanno sempre prodotto una reazione di ipersensibilità dovuta probabilmente alla

presenza, anche nel ceppo selvatico, di elicitori proteici attivi nelle linee di pomodoro saggiate. Sulla base di queste osservazioni si è avviata la ricerca di proteine di *Trichoderma* con caratteristiche simili a quelle di AVR4 (dimensioni di circa 10 kDa e capacità di legare la chitina) in diversi isolati di *T. atroviride* (P1 e Fyto 822), *T. harzianum* (T22) e *T. viride*. Nel filtrato colturale del ceppo T22 di *T. harzianum* è stata trovata una proteina secreta di circa 10 kDa che si lega alla chitina e che ha mostrato un'elevata omologia di sequenza con idrofobine di altri funghi. È stata clonata l'intera sequenza codificante del gene, che è stato denominato *Hytra1*, e parte del terminatore. L'analisi in database (TblastX) ha mostrato un'omologia particolarmente alta (80%) con un'idrofobina di *T. reesei*.

Le idrofobine sono proteine specifiche dei funghi filamentosi. Una loro funzione è quella di conferire idrofobicità alla superficie dell'ifa del fungo a contatto con l'aria, e di mediare l'adesione del fungo sulla superficie idrofobica dell'ospite. Inoltre potrebbero essere coinvolte nel riconoscimento fungo-pianta (Templeton *et al.*, 1994). Le idrofobine, infatti, sono proteine ricche di cisteina al pari di molti prodotti dei geni di avirulenza di funghi fitopatogeni, ed essendo localizzate sulla parete cellulare del fungo, potrebbero mediare la percezione del patogeno da parte della pianta. L'idrofobina *Hytra1* potrebbe quindi agire come il prodotto di un gene di avirulenza, e indurre le risposte di difesa associate all'interazione *Trichoderma*-pianta, come osservato per vari isolati di questi funghi (Harman *et al.*, 2004b). Ulteriori studi, come la distruzione genica mirata e la superespressione del gene *Hytra1* potranno chiarire il coinvolgimento di questa ed altre idrofobine nell'interazione tra funghi antagonisti e piante.

La ricerca di geni di avirulenza in *Trichoderma* può essere importante per lo sviluppo di nuove strategie biotecnologiche applicate alla difesa delle piante. L'utilizzo, infatti, di geni di avirulenza di funghi benefici/antagonisti come *Trichoderma* che sono simbionti opportunisti ed avirulenti su una grande varietà di piante coltivate, potrebbe consentire di superare la limitata applicabilità dei geni di avirulenza derivati da patogeni (in generale dovuta alla loro specificità) attraverso

strategie transgeniche che permettano di sfruttare l'ampio spettro d'azione di questi nuovi geni *avr*. Infatti la trasformazione di piante con geni di avirulenza derivati da questo fungo, sotto il controllo di opportuni promotori inducibili, consentirebbe di attivare meccanismi di difesa in presenza di un'infezione da parte di un patogeno in tutte quelle specie di piante capaci di attivare uno stato di ISR a contatto con *Trichoderma*.

Questi geni di avirulenza possono anche essere utilizzati per la trasformazione di ceppi agenti di biocontrollo di *Trichoderma*, incluso quelli già applicati in agricoltura come biofitofarmaci, che non inducono resistenza sistemica, aumentando quindi la loro efficacia e spettro d'azione.

Il presente lavoro di ricerca riporta, inoltre, i risultati ottenuti dall'identificazione e dalla caratterizzazione dei primi 4 geni codificanti per trasportatori ABC in *Trichoderma atroviride* P1. I quattro frammenti genici sono stati clonati, tramite PCR, utilizzando primers degenerati e disegnati su sequenze di trasportatori ABC già caratterizzati in funghi filamentosi. I frammenti ottenuti sono stati denominati *Tabc1*, *Tabc2*, *Tabc3* e *Tabc4* (**T**richoderma **A**TP-**b**inding-**c**assette). L'analisi BlastX, delle quattro sequenze, ha rivelato, che tali frammenti sono parte di geni codificanti per trasportatori ABC, che presentano, in particolare un elevato grado di omologia con trasportatori ABC di altri funghi fitopatogeni. La maggior parte di tali omologhi sono stati caratterizzati come importanti determinanti molecolari della polichemioresistenza a numerosi fungicidi e sostanze di difesa delle piante. Questo suggerisce la possibilità che anche in *Trichoderma* i trasportatori identificati in questo lavoro possano svolgere un ruolo simile, proteggendo il fungo da composti tossici esogeni, provenienti da attività antropiche o prodotti durante le complesse interazioni che il fungo stabilisce con la pianta, l'agente patogeno e il resto della microflora.

L'eventuale coinvolgimento dei geni in esame nei meccanismi che conferiscono resistenza a sostanze tossiche di origine antropica è stata analizzata valutando il livello di espressione dei suddetti geni quando *Trichoderma* viene allevato in mezzo liquido in presenza di diversi fungicidi.

I dati in nostro possesso indicano che i geni *Tabc1*, *Tabc2* e *Tabc3* sono espressi costitutivamente a bassi livelli. Il livello di trascritto dei tre geni aumenta notevolmente in seguito al trattamento del micelio con i fungicidi dicloran e benomyl. Quest'ultimo appartiene al gruppo dei fungicidi benzimidazolici, e in accordo a quanto si verifica per i geni clonati in questo lavoro, tali fungicidi, inducono la trascrizione dei geni *Pmr1* e *Pmr5*, codificanti per due trasportatori ABC, in *Penicillium digitatum* (Nakaune *et al.*, 2002). Inoltre, mutanti difettivi per questi geni presentano una incrementata sensibilità nei confronti di fungicidi DMI (**DeM**ethylation **I**nhibitors o inibitori della demetilazione degli steroli) e di svariati altri composti, inclusa la fitoalessina resveratrolo e l'alcaloide camptotecina. È possibile che molte di queste sostanze possano essere potenziali substrati per i geni *Tabc* di *Trichoderma* e in particolare per *Tabc2*. Infatti, l'analisi BlastX ha evidenziato per quest'ultimo un elevato grado di omologia con il gene *Pmr5* di *P. digitatum* e con il gene *AtrbB* di *Aspergillus nidulans*. La trascrizione di *atrB* nel micelio di *A. nidulans* viene fortemente indotta dal trattamento con diverse sostanze tossiche, incluso antibiotici (cicloesimmide), fungicidi inibitori della sintesi dell'ergosterolo (fenarimol, imazalil) e sostanze di difesa delle piante (pisatina, resveratrolo).

Le analogie tra la sequenza nucleotidica di *Tabc2* ed i suoi omologhi più stretti suggeriscono che tale gene in *Trichoderma* possa essere un importante fattore MDR (**M**ulti**D**rug **R**esistence).

L'analisi di una libreria genomica di *T. atroviride* P1 ha permesso di clonare l'intera sequenza del gene *Tabc2*. L'analisi della regione promotrice ha consentito d'individuare diverse sequenze consenso per fattori di trascrizione, note anche in relazione a quelle del gene *ech42* codificante per la endochitinasi CHIT42 di *T. atroviride*, un importante enzima chitinolitico attivato durante i processi micoparassitici.

Per le analogie riscontrate, è possibile che *Tabc2* sia co-regolato con *Ech42* durante il micoparassitismo e che, sempre analogamente ad *Ech42*, esso svolga un

importante ruolo in tale processo (Woo *et al.*, 1999). D'altro canto, i risultati ottenuti con la beauvaricina sostengono questa ipotesi, suggerendo un coinvolgimento del gene nei meccanismi che conferiscono resistenza alle sostanze tossiche rilasciate dai patogeni durante i processi di antagonismo. Tuttavia, una prima chiara indicazione del probabile coinvolgimento del gene *Tabc2* nel micoparassitismo emerge dai risultati delle analisi northern ed RT-PCR che hanno evidenziato un'induzione della trascrizione del gene *Tabc2* in presenza della biomassa o dei filtrati colturali di funghi fitopatogeni. Successive indagini hanno evidenziato che il gene è indotto dalla presenza nel mezzo di crescita di concentrazioni crescenti di N-acetilglucosamina, glucosio e fruttosio. Alla luce di questi dati è possibile prevedere che *Tabc2* sia coinvolto nel trasporto all'interno della cellula dei prodotti di degradazione della parete cellulare dei funghi micoparassitizzati. È noto infatti che durante il micoparassitismo *Trichoderma* secreta una vasta gamma di enzimi litici in grado di degradare chitina e β -glucani presenti nella parete cellulare del fungo ospite, liberando, tra i prodotti finali, anche monomeri di N-acetilglucosamina e glucosio (De la Cruz *et al.*, 1992; Di Pietro *et al.*, 1993, Lorito *et al.*, 1993, 1994). La nostra ipotesi è avvalorata da recenti scoperte che riferiscono di altri trasportatori implicati nel trasporto di N-acetilglucosamina e di diversi zuccheri all'interno della cellula. Ad esempio, in *Streptomyces olivaceoviridis*, l'assorbimento all'interno della cellula dell'N-acetilglucosamina e chitobiosio è mediato non solo da un sistema PTS (**P**hosphoenol **T**ransferase **S**ystem) ma anche dall'attività del trasportatore ABC Ngc codificato dall'operone *ncgEFG* (Xiano X. *et al.*, 2002; Wang F. *et al.*, 2002; Saito A. e Schrempf H., 2004). Inoltre, in *Agrobacterium tumefaciens*, Kemmer *et al.* (1997) hanno evidenziato che il gene codificante per la proteina CHVE, coinvolta nei processi di trasporto di vari zuccheri, presenta un elevato livello di omologia con proteine appartenenti alla famiglia di trasportatori ABC. Ulteriori studi, sia funzionali che strutturali, rivolti all'identificazione nella struttura proteica, di domini noti per la capacità di legare l'N-acetilglucosamina, potranno chiarire il coinvolgimento del gene *Tabc2* nel micoparassitismo come fattore nutrizionale.

I risultati ottenuti in questo lavoro dimostrano che i trasportatori ABC identificati sono coinvolti in importanti processi e, quindi, forniscono un importante contributo per una maggiore comprensione dei meccanismi molecolari che regolano la capacità del fungo antagonista di resistere alle svariate sostanze tossiche.

Le possibili funzioni fisiologiche svolte dai trasportatori ABC identificati in *Trichoderma* potrebbero permettere di sviluppare nuove strategie per il controllo biologico. Una overespressione di geni codificanti per trasportatori ABC potrebbe potenziare le capacità antagonistiche di *Trichoderma* spp. o migliorare la sua attività di biocontrollo laddove è richiesta una maggiore tolleranza ai fungicidi chimici. Inoltre, tali trasportatori potrebbero essere utili in strategie transgeniche per l'ottenimento di piante resistenti alle tossine prodotte dai funghi fitopatogeni.