

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"**

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

**FACOLTÀ DI AGRARIA  
SETTORE PATOLOGIA VEGETALE**

**STUDIO DEI MECCANISMI DI TRASDUZIONE DEL  
SEGNALE DEL FUNGO ANTAGONISTA  
*Trichoderma atroviride***

**Tutore:  
Ch.mo Prof. Matteo Lorito**

**Dottorando:  
Valeria Scala**

**Co - Tutore  
Ch.mo Prof. Felice Scala**

**Coordinatore  
Ch.mo Prof. Antonio Violante**

**Anno Accademico 2004-2005**

## **Indice**

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1	Lotta alle malattie delle piante	1
1.2	Antagonismo tra microrganismi	5
1.3	<i>Trichoderma</i> come agente di biocontrollo	9
1.4	<i>T. atroviride</i> : meccanismi di biocontrollo	11
1.5	Applicazioni di <i>Trichoderma</i>	13
1.6	Enzimi idrolitici di <i>Trichoderma</i> coinvolti nel controllo biologico	14
1.7	Trasduzione del segnale	18
1.8	Proteine G, MAPK e cAMP	19
1.9	La trasduzione del segnale nei funghi durante i processi di patogenesi.	23
1.10	Le proteine G nei funghi.	24
1.11	Segnale dipendente da cAMP nei funghi.	26
1.12	Mitogen activated protein kinase (MAPK) nei funghi.	29
1.13	Le strategie generali della patogenicità fungina.	33
1.14	Trasduzione del segnale nel genere <i>Trichoderma</i> .	34
1.15	Scopo della tesi	36
<b>2</b>	<b>Materiali e Metodi</b>	<b>37</b>
2.1	Ceppi e condizioni di crescita	37
2.1.1	Batteri	37
2.1.2	Funghi	37
2.2	Manipolazione degli acidi nucleici	41
2.3	Clonaggio dei frammenti dei geni <i>tgb1</i> , <i>tmk1</i> , <i>tmk3</i> e <i>tga3</i>	42
2.4	Clonaggio dei geni <i>tgb1</i> , <i>tmk1</i> , <i>tmk3</i> e <i>tga3</i>	43
2.5	Costruzione di vettori per la distruzione genica mirata	44

<b>2.6</b>	<b>Trasformazione di <i>T. atroviride</i></b>	<b>47</b>
<b>2.7</b>	<b>Saggi di biocontrollo</b>	<b>47</b>
<b>2.8</b>	<b>Saggi enzimatici</b>	<b>49</b>
<b>2.9</b>	<b>Analisi proteomica</b>	<b>50</b>
<b>2.9.1</b>	<b>Proteine intracellulari</b>	<b>50</b>
<b>2.9.2</b>	<b>Proteine esocellulari</b>	<b>51</b>
<b>2.9.3</b>	<b>Focalizzazione isoelettrica e SDS PAGE</b>	<b>52</b>
<b>2.9.4</b>	<b>Analisi delle immagini</b>	<b>53</b>
<b>2.9.5</b>	<b>Preparazione dei campioni per l'analisi MALDI-TOF</b>	<b>54</b>
<b>2.9.6</b>	<b>Analisi mediante spettrometria di massa MALDI-TOF</b>	<b>55</b>
<b>2.9.7</b>	<b>Identificazione delle proteine mediante i dati di spettrometria di massa MALDI-TOF</b>	<b>56</b>
<b>3</b>	<b>Risultati</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>Clonaggio dei geni <i>tgb1 tga3 tmk1 tmk3</i></b>	<b>57</b>
<b>3.2</b>	<b>Studio dell'espressione dei geni <i>tga3, tmk1 e tgb1</i></b>	<b>61</b>
<b>3.3</b>	<b>Distruzione genica mirata dei geni <i>tmk1, tgb1 e tga3</i> in <i>Trichoderma atroviride</i></b>	<b>63</b>
<b>3.4</b>	<b>Fenotipo e sporulazione del mutante difettivo per il gene <i>tga3</i>.</b>	<b>67</b>
<b>3.5</b>	<b>Capacità di micoparassitizzare il fungo ospite da parte di <math>\Delta tga3</math></b>	<b>69</b>
<b>3.6</b>	<b>Analisi delle attività di biocontrollo di P1 e di <math>\Delta tga3</math> <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></b>	<b>71</b>
<b>3.7</b>	<b>Analisi dell'attività chitinolitica di <math>\Delta tga3</math>.</b>	<b>75</b>
<b>3.8</b>	<b>Analisi dell'espressione di <i>nag1</i> ed <i>ech42</i> nel <math>\Delta tga3</math></b>	<b>77</b>
<b>3.9</b>	<b>Analisi dell'attività NAGasi intracellulare e associata al micelio</b>	<b>78</b>
<b>3.10</b>	<b>Analisi proteomica del mutante <math>\Delta tga3</math> e del P1 di <i>T. atroviride</i>.</b>	<b>80</b>
<b>3.11</b>	<b>Analisi proteomica delle proteine intracellulari di P1 e <math>\Delta tga3</math> cresciuti su substrato solido</b>	<b>80</b>

<b>3.12</b>	<b>Analisi proteomica delle proteine intracellulari di <i>Δga3</i> e P1 cresciuti in substrato liquido</b>	<b>87</b>
<b>3.13</b>	<b>Analisi proteomica delle proteine esocellulari di P1 e <i>Δtga3</i> cresciuti in substrati liquidi</b>	<b>95</b>
<b>4</b>	<b>Discussione</b>	<b>107</b>
<b>5</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>125</b>

# **1 INTRODUZIONE**

## **1.1 Lotta alle malattie delle piante**

Le malattie fungine causano la perdita di una buona parte della produzione agricola mondiale. Attualmente, il controllo dei funghi patogeni delle piante avviene prevalentemente mediante l'impiego di prodotti chimici, per la loro facilità di applicazione, l'ampio spettro d'azione e il costo relativamente contenuto dei fitofarmaci. Un impiego eccessivo di questi composti tuttavia ha causato gravi conseguenze ecologiche e ambientali quali l'inquinamento dei terreni e delle falde freatiche, la contaminazione delle derrate alimentari con la presenza di residui tossici, la riduzione della microflora utile e la comparsa di popolazioni di parassiti resistenti agli stessi fitofarmaci. Questa realtà ha incoraggiato lo sviluppo di nuove metodologie ecocompatibili per il controllo delle malattie delle piante, in un'ottica di lotta biologica in patologia vegetale.

Il controllo biologico o biocontrollo consiste nell'utilizzo di organismi naturali o modificati, di geni o prodotti genici, atti a ridurre gli effetti degli organismi indesiderati per favorire quelli utili all'uomo, alle coltivazioni, agli animali e ai microrganismi simbiotici (Smith, 1919; NAS, 1987) con l'obiettivo principale di ridurre la densità di inoculo o le capacità patogeniche di un parassita nel suo stato attivo o dormiente. Infatti, affinché si verifichi un evento patologico è necessario che si manifesti la contemporanea presenza di tre fattori: pianta suscettibile, patogeno virulento e condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo del patogeno, ma in queste interazioni ecologiche va aggiunta la presenza dell'agente di biocontrollo quale nuovo elemento (figura 1.1).

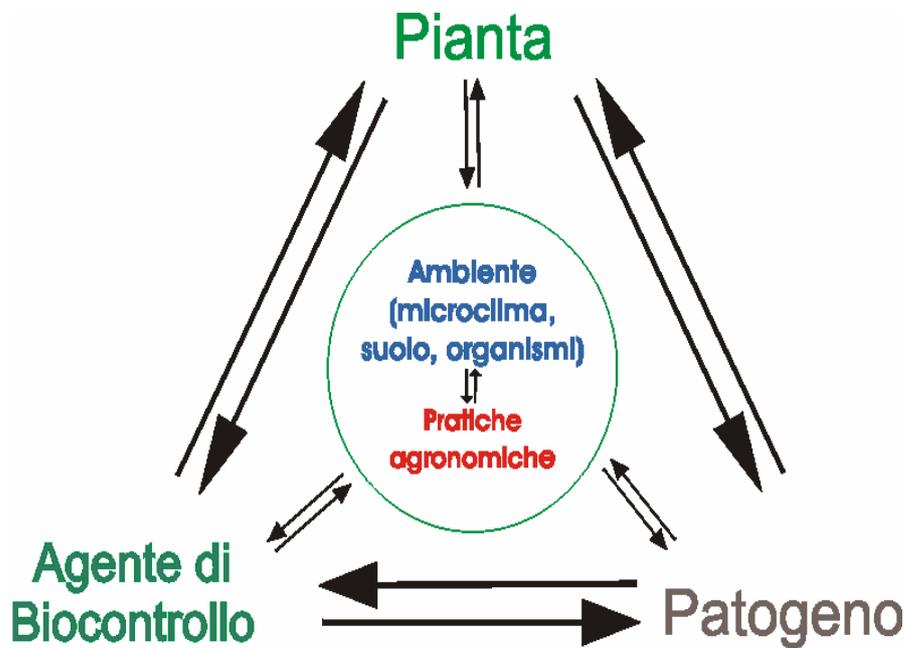


Figura 1.1: illustrazione schematica dell'interazioni ecologiche tra pianta, patogeno, agente di biocontrollo, variabili ambientali e interferenza umana

Per questo motivo le numerose strategie di lotta biologica agiscono modificando uno dei quattro "protagonisti" delle interazioni ecologiche.

Il controllo biologico infatti può essere effettuato utilizzando le proprietà di un suolo soppressivo (Cook, 1997) in cui un patogeno, anche se presente, può non espletare la sua virulenza o espletarla in maniera molto ridotta, per cui la malattia risulterà del tutto assente o appena manifesta. La soppressività di un suolo è legata a componenti abiotiche, quali la struttura e la composizione chimico-fisica del suolo stesso, anche se nella maggior parte dei casi è imputabile a fattori biotici (funghi dei generi *Trichoderma*, *Penicillium*, *Sporidesmium*, *Fusarium*, batteri del genere *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Streptomyces* e attinomiceti). Ad esempio in un suolo colombiano soppressivo per la *Rhizoctonia solani* sono stati trovati alti livelli di *Trichoderma* spp. ( $10^8$  propaguli/g di terreno rispetto a  $10^3$  propaguli/g presenti normalmente in terreni conduttivi). Un suolo conduttivo, ovvero un suolo in cui la malattia raggiunge i livelli

più elevati (Baker, 1987), può essere reso soppressivo combinandolo con una quantità relativamente piccola di un terreno soppressivo.

Tra le metodologie del controllo biologico rientrano gli interventi sull'ambiente come la solarizzazione che modifica la temperatura, l'umidità, l'intensità luminosa e la disponibilità di composti organici e inorganici; pratiche agronomiche che agiscono alterando l'interazione ospite-patogeno, come l'anticipo, il ritardo della semina e la coltivazione di varietà con maturazione anticipata.

L'inoculo di agenti di biocontrollo (antagonisti) sulla pianta o direttamente nel suolo all'inizio del ciclo di crescita della pianta (Cook and Baker, 1983) è tra le strategie di lotta biologica più interessanti.

Esiste una grande varietà di agenti di biocontrollo (virus, batteri, funghi, protozoi e nematodi) che con diversi meccanismi agiscono da antagonisti, molti di questi (*Agrobacterium radiobacter* ceppo K84, *Bacillus subtilis* GBO3 e MBI 600, *Pseudomonas cepacia* tipo Wisconsin, *Streptomyces griseoviridis* K61, *Trichoderma harzianum* RL-AG-2 o *Gliocladium virens* GL-21) sono registrati dall'EPA (U.S. Environmental Protection Agency) (Cook et al., 1996).

In diversi paesi sono disponibili in commercio formulati a base microbica come ad esempio le spore di *Bacillus subtilis*, impiegati per il trattamento dei semi di cotone, arachide e mais o i conidi di *T. harzianum* e *T. virens* utilizzati per il controllo di malattie causate da funghi terricoli (Cook et al., 1996).

Una tecnica molto diffusa in frutticoltura è il trattamento preventivo delle radici di alcune piante arboree con il ceppo K84 di *A. radiobacter*, efficace nel controllo di *A. tumefaciens*, agente dei tumori radicali (Cook et al., 1996).

Oltre al controllo del patogeno, diversi autori hanno segnalato la presenza di numerosi effetti sulla pianta mostrati in tabella 1.1, sequenziali al trattamento dei semi o delle radici con funghi e batteri antagonisti, in particolar modo a quelli appartenenti ai generi *Pseudomonas* e *Trichoderma* (Whipps, 1997).

Tabella: 1.1. Esempi degli effetti benefici ottenuti con il trattamento dei semi, radici e mezzi di crescita con funghi e batteri antagonisti (Whipps, 1997).

<b>Microrganismi</b>	<b>Piante</b>	<b>Incrementi osservati</b>
Batteri :		
<i>Azospirillum</i>	pomodoro	emergenza, peso secco, lunghezza radici e germogli
<i>Azotobacter</i>	pomodoro	emergenza, peso secco, lunghezza radici e germogli
<i>chroococcum</i>		germogli
<i>Bacillus subtilis</i>	cotone	crescita della pianta
<i>Pseudomonas spp.</i>	cetriolo	emergenza, sviluppo apparato epigeo ed ipogeo, peso secco
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	pomodoro	emergenza, sviluppo apparato epigeo ed ipogeo
Funghi :		
<i>Trichoderma spp.</i>	lattuga	nuovi germogli e aumento del peso secco
	petunia	numero di fiori
<i>Trichoderma</i>	cetriolo	emergenza
<i>harzianum</i>	pomodoro	emergenza, peso secco e fresco dell'apparato ipogeo ed epigeo
	crisantemo	peso secco e fresco
	ravanello	germinazione
<i>Trichoderma viride</i>	lattuga	peso fresco germogli

Sono stati infatti evidenziati, a seconda del trattamento eseguito e della specie vegetale studiata, un aumento della germinazione, della produzione e della fioritura e un

significativo sviluppo della parte epigea ed ipogea. L'incremento della crescita si ipotizza sia legato alla produzione di vitamine, alla conversione di diversi composti presenti nel terreno in nutrienti utilizzabili dalla pianta, all'incremento della disponibilità e assimilabilità di alcuni minerali (Kleifeld and Chet, 1992). Alcuni lavori eseguiti su cultivar di mais, pomodoro e tabacco mostrano che diverse specie di *Trichoderma* sono in grado di incrementare la germinazione dei semi e lo sviluppo della parte epigea e ipogea della pianta (Windham et al., 1986) (Harman and Bjorkman, 1997). Sono inoltre da evidenziare gli effetti positivi sulla crescita delle piante dovuti alla fissazione dell'azoto operata da *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Bacillus* spp. e da *Pseudomonas* (Okon, 1985; Kloepper et al., 1989; Hong et al., 1991).

## **1.2 Antagonismo tra microrganismi**

Gli agenti di biocontrollo agiscono con diversi meccanismi. Tra le strategie di attacco vi è l'antibiosi che si esplica con la produzione di metaboliti che possono inibire l'accrescimento e lo sviluppo di microrganismi patogeni, ma svolgono attività letale solo quando penetrano e si accumulano nelle cellule. In molti sistemi, studiati mediante analisi genetiche basate su mutanti e test biochimici con antibiotici purificati, è stato possibile evidenziare una o più sostanze aventi un ruolo fondamentale nel controllo della malattia. Spesso questi metaboliti, caratterizzati da un basso peso molecolare, sono prodotti dalla microflora antagonista in condizioni di ridotta disponibilità di nutrienti (Lewis et al., 1991). Tra gli agenti produttori di antibiotici maggiormente studiati si ricordano diverse specie di *Pseudomonas*, produttrici di fenazine, che sono stati tra i primi antibiotici studiati e chiaramente implicati nel biocontrollo. Questi organismi utilizzano dei sensori, PhzR, i quali attraverso la concentrazione di un induttore, prodotto sia dall'organismo stesso che da altri microrganismi presenti nella rizosfera, percepiscono la densità della popolazione nella stessa e regolano di conseguenza la

produzione di antibiotici (Handelsman and Stabb, 1996). Tra gli antibiotici prodotti dai funghi si ricordano la gliovirina e la gliotossina, prodotte da *T. virens* e attive contro *P. ultimum* (Whilhite et al., 1994), e la cheotomina prodotta da *Chaetomium* spp., attiva nel controllo di *Venturia inaequalis* (Davis et al., 1992).

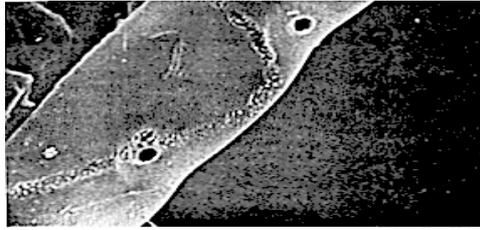
Un agente di biocontrollo può inoltre controllare il suo ospite competendo con questo per lo spazio, per le sostanze nutritive o per altri fattori indispensabili all'attività e allo sviluppo del patogeno. Un importante esempio di competizione per i nutrienti è fornita da alcuni batteri agenti di biocontrollo (in particolare quelli appartenenti al genere *Pseudomonas*), nei terreni con pH inferiore a 7. Essi infatti, riducono la disponibilità del ferro, normalmente disponibile per i microrganismi solo in basse concentrazioni e a pH neutri (Duijiff et al., 1994). Per tale motivo questi batteri hanno sviluppato sistemi di assimilazione del ferro altamente efficaci, basati sull'uso di siderofori (proteine con un dominio di legame selettivo per il ferro) e sul trasporto all'interno della cellula mediato da una proteina specifica (carrier). Un'altra modalità attraverso cui si esplica il controllo di numerosi patogeni terricoli è rappresentato dalla competizione per i siti d'infezione. E' stata osservata la riduzione della colonizzazione delle radici da parte di *F. oxysporum* in presenza di ceppi non patogeni della stessa specie (Schneider, 1984; Mandeel and Baker, 1991; Epavier and Alabouvette, 1994).

Gli agenti di biocontrollo possono inoltre indurre nelle piante resistenza alle malattie, stimolando l'attivazione della risposta ipersensibile (RI) e della resistenza sistemica acquisita (SAR). Il ceppo CHA0 di *Pseudomonas fluorescens*, ad esempio, produce il sideroforo pioverdina che induce la SAR e la sintesi di proteine collegate con la patogenesi PR (pathogen related-Proteins), proteggendo, in tal modo, la pianta dai patogeni. Questa specie produce anche un liposaccaride presente sulla superficie cellulare, che da solo è in grado di indurre resistenza a *Fusarium* (Harman and Bjorkman, 1997).

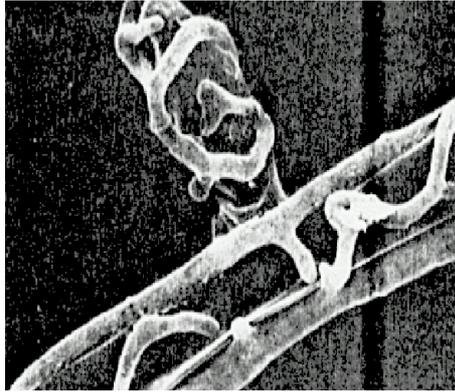
In natura esistono diversi livelli di virulenza e il controllo biologico sfrutta anche l'ipovirulenza nelle popolazioni dei patogeni in modo che ceppi poco virulenti competono con quelli più virulenti nell'ecosistema pianta (Alabouvette et al., 1992). Particolarmente interessante risulta il caso della *Cryphonectria parasitica*, agente del cancro del castagno; i ceppi di tale patogeno che presentano una ridotta virulenza imputabile ad un micovirus, virus a doppia elica di RNA (dsRNA), trasmettono questo virus per anastomosi ifale ai ceppi virulenti (MacDonald and Fulbright, 1991), riducendo la capacità patogenica.

In ultimo, ma non per questo meno importante, il parassitismo è il fenomeno per cui un organismo stabilisce un'intima associazione con un altro, da cui preleva parte e/o tutti i suoi nutrienti, senza offrire alcun tipo di vantaggio. L'interazione specifica tra antagonista e patogeno fungino è detta micoparassitismo e prevede diverse fasi quali il riconoscimento a distanza, una crescita chemiotattica verso l'ospite, l'instaurazione di un'interazione fisica compatibile tra i due organismi, la formazione di strutture specializzate (tipo appressori) la penetrazione, la colonizzazione dell'ospite ed infine l'evasione (Kubicek et al., 2001), in figura 1.2 sono riportate alcune delle fasi del micoparassitismo.

A)



B)



C)



Figura 1.2: immagine al microscopio elettronico di fori causati dal micoparassita *T. atroviride* ai danni del fungo fitopatogeno *R. solani*. A) Evidenza di fori sulla parete cellulare dell'ospite dopo 8 ore di interazione con *Trichoderma*. B) Dopo 8 ore di contatto *Trichoderma* è strettamente associato all'ospite *R. solani*. C) Dopo 48 ore d'interazione l'ospite è completamente invaso dalle ife dell'antagonista.

In questo processo partecipano attivamente enzimi di tipo litico (chitinasi, glucanasi, proteasi) capaci di degradare le pareti cellulari consentendo la colonizzazione dei tessuti

dell'ospite. Il micoparassitismo culmina con la lisi del micelio ospite, dei suoi conidi, e delle altre strutture di conservazione.

Negli ultimi anni numerosi progressi sono stati effettuati nella comprensione della complessa biologia dell'interazione patogeno-agente di biocontrollo, individuando i geni coinvolti in tale meccanismo, al fine di selezionare organismi che esprimano caratteristiche utili nel controllo biologico (Haran et al., 1996).

### **1.3 *Trichoderma* come agente di biocontrollo**

Le numerose applicazioni pratiche fanno del genere *Trichoderma* un argomento di intensi studi sia come agente di lotta biologica, sia come microrganismo modello per studiare i processi di biocontrollo. In tabella 1.2 sono riportati alcuni dei funghi fitopatogeni controllati dalle diverse specie di *Trichoderma* (Harman and Kubicek, 1997).

Tabella 1.2: Funghi fitopatogeni controllati da alcune specie di *Trichoderma*

<b>Trichoderma</b>	<b>Pianta trattata</b>	<b>Patogeno controllato</b>
<i>T. harzianum</i>	barbabetola, pomodoro, fagiolo, girasole	<i>Sclerotium rolfsii</i>
	aglio	<i>Sclerotium cepivorum</i>
	lattuga	<i>Pythium ultimum</i>
		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
	patata	<i>Phytophthora spp.</i>
	narciso, pomodoro	<i>Fusarium oxysporum</i>
	cotone, melone, patata, lattuga,	
	cotone, fagiolo	<i>Rhizoctonia solani</i>
	patata, barbabetola	
	rafano, carota, tabacco	
<i>T. viride</i>	pomodoro	<i>Verticillium spp.</i>
	fruttiferi	<i>Armillaria mellea</i>
	Fagiolo	<i>Penicillium digitatum</i>
	lattuga	<i>Sclerotium rolfsii</i>
	narciso	<i>Pythium ultimum</i>
	cotone, pomodoro	<i>Fusarium oxysporum</i>
	leguminose, patata, barbabetola	<i>Rhizoctonia solani</i>
patata	<i>Verticillium spp.</i>	

Il *Trichoderma* è un organismo ubiquitario, non patogeno per le piante superiori, facile da isolare e coltivare. E' un micoparassita produttore di antibiotici e un forte competitore nella sua nicchia trofica, possiede un sistema enzimatico capace di attaccare una grande varietà di patogeni. La maggior parte delle specie del genere

*Trichoderma* cresce rapidamente producendo una grande quantità di spore di colore verdi o bianche, formatesi da cellule conidiogene con ontogenesi fialidica. I conidiofori sono ramificati e a forma piramidale, settati e contengono più di un nucleo. I conidi sono ovoidali, generalmente con parete liscia e possiedono un solo nucleo (Kubicek et al., 1990). Le tecniche di biologia molecolare hanno permesso di definire il numero di cromosomi per nucleo, la loro grandezza e quella totale del genoma, che è compresa tra 30.5 e 35.8 Mb (Fekete et al., 1996).

Il primo ricercatore a descrivere i funghi appartenenti a questo genere come agenti litici fu Weindling nel 1932. Una classificazione basata su criteri morfologici fu fatta da Rifai nel 1969, ma più tardi grazie alle analisi dei frammenti di restrizione del DNA mitocondriale ed altre analisi genetiche (Meyer et al., 1992), le differenti specie di *Trichoderma* sono state suddivise in cinque gruppi: il primo gruppo comprende *T. reesei* e *T. todicta*; il secondo *T. longibrachiatum*, *T. polysporum*, *T. koningii* e *T. pseudokoningii*; il terzo gruppo *T. virgatum*; il quarto *T. saturnisporum* e il quinto *T. harzianum*.

I funghi del genere *Trichoderma* agiscono come agenti di biocontrollo producendo antibiotici, competendo per i nutrienti e micoparassitizzando l'ospite.

#### **1.4 *T. atroviride*: meccanismi di biocontrollo**

La capacità antibiotica di *Trichoderma* si esplica con la produzione di numerosi metaboliti tossici quali ad esempio la gliovirina, la gliotossina, la trichodermina e le trichozianine, attivi contro una vasta gamma di funghi e batteri (Papavizas, 1985). Faull e Scarseletti (1994) osservarono che il composto 6-pentil- $\alpha$ -pirone, un metabolita di *T. harzianum*, ha attività inibitoria *in vitro* contro *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Whilhite e colleghi (1994) attribuirono alla gliotossina

l'effetto fungistatico dimostrato dal ceppo G20 di *T. virens*, già commercializzato come Gliogard.

Il meccanismo di competizione è legato alla capacità di *Trichoderma* spp. d'influenzare la disponibilità di alcuni nutrienti nella rizosfera, limitando la nutrizione di altri funghi (Silvan and Chet, 1989). Il ferro, ad esempio, viene sequestrato mediante la produzione di siderofori simili a quelli prodotti da *Pseudomonas* spp.. Un altro meccanismo di competizione consiste nell'occupazione di nicchie comuni con i microrganismi fitopatogeni. Infatti la sola presenza di *Trichoderma* spp. sui fiori o grappoli d'uva impedisce la colonizzazione della corte d'infezione da parte di *B. cinerea* (Lorito et al., 1994b).

Il micoparassitismo di *Trichoderma* è di tipo distruttivo perché l'interazione *Trichoderma* - ospite si risolve con la soppressione di quest'ultimo. Questo meccanismo di biocontrollo prevede un'iniziale crescita chemiotattica di *Trichoderma* verso le ife del suo ospite, il quale produce un gradiente di essudati (Nordbring-Herts and Chet, 1996); questo primo riconoscimento è mediato dalle lectine del fungo ospite e da residui di zucchero, generalmente galattosio e fruttosio, presenti sulla parete di *Trichoderma* (Inbar and Chet, 1997). Il micelio di *Trichoderma*, dopo il contatto fisico con l'ospite, sviluppa strutture specializzate simili a ganci e appressori, atti ad avvolgere le ife del patogeno. Infatti, rimuovendo le ife di *Trichoderma* dal suo ospite sono stati osservati solchi e fori di penetrazione, generati dagli enzimi litici prodotti dall'antagonista. Le chitinasi e le  $\beta$ -glucanasi svolgono un ruolo cruciale nella penetrazione, dal momento che la struttura della parete cellulare fungina è costituita principalmente da questi polimeri strutturali ( $\beta$ -glucani e chitina) (Lorito et al., 1994b).

Nell'ultima fase dell'interazione antagonista-ospite, *Trichoderma* digerisce il contenuto intracellulare del fungo attaccato, provocando la perdita del citoplasma e la disintegrazione delle ife dell'ospite (Benhamur and Chet, 1996).

## 1.5 Applicazioni di *Trichoderma*

Le specie del genere *Trichoderma* si prestano, oltre che in agricoltura, ad applicazioni di vario tipo. Ad esempio gli enzimi cellulolitici di *Trichoderma reesei* sono applicati nell'industria dei detersivi per il vestiario e nell'alimentazione animale (Reese and Mandels, 1989; El Goray et al., 1990; Kubicek et al., 1990). Sempre le cellulasi di *T. reesei* sono utilizzate per il biancheggiamento della carta riciclata proponendo un'alternativa al tradizionale biancheggiamento con cloro (Buchert et al., 1994), riducendo l'impatto ambientale di questo processo industriale. Interessanti studi sul sistema ossidativo di *T. harzianum* hanno messo in evidenza la sua capacità di degradare i pesticidi clororganici come l'endosulfan (Katayama and Matsumura, 1993).

Per quanto riguarda il biocontrollo in Patologia Vegetale, le specie del genere *Trichoderma* maggiormente utilizzate per il controllo biologico sono *T. harzianum* e *T. virens* (Papavizas, 1985; Chet, 1987). In particolare, gli enzimi chitinolitici di questi due ceppi sono studiati perché ritenuti responsabili della degradazione della parete cellulare nei funghi contenenti chitina (De la Cruz et al., 1992; Di Pietro et al., 1993, Lorito et al., 1993, 1994). Numerosi lavori dimostrano che *T. harzianum*, da solo o in combinazione con altre specie di *Trichoderma* oppure con prodotti chimici, attacca direttamente gli agenti patogeni quali ad esempio *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Sclerotinia* e *Botrytis*. Particolarmente interessante è il sinergismo degli enzimi litici di *Trichoderma* e alcuni fungicidi inibitori della sintesi degli steroli (flusilazolo, miconazolo), della chitina e dei  $\beta$ -glucani. I CWDEs (Cell Wall Degrading Enzymes), operando la degradazione della parete cellulare fungina, favoriscono la penetrazione dei fungicidi nei siti specifici d'azione che raggiungono in tal modo concentrazioni più elevate nelle cellule bersaglio (Lorito et al., 1994a).

Il sinergismo tra gli enzimi e i fungicidi suggerisce l'applicazione di questi composti per migliorare la resistenza alle malattie delle piante e nella produzione di nuovi

formulati anticrittogamici (Lorito et al., 1994a) utili nella lotta integrata, permettendo di ridurre la quantità di pesticidi chimici e pertanto l'impatto ambientale. Diverse specie di *Trichoderma* sono utilizzati in preparati commerciali, ad esempio il *T. harzianum* T39 è l'ingrediente attivo del Trichodex<sup>TM</sup> (Elad and Shitenberg, 1996).

E' stato inoltre osservato che alcune specie di *Trichoderma* hanno un effetto sinergico con i PGPR (Plant Growth Promoter Rhizobacteria), microrganismi capaci di colonizzare le radici e produrre benefici alla coltivazione potenziando la crescita e controllando le malattie (Clavet et al., 1993).

### **1.6 Enzimi idrolitici di *Trichoderma* coinvolti nel controllo biologico**

Durante il processo di micoparassitismo, *Trichoderma* riconosce, entra in contatto e distrugge la parete cellulare del fungo ospite. La parete cellulare fungina è costituita (in ordine decrescente di abbondanza): da carboidrati (80-90%), proteine, lipidi, pigmenti e sali minerali. *Trichoderma* ha sviluppato un sistema antifungino basato essenzialmente su una vasta gamma di enzimi litici che vengono secreti all'esterno: endochitinasi,  $\beta$ -N-acetilglucosamminidasi, chitobiosidasi, proteasi,  $\beta$ -1,3-glucanasi,  $\beta$ -1,4-glucanasi,  $\beta$ -1,6-glucanasi, lipasi, xilanasi, mannanasi, pectinasi, pectin liasi, amilasi, fosfolipasi, RNasi, DNasi ecc. (Lorito, 1998).

I  $\beta$ -glucani sono polimeri lineari di D-glucosio uniti da legami  $\beta$ . La loro funzione è diversa e dipende dalla grandezza, struttura e proprietà chimico fisiche. I  $\beta$ -glucani sintetizzati dai funghi sono sia extracellulari che citoplasmatici: la maggior parte si localizza nella parete cellulare, formando polimeri strutturali che conferiscono rigidità e protezione alla parete. Gli enzimi che idrolizzano i  $\beta$ -glucani sono classificati in base al tipo di legame che scindono:  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,6 e  $\beta$ -1,4-glucanasi o cellulasi che degradano l'omopolimero  $\beta$ -1,4-glucano. Le glucanasi sono distinte in eso e endo, le prime idrolizzano il polimero dall'estremità non riducente dando come prodotto finale

monomeri, le seconde agiscono all'interno della molecola in più punti a caso, rilasciando oligosaccaridi solubili di varie dimensioni. La presenza delle  $\beta$ -1,3-glucanasi è stata descritta nei funghi, batteri, alghe, piante e animali. Nei batteri e nei funghi filamentosi sono enzimi esocellulari (Resee et al., 1950), e in alcuni funghi sono anche associate alla parete cellulare. Le glucanasi dei funghi filamentosi svolgono principalmente tre funzioni: una funzione autolitica finalizzata alla liberazione delle spore in alcuni corpi fruttiferi dei basidiomiceti; una funzione morfogenetica nell'accrescimento e nel differenziamento e una funzione nutrizionale, rispettivamente nei funghi saprofiti e micoparassiti. L'evidenza che le glucanasi giochino un ruolo fondamentale nel micoparassitismo è dimostrata dagli studi di Lorito e colleghi, (1994b), in cui una quantità di 90  $\mu\text{g/ml}$  di una  $\beta$ -1,3-glucanasi purificata da *T. harzianum* produce un'inibizione del 50% sia della germinazione delle spore che dell'allungamento del tubetto germinativo dei conidi di *B. cinerea* e di molti altri funghi fitopatogeni.

La chitina è un polimero non ramificato formato da unità di N-acetil-D-glucosamina (NAcGluc) unite da un legame  $\beta$ -1,4, dopo la cellulosa è il biopolimero più abbondante in natura, essendo presente nell'esoscheletro di molti invertebrati e nelle pareti cellulari della maggior parte dei funghi. Gli enzimi chitinolitici sono comunemente presenti nei protisti, batteri, funghi, piante, invertebrati e vertebrati (Lorito, 1997). Tutti gli enzimi capaci di catalizzare la degradazione della chitina attraverso l'idrolisi del legame  $\beta$ -1,4 dell'N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina sono definiti enzimi chitinolitici e sono suddivisi in tre gruppi, differenziati sulla base dell'attività e del prodotto di reazione. Le chitobiasi o  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosaminidasi sono esochitinasi, scindono la chitina dall'estremità non riducente, rilasciando solo monomeri di N-acetilglucosamina. Le endochitinasi scindono la chitina e i chitoligomeri a caso, rilasciando una miscela di prodotti solubili di differente dimensione e basso peso molecolare. Una espressione aumentata delle endochitinasi genera ceppi più efficaci nel controllo biologico. Margolles-Clark e

colleghi (1996) hanno utilizzato un promotore di un gene di *T. reesei* per ottenere trasformanti di *T. harzianum* che sovraesprimevano il gene dell'endochitinasi *ThEn-42*. I trasformanti ottenuti avevano una produzione di endochitinasi esocellulari 5 volte maggiore rispetto al ceppo selvatico, mentre l'attività chitinasica totale incrementava di 10 volte.

Le chitobiosidasi o  $\beta$ -1,4-chitobiosidasi sono esochitinasi che, a partire dall'estremità non riducente della chitina e dei chitoligomeri, rilasciano dimeri di N-acetilglucosamina detti chitobiosi.

Il sistema chitinolitico di *T. harzianum* è il più studiato tra i *Trichoderma* spp. (Lorito et al., 1994b) e i suoi enzimi possono essere divisi in due gruppi.

Al gruppo I appartengono gli enzimi di peso molecolare di circa 60-70 kDa o più grandi, tutti  $\beta$ -acetilesosaminidasi; il gruppo II comprende tutti gli enzimi con peso molecolare minore di 60 kDa, per la maggior parte tutte endochitinasi. Il secondo gruppo può essere suddiviso nei sottogruppi IIa (endochitinasi e chitobiosidasi di peso molecolare maggiore di 40 kDa CHIT52-40) e IIb (endochitinasi di peso molecolare minore di 40 kDa CHIT37-28) (Lorito, 1998). In *Trichoderma* spp., come in molti funghi filamentosi, le chitinasi possono svolgere diverse attività: una morfogenetica, mediante la lisi della chitina endogena e l'accrescimento ifale e una nutrizionale, per l'ottenimento di zuccheri semplici e per penetrare i funghi parassitati (Gooday et al., 1985). Il ceppo P1 di *T. atroviride* è tra i più studiati e usati con successo. Tra i suoi enzimi chitinolitici la CHIT42 è tra quelli più ampiamente studiati, avendo dimostrato di possedere una notevole attività antifungina (Harman et al., 1993). Questo enzima è codificato dal gene *ech42* (*ThEn42*), presente in singola copia nel ceppo P1 (Hayes et al., 1994) e di questo gene è stato caratterizzato anche il promotore (Lorito et al., 1996). Le chitinasi di *T. harzianum* sono molto più efficaci di quelle prodotte da piante e batteri per quanto riguarda le capacità di inibire funghi fitopatogeni. Infatti questi enzimi fungini sono capaci di lisare non solo l'estremità ifale dove la chitina non è

ancora completamente cristallizzata, come nel caso delle chitinasi di pianta, ma anche le pareti delle ife mature, dei conidi, delle clamidospore e degli sclerozi, dove la chitina raggiunge livelli di cristallizzazione maggiore ed è normalmente più resistente alla digestione enzimatica (Lorito, 1998).

La parete fungina contiene oltre a chitina e glucani anche lipidi e proteine. Sivan e Chet (1989) riscontrarono che il trattamento delle pareti cellulari di *F. oxysporum* con enzimi proteolitici provocava un incremento della degradazione della chitina e dei  $\beta$ -1,3-glucani ad opera di *T. harzianum*. Una proteasi alcalina da *T. harzianum* coinvolta nel micoparassitismo, la PRB1, è stata purificata e caratterizzata. Successivamente è stato clonato e caratterizzato il gene di questa proteasi, ed è stato riscontrato un incremento del corrispondente mRNA in presenza di *R. solani* (Geremia et al., 1993). Attualmente sono stati ottenuti trasformanti di *T. harzianum* più efficaci nel micoparassitismo e nel biocontrollo, aumentando il numero di copie del gene *prb1* (Flores et al., 1997). Per questi ceppi ingegnerizzati, aventi un più alto livello di espressione del *prb1* durante l'interazione con *R. solani*, si è riscontrato un maggiore controllo *in vitro* e *in vivo* del patogeno (Flores et al., 1997).

## **1.7 Trasduzione del segnale**

Quando in risposta a uno stimolo esterno un recettore presente sulla membrana plasmatica reagisce con un ligando e di conseguenza attiva una via di risposta nel citosol tale processo prende il nome di trasduzione del segnale. A livello cellulare ci sono due tipi di trasduzione del segnale:

- il recettore ha nel dominio citosolico un'attività chinasi indotta quando il ligando si attacca al dominio esocellulare. In questa condizione il dominio citosolico si autofosforila permettendo al recettore di attivare, tramite

fosforilazione, una proteina bersaglio, in modo che questa agisca a sua volta su nuovi substrati all'interno della cellula. I più comuni recettori chinasi sono le tirosina chinasi, ma esistono anche recettori del tipo serina/treonina chinasi.

- il recettore può interagire con una proteina G associata alla membrana. Le proteine G prendono il loro nome dalla capacità di legare nucleotidi guanidinici. La forma inattiva della proteina G è un trimero legato a GDP. In seguito all'attacco del ligando un recettore reagisce con la proteina G causando la sostituzione del GDP con il GTP; come risultato la proteina G si dissocia in una subunità che porta il GTP e un dimero composto da altre due subunità. Il monomero o il dimero attivano una proteina bersaglio, spesso associata alla membrana, che a sua volta reagisce con altre proteine bersaglio presenti nel citoplasma. Questa catena di eventi spesso stimola la produzione di un secondo messaggero (Lewin 1997).

## 1.8 Proteine G, MAPK e cAMP

Le proteine G trasducono segnali da una varietà di recettori a una varietà di bersagli. Le componenti della trasduzione del segnale mediato dalle proteine G sono: un recettore residente nella membrana attivato da un segnale extracellulare; una proteina G che attivata dal recettore passa dalla forma inattiva a quella attiva con la sostituzione del GDP a GTP; un effettore cioè una proteina bersaglio attivata dalla proteina G e un secondo messaggero cioè una piccola molecola che viene rilasciata come risultato dell'attivazione degli effettori.

E' importante stabilire che c'è una grande varietà di proteine G attivate da una grande varietà di recettori, e che l'attivazione della proteina G può inibire o attivare un particolare effettore o effettori multipli. I recettori accoppiati alle proteine G hanno in comune la struttura e il meccanismo di legame del ligando. Questi recettori sono detti a serpentina, hanno 7 regioni transmembrana e funzionano come monomeri con il dominio N-terminale localizzato fuori della cellula e il dominio C-terminale nel citoplasma. La maggiore conservazione di sequenza si trova nelle regioni idrofobiche transmembrana, usate per classificare i recettori a serpentina in diverse famiglie (Dohlman et al., 1991). Quando il ligando si lega nel suo sito provoca nel recettore una modificazione conformazionale che lo fa interagire con una proteina G attivandola. Le proteine G nello stato trimetrico con il GDP legato alla subunità  $\alpha$  sono inattive. Un cambiamento conformazionale del recettore induce un cambiamento conformazionale nella subunità  $\alpha$  tale da provocare il rilascio del GDP. Nel citosol la concentrazione di GTP è molto maggiore di quella del GDP, quindi il sito vuoto viene riempito da un GTP. Il legame di una molecola di GTP induce l'attivazione della proteina G ovvero il rilascio della subunità  $\alpha$  dal recettore e dal complesso  $\beta\gamma$ . Il passaggio successivo consiste

nell'attivazione di un effettore da parte della subunità  $\alpha$  e/o del dimero  $\beta\gamma$  (Birnbaumer, 1992; Gutkind, 1998) (figura 1.3).

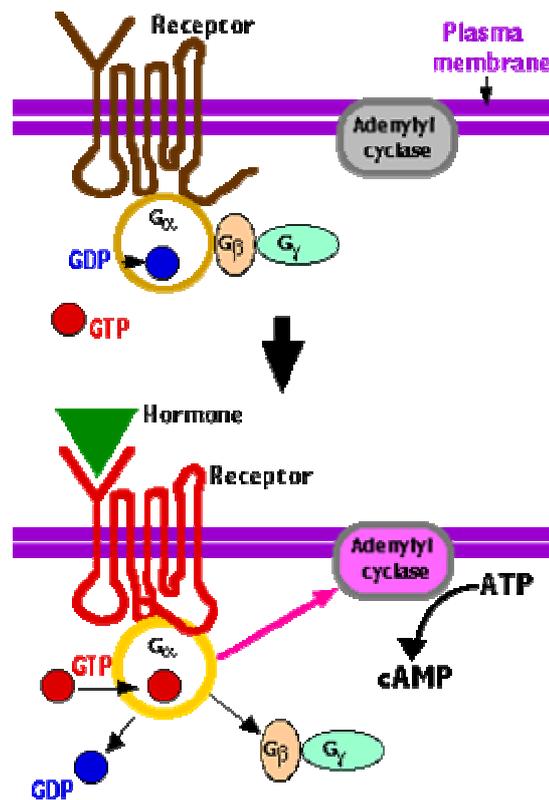


Figura 1.3: esempio di trasduzione del segnale dipendente da una G proteina.

La trasduzione del segnale prosegue con gli effettori attivati che inducono la produzione di secondi messaggeri, ad esempio attraverso l'azione di fosfolipasi (la fosfolipasi C libera diacil glicerolo e inositolo trifosfato dai trigliceridi), o con l'attivazione di protein-chinasi a cascata. Queste proteine sono attivate in risposta a una grande varietà di stimoli, come l'induzione della crescita cellulare, del differenziamento e sembrano inoltre avere un ruolo centrale nel controllo di modificazioni del fenotipo cellulare. Le MAP chinasi sono serina/treonina chinasi e si trovano nel citosol, agiscono trasferendo gruppi fosfato a proteine bersaglio e prendono il nome dagli aminoacidi da esse fosforilate nella proteina bersaglio. L'effetto finale dell'azione delle MAP chinasi è un cambiamento nel quadro complessivo della trascrizione mediante l'attivazione o la disattivazione dei fattori di trascrizione. La MAP chinasi può traslocare o essere trasportata nel nucleo dove si verifica la fosforilazione dei fattori di trascrizione; una via alternativa è la fosforilazione di un fattore citoplasmatico; questo può essere un fattore

di trascrizione che si sposta poi nel nucleo o una proteina che regola un fattore di trascrizione (Lewin, 1997).

Nella trasduzione del segnale un esempio noto di secondo messaggero è l'AMP ciclico (cAMP) che induce la trascrizione mediante l'attivazione di CREB (cAMP response element binding protein). L'attivazione dell'adenilato ciclasi da parte di una proteina G attivata porta a un aumento del livello di cAMP che si lega alla subunità regolatrice R della Ser/Thr chinasi PKA (cAMP dependent protein kinase), ancorata alla membrana nella regione perinucleare. La formazione del complesso cAMP-subunità R consente il rilascio della subunità catalitica C della PKA, che è libera di traslocare nel nucleo. La traslocazione avviene per diffusione passiva e coinvolge soltanto una frazione delle subunità C rilasciate, che ha bersagli di fosforilazione sia nel citosol che nel nucleo. CREB è una dei principali substrati nucleari della PKA. La fosforilazione su un singolo residuo di serina di CREB favorisce il legame di tale complesso all'elemento di risposta CRE che si trova nei promotori dei geni la cui attivazione è controllata dal cAMP (figura 1.4) (Lewin, 1997).

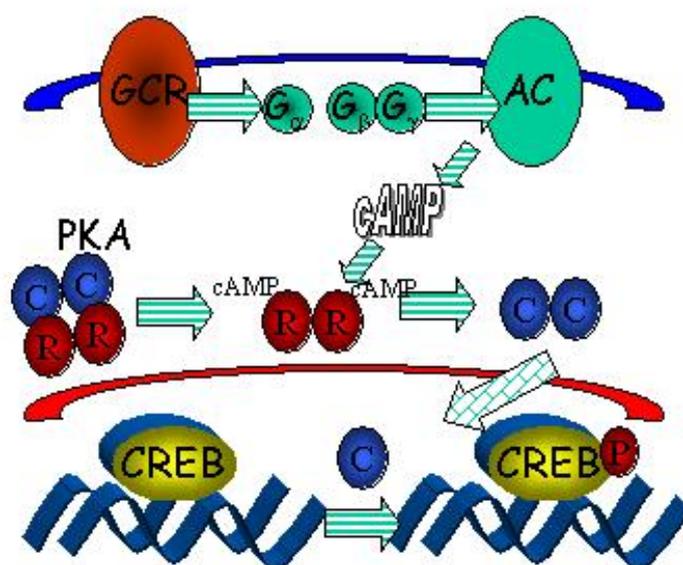


Figura 1.4: trasduzione del segnale mediante PKA: i recettori accoppiati alle proteine G

(GCR) attivano questo complesso che a sua volta induce l'Adenilato ciclasi (AC), con conseguente formazione di cAMP. Il cAMP si lega alle subunità R della protein chinasi (PKA), le subunità C sono rilasciate, alcune di esse traslocano nel nucleo e fosforilano CREB che dà inizio alla trascrizione dei geni sotto il suo controllo.

### **1.9 La trasduzione del segnale nei funghi durante i processi di patogenesi.**

Il riconoscimento degli stimoli dell'ambiente esterno gioca un ruolo fondamentale nelle cellule eucariotiche. Un gran numero di segnali sono percepiti sulla superficie cellulare e trasmessi all'interno per indurre risposte specifiche come la trascrizione genica, la fosforilazione proteica e la riorganizzazione del citoscheletro. I funghi percepiscono segnali sia chimici che fisici ad esempio nutrienti, osmolarità, pH, luce, superfici idrofobiche, feromoni per la compatibilità sessuale e i segnali dei loro ospiti per quanto riguarda i funghi patogeni.

Il modo in cui questi segnali vengono trasportati all'interno sono comuni a quelli delle altre cellule eucariotiche e prevedono in alcuni casi l'attivazione della trasduzione del segnale come le proteine G, il cAMP e le protein-chinasi spesso intercomunicanti e interdipendenti tra di loro.

### **1.10 Le proteine G nei funghi.**

Nei funghi sono stati caratterizzati i recettori dei feromoni associati alle proteine G in *S. cerevisiae* (Ste2 e Ste3) in *Ustilago maydis* (Umpra1 e Umpra2) e *Ustilago hordei* (Uhpra1 e Uhpra2) (Nakayama et al., 1985, Hagen et al., 1986 Bolker et al., 1992, Anderson et al., 1999, Fowler et al., 1999). Il recettore della somatostatina SSTR2 di topo può essere accoppiato a una proteina G di lievito e può attivare la via di risposta al feromone (Price et al., 1995, Fowler et al., 1999) dimostrando una sovrapposizione

delle vie del segnale e una notevole flessibilità nell'interazione dei recettori associati alle proteine G e alle proteine  $G\alpha$ , capaci di ricevere segnali da diverse fonti e attivare un'unica via di trasduzione del segnale e/o ricevere segnali da un recettore comune e attivare una singola via di trasduzione del segnale. Alcuni studi suggeriscono un modello di attivazione della proteina eterotrimerica G che non richiede una diretta interazione con il recettore di membrana. Takesono e colleghi (1999) hanno messo a punto un sistema di espressione basato sulla risposta al feromone in *S. cerevisiae* per rilevare gli AGS (Attivatori della trasduzione del Segnale legata alla proteina G) in assenza di recettori. Sono state identificate AGS1, una proteina G legata a Ras, la cui funzione è quella di facilitare il passaggio da GDP a GTP su  $G\alpha$ , AGS2 e AGS3 che legano le subunità della proteina G.

Le subunità  $G\alpha$  sono state isolate in diversi organismi fungini usando sonde eterologhe oppure usando primer degenerati, disegnati sulle regioni altamente conservate delle sequenze della subunità  $\alpha$  delle proteine G. Queste subunità  $\alpha$  sono state classificate in tre gruppi seguendo l'albero filogenetico generato dagli allineamenti delle sequenze delle diverse proteine G di un singolo organismo (Bolker, 1998): il gruppo I comprende tutte le subunità  $\alpha$  omologhe alla subunità  $G\alpha_i$  dei mammiferi che inibisce l'adenilato ciclasi (Turner and Borkovich, 1993) e sono miristilate al N-terminale il che spiega la loro capacità di rimanere associate alla membrana dopo il rilascio del dimero  $\beta\gamma$  e posseggono un sito di ribosilazione dell'ADP al C-terminale (Simon et al., 1991). Alcuni membri di questo gruppo I possono abbassare i livelli di cAMP, ma i meccanismi di come questo avvenga sono ancora sconosciuti (Bolker, 1998). Fanno parte del gruppo I Gpa1 di *S. cerevisiae* (Miyajima et al., 1987), Gna-1 di *Neurospora crassa* (Turner and Borkovich, 1993), FadA di *Aspergillus nidulans* (Yu et al., 1996), MagB di *Maganporthe grisea* (Liu and Dean, 1997), Gpa1 di *Ustilago maydis* (Regenfelder et al., 1997), Cpg-1 di *Criphonectria parasitica* (Choi et al., 1995) e Tga1 di *T. harzianum* (Rocha-Ramirez et al., 2002). I membri del gruppo II mancano del sito

per la ribosilazione e non sono stati ancora identificati i loro effettori. Fanno parte di questo gruppo MagC di *M. grisea* (Liu and Dea, 1997), Gpa2 di *Schizosaccharomyces pombe* (Obara et al., 1991), Gpa2 di *U. maydis* (Regenfelder et al., 1997). Il gruppo III delle proteine G fungine influisce positivamente sui livelli di cAMP e sull'attività dell'adenilato ciclasi come le subunità  $G\alpha_s$  dei mammiferi. Fanno parte di questo gruppo Gpa2 di *S. cerevisiae* (Nakafuku et al., 1988) Fil1 di *U. hordei* (Lichter and Mills 1997), Cpg-2 di *C. parasitica* (Choi et al., 1995) e Gna-3 di *N. crassa* (Kays et al., 2000).

Per studiare la funzione della subunità  $G\alpha$  nelle diverse vie di trasduzione del segnale nei funghi sono stati generati ceppi mancanti di questa subunità tramite la distruzione genica mirata. In diversi funghi patogeni è stato trovato che le proteine  $G\alpha$  hanno un ruolo fondamentale nei processi di riconoscimento, di virulenza e nei processi di sviluppo coinvolti nella virulenza come la formazione delle strutture di infezione, come è stato dimostrato per MagA di *M. grisea*, Gpa3 di *U. maydis* e Cpg1 di *C. parasitica* (Liu and Dean, 1997; Regenfelder et al., 1997). Inoltre è stato dimostrato che Cpg1 in *C. parasitica* regola l'espressione di una cellobioidrolasi I, una putativa CWDE (Wang and Nuss, 1995; Chen et al., 1996). Le subunità  $G\alpha$  fungine attivano sia la via di trasduzione del segnale che passa per le adenilato ciclasi che per le MAP chinasi, anche se per molti dei componenti coinvolti in tale evento non è ancora nota la via specifica a cui partecipano.

In *C. parasitica* sono stati isolati inoltre il gene per la subunità  $\beta$  della proteina G (Cpgb1) e il gene di un altro componente coinvolto nella trasduzione del segnale di una proteina G, *bdm1*. I ceppi in cui è stata ottenuta la distruzione del gene *cpgb1* mostrano un incremento della crescita vegetativa ma una ridotta virulenza (Kasahara and Nuss, 1997), mentre il gene *bdm1* è coinvolto nella regolazione delle funzioni della subunità  $G\beta$  e nei processi di virulenza (Kasahara et al., 2000). La subunità  $G\beta$  sono state

caratterizzate anche in *Cryptococcus neoformans* (Wang et al., 2000), *A. nidulans* (Rosen et al., 1999) e *N. crassa* (Ivey et al., 1999 Yang et al., 2002).

### 1.11 Segnale dipendente da cAMP nei funghi.

Nei funghi i segnali dipendenti da cAMP sono coinvolti in molti processi come lo sviluppo sessuale, la virulenza e il monitoraggio delle condizioni nutrizionali e di stress. Le vie dipendenti da cAMP (figura 1.5) sono coinvolte nei processi di trascrizione e nella progressione del ciclo cellulare (Kronstad et al., 1998), inoltre come negli altri eucarioti il cAMP agisce stimolando le PKA (cAMP-dependent-protein kinase), composto da due subunità regolatrici e due catalitiche (Dickman and Yarden, 1999) (figura 1.5).

I geni codificanti per le due subunità catalitiche delle PKA sono state clonate in diversi funghi filamentosi ad esempio *M. grisea* (Mitchell and Dean, 1995), *A. niger* (Bencina et al., 1997), *U. maydis* (Dürrenberger et al 1998) e *N. crassa* (Neurospora database). Le subunità regolatrici sono state clonate in *N. crassa* (Bruno et al., 1996), *U. maydis* (Gold et al., 1997) e *Colletotrichum trifolii* (Yang and Dickman, 1999). Nei funghi fitopatogeni le PKA sono coinvolte nella morfogenesi, nella crescita e nella virulenza, infatti la distruzione del gene codificante per CPKA (codificante per la subunità catalitica di una PKA) in *M. grisea* provoca l'incapacità di formare l'appressorio e di penetrare i tessuti dell'ospite, ma questi mutanti sono ancora capaci di invadere i tessuti dell'ospite se l'infezione è indotta con l'abrasione della superficie fogliare o con l'iniezione (Xu et al., 1997). Studi successivi su questo organismo hanno dimostrato che la formazione dell'appressorio dipende sia da cAMP che da MAP chinasi PMK1; in *U. maydis* (figura 1.5) l'adenilato ciclasi (Uac1), il cAMP e la subunità regolatrice di PKA (Ubc1) regolano il cambiamento dimorfico durante le risposte di compatibilità sessuale, la citochinesi, la selezione del sito di gemmazione e la formazione delle galle (Gold et

al., 1997), inoltre Dürrenberger e colleghi (1998) hanno dimostrato il coinvolgimento della principale subunità catalitica di PKA (Adr1) per la virulenza di *U. maydis*, inoltre è noto che in questo patogeno la trasduzione del segnale dipendente da cAMP regola la morfologia cellulare e ha un ruolo principale durante lo sviluppo della malattia (Muller et al., 2003b). Infatti ceppi difettivi per questa via di trasduzione del segnale Gpa3 o l'adenilil ciclasi Uac1, perdono la patogenicità e non riescono a differenziare ife conidiogene.

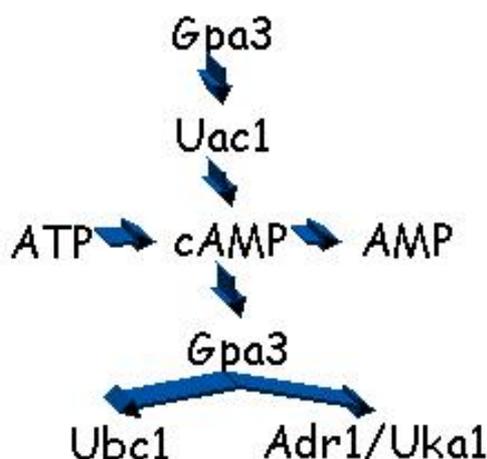


Figura 1.5: la via del cAMP in *Ustilago maydis*

In *C. parasitica* è stato dimostrato che le alterazioni nella via di trasduzione del segnale dipendente dal cAMP diminuisce la capacità di causare il cancro della corteccia del castagno (Gao and Nuss, 1996), suggerendo che questa via potrebbe essere coinvolta nella virulenza di questo fungo. In *N. crassa* la via dipendente da PKA regola la polarità della crescita (Dickman and Yarden, 1999), mentre in *A. niger* la subunità catalitica di

PKA regola la morfologia della colonia e la sporulazione (Benzina et al., 1997). In *T. reesei* Sestak e Farkas (1993) hanno dimostrato che il cAMP agisce come effettore positivo dell'induzione di un'endoglucanasi aumentando l'efficacia dell'induzione, inoltre è stato dimostrato che in *T. harzianum* il cAMP incrementa la capacità di avvolgere le ife del patogeno (Omero et al., 1999).

Lo studio della trasduzione del segnale nei funghi dimostra che esiste una interazione tra il cAMP e le MAPK coinvolte nella virulenza, compatibilità sessuale, morfogenesi e risposta agli stress (Kronstad et al., 1998). In *S. cerevisiae* la trasduzione del segnale attraverso la proteina G Ras2 attiva sia la via delle cAMP che delle MAPK per influenzare la crescita filamentosa (Kronstad et al., 1999); inoltre nei mutanti di *M. grisea* per la MAPK Pmk1 il cAMP è capace di ristabilire le fasi iniziali della formazione dell'appressorio (Xu and Hamer 1996). In *U. maydis* come in *M. grisea* il cAMP e le MAPK regolano la crescita filamentosa e la patogenicità (Mayorga and Gold, 1999; Müller et al., 1999).

### **1.12 Mitogen activated protein kinase (MAPK) nei funghi.**

La reazione a cascata delle MAPK è conservata in tutti gli eucarioti ed ha un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione genica e nelle attività citoplasmatiche. È normalmente organizzata in tre protein-chinasi: una MAPK, un attivatore della MAPK (MEK, MKK o MAPK chinasi) e un attivatore del MEK (MEK=MEKK o MAPK chinasi chinasi) (Figura 1.6).

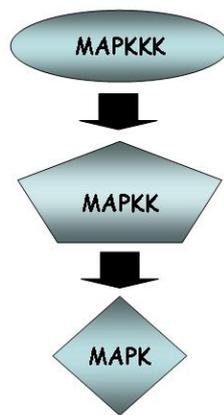


Figura 1.6: cascata delle proteine MAPK.

La trasmissione del segnale avviene per attivazione sequenziale di queste chinasi attraverso la fosforilazione (Banuett, 1998; Schaeffer and Weber, 1999). In *S. cerevisiae*, esistono 6 MAP chinasi che condividono una elevata omologia di sequenza tra loro e con MAP chinasi di mammifero. Cinque di queste sono già state associate a specifiche risposte legate alla compatibilità sessuale (MAPK=Fus3), al dimorfismo (MAPK=Kss1), alle risposte da stress osmotico (MAPK1=Hog1), al rimodellamento della parete cellulare (MAPK=Mpk1) e alla sporulazione (MAPK=Smk1). Alcune cascate MAPKKK-MAPKK-MAPK hanno in comune alcuni componenti, come Ste11 (=MAPKKK) che è condiviso da 3 moduli di MAPK che rispondono rispettivamente ai feromoni (**Ste11**-Ste7-Fus3), a condizioni di elevata osmolarità (**Ste11**-Pbs2-Hog1) e nelle risposte di crescita invasiva nell'ospite (**Ste11**-Ste7-Kss1) (Madhani and Fink, 1998). La specificità viene raggiunta attraverso la formazione di complessi multiproteici (per esempio mediante proteine di *scaffold* come Ste5) che sono specifiche per ogni via oppure, usando proteine di ancoramento, indirizzano i loro partners di legame verso specifici substrati o compartimenti subcellulari (Madhani and Fink, 1998; Whitmarsh

and Davis, 1998; Atienza et al., 2000).

L'esempio dei moduli di MAP chinasi nei funghi filamentosi sono relativamente pochi, comunque la loro importanza per l'accoppiamento e la virulenza in alcuni funghi fitopatogeni sono state descritte e gli esempi selezionati sono riportati di seguito. Le vie delle MAPK di *U. maydis* sono abbastanza ben caratterizzate e un modulo di MAPK è stato descritto da Muller e collaboratori (2003a), questo modulo consiste di Kpp4 (MAPKKK), Fuz7 (MAPKK) e Kpp2 (MAPK) che trasmettono il segnale del feromone al fattore di trascrizione Prf1. La delezione di *kpp2*, *fuz7* o di *kpp4* risulta nella mancata formazione del tubetto di coniugazione e nell'attenuazione della compatibilità. I mutanti  $\Delta fuz7$  e  $\Delta kpp4$  esibiscono un blocco completo dello sviluppo patogenico, mentre i mutanti  $\Delta kpp2$  mantengono un residuo potenziale patogenico (figura 1.7).

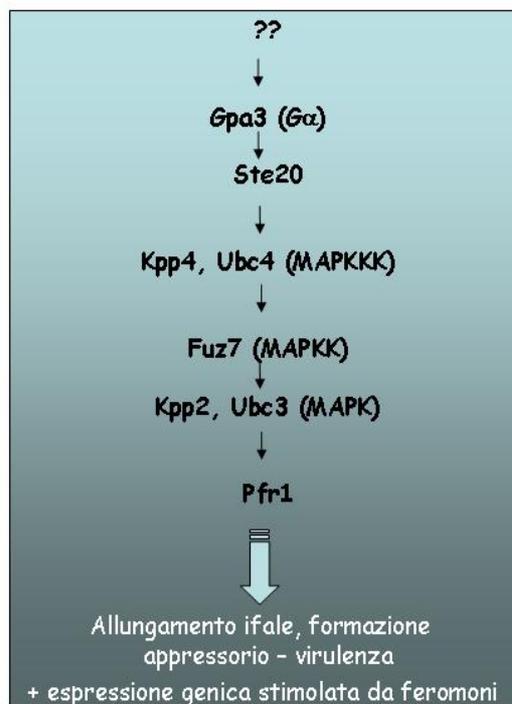


Figura 1.7: via di attivazione della virulenza mediata da MAPK nel fungo fitopatogeno *U. maydis*.

In *M. grisea*, 2 vie MAP chinasiche (Pmk1 e Mps1) hanno un ruolo fondamentale nella patogenicità; Pmk1 (relativa a Fus 3 di *S. cerevisiae* e a Kpp2/Ubc3 di *U. maydis*) è essenziale per la formazione dell'appressorio (in concomitanza con la via del cAMP, vedi sopra) e la crescita invasiva nelle piante, ma non ha effetto sullo sviluppo e sull'accoppiamento; mentre Mps1 (relativo a Mpk1 di *S. cerevisiae*) è richiesto per la penetrazione delle piante con una funzione regolativa del rimodellamento e della polarità della parete cellulare. I mutanti  $\Delta pms1$  non riescono a penetrare la cuticola vegetale, benché riescano ancora a generare la pressione di turgore e ad attivare le risposte difensive della pianta (Xu and Hamer, 1996; Xu et al., 1998). Un terzo gene (*osm1*) che codifica per una MAP chinasi è stato recentemente identificato in *M. grisea* ed è funzionalmente correlato con *HOG1* di *S. cerevisiae*. *Osm1* non regola il turgore dell'appressorio ma sembra giocare un ruolo nella morfogenesi dell'appressorio stesso (Dixon et al., 1999).

Usando uno screening basato sulla PCR con primer degenerati, Takano e collaboratori (2000) hanno isolato una MAP chinasi da *Colletotrichum lagenarium* che è anche responsabile della formazione dell'appressorio e della patogenicità su le foglie di cetriolo e che potrebbe complementare la formazione di strutture di infezione in un mutante *pmk1* di *M. grisea*. Ciò lascia pensare che potrebbe esistere una via generale nella trasduzione del segnale che porta alla formazione di strutture di infezione fungine. Recentemente, lo stesso gruppo di ricerca ha isolato un secondo gene (*maf1*) che codifica per una MAP chinasi che mostra il 91% di identità con Mps1 di *M. grisea*, essenziale per il differenziamento dell'appressorio e per la patogenicità (Kojima et al., 2002). Da *Cochliobolus heterostrophus*, un patogeno del mais, è stata isolata la MAP chinasi Chk1 seguendo lo stesso approccio molecolare sopra indicato. I mutanti  $\Delta chk1$  non formano conidi in normali condizioni, sono incapaci di formare appressorio, hanno una ridotta capacità di infettare le foglie di mais e sono difettivi nel riconoscimento

della compatibilità sessuale quando entrambi i partner mancano di una copia funzionante del gene *chk1* (Lev et al., 1999). Lev e Horwitz (2003) hanno dimostrato che la MAP chinasi Chk1 regola l'espressione di una cellobioidrolase Cbh7 e dell'endoglucanase Eg6, come la MAPK Kss1 di *S. cerevisiae* che regola l'espressione dell'endoglucanase Pgu1 coinvolta nei meccanismi di invasione dei tessuti di pianta e la MAPK Fmk1i del fungo patogeno *F. oxysporum* che è determinante per la patogenicità del fungo e regola l'espressione della pectatoliasi Pl1. Da *B. cinerea* è stato isolato il gene *bmp1* codificante per una MAP chinasi, necessario per la patogenesi ed altamente omologo a Pmk1 di *M. grisea* (Zheng et al., 2000), in *Fusarium spp.*, un fungo filogeneticamente vicino a *Trichoderma*, sono state isolate e caratterizzate molte MAP chinasi. Li e collaboratori (1997), hanno clonato una MAP chinasi (FsMAPK) da *F. solani* f.sp *pisi* T8 e Di Pietro e colleghi (2001) hanno isolato Fmk1, una MAP chinasi essenziale per la patogenicità di *F. oxysporum* che appartiene alla stessa subfamiglia di Fus3 (*S. cerevisiae*) e Pmk1 (*M. grisea*).

Il quadro generale che emerge sembra indicare che nei funghi fitopatogeni siano altamente conservate le vie del segnale delle MAPK che, come quella rappresentata da Pmk1, regolano la virulenza, la formazione delle strutture di infezione e la produzione degli enzimi degradativi della parete cellulare.

### **1.13 Le strategie generali della patogenicità fungina.**

Le vie di trasduzione del segnale, che regolano tutte le funzioni relative alla patogenicità, nei funghi patogeni delle piante, degli umani e degli animali, sono altamente conservate. Nel basidiomicete *Cryptococcus neoformans* la subunità G $\beta$  Gpb1 e la subunità G $\alpha$  Gpa1 agiscono su due diverse vie di trasduzione del segnale: una (Gpb1) si attiva in risposta ai feromoni e regola la riproduzione sessuale e la sporulazione attraverso una cascata MAP chinasica, l'altra (Gpa1) viene attivata dalla

presenza dei nutrienti e regola la riproduzione sessuale, la virulenza e la patogenicità attraverso la via del cAMP (Alspaugh et al., 1998; Wang et al., 2000). In *C. albicans* il cAMP è coinvolto nel il passaggio dimorfico da lievito a micelio, indotto da diversi segnali quali il siero e la presenza dei macrofagi (Niimi, 1996) e in *A. fumigatus* l'attivazione della via di trasduzione del segnale dipendente da cAMP-PKA è essenziale per la patogenicità (Liebmann et al., 2004). E' interessante osservare un parallelismo tra le vie di regolazione della virulenza fungina nei patogeni delle piante come *C. parasitica*, *U. maydis*, *M. grisea* e *C. trifolii* in cui lo sviluppo dell'appressorio o la colonizzazione dei tessuti delle piante coinvolge elementi MAPK comuni alla risposta a feromoni in *S. cerevisiae* così come gli elementi della via Ras-adenilato ciclasi e le proteine G. Il fatto che diversi gruppi fungini attivino elementi simili della trasduzione del segnale per regolare la virulenza lascia supporre una conservazione delle funzioni nelle vie del cAMP e delle MAPK.

#### **1.14 Trasduzione del segnale nel genere *Trichoderma*.**

Il micoparassitismo è un'interazione ospite-specifica e non una semplice risposta di contatto (Dennis and Webster, 1991), per cui i segnali provenienti dal fungo ospite sono riconosciuti da *Trichoderma* e inducono la risposta antifungina. È stato dimostrato che le lectine presenti sulla parete cellulare del fungo fitopatogeno *S. rolfisii* sono alcuni dei segnali di riconoscimento che inducono sia l'avvolgimento delle ife, "coiling", sia la secrezione di sostanze di adesione coinvolte nell'interazione tra *Trichoderma* e il suo ospite (Inbar and Chet, 1992, Inbar and Chet, 1994). L'evento di riconoscimento mediato dall'interazione lectine-carboidrati agisce come segnale per innescare cambiamenti morfologici, riarrangiamento del citoscheletro, la divisione nucleare e la secrezione di antibiotici ed enzimi idrolitici tipici di una risposta parassitaria (Inbar and Chet, 1995). Inbar e Chet (1992,1995) hanno dimostrato, mediante l'uso di

membrane di nylon coperte con le lectine di *S. rolfisii* per mimare la presenza dell'ospite, che l'espressione di enzimi chitinolitici in *T. harzianum* è indotta dal riconoscimento delle lectine dell'ospite. Zeilinger e colleghi (1999) hanno studiato l'espressione dei geni *ech42* e *nag1* durante l'interazione micoparassitica di *T. harzianum* e *R. solani* usando il sistema reporter non citotossico della GFP (green fluorescent protein) e hanno dimostrato che l'espressione del gene *ech42* ma non di *nag1* avviene prima del contatto fisico tra il *Trichoderma* e il suo ospite. Inoltre l'espressione di *ech42* viene indotta se tra i due funghi è interposta una membrana di cellophane mentre non si ha attivazione del gene se tra i due microrganismi è interposta una membrana da dialisi (Cortes et al., 1998) poiché il cellophane e non la membrana da dialisi è permeabile alle proteine ad alto peso molecolare (fino a 100 kDa) (Kullnig et al., 2000).

Contrariamente a quanto è noto sui fattori coinvolti nel micoparassitismo, la conoscenza dei meccanismi che regolano la trasduzione del segnale in *Trichoderma* è poco approfondita. Al momento è stata studiata la proteina di *T. atroviride* Tga1 del gruppo I coinvolta nel "coiling", nella produzione di metaboliti antifungini, nella regolazione dell'espressione di chitinasi e nella produzione dei conidi indotta dalla luce (Reithner et al., 2004, Rocha-Ramirez et al., 2002). In *T. virens* è stata caratterizzata la proteina TgaA coinvolta nell'antagonismo contro *S. rolfisii* ma non contro *R. solani*. Dagli studi fino ad ora effettuati sembra che le subunità  $\alpha$  delle proteine G dei differenti gruppi svolgono una differente funzione. Sempre in *T. virens* è stata studiata la proteina TgaB, delle proteine G del II gruppo che non ha un ruolo specifico nello sviluppo e nel micoparassitismo (Mukherjee et al., 2004). Oltre alle proteine G sono state studiate anche le MAP (Mitogen-Activated Protein) chinasi come la proteina TmkA di *T. virens* che risulta essere coinvolta nell'attività di biocontrollo. Infatti i mutanti difettivi per questa proteina mostrano una ridotta capacità di controllare *S. rolfisii* e incapacità di attaccare gli sclerozi (Mukherjee et al., 2003). Inoltre Klemsdal e colleghi (1996) hanno

isolato il gene di una proteina 14-3-3 in *T. atroviride* ceppo P1 appartenente a una famiglia di regolatori chinasi caratterizzata originariamente nei tessuti cerebrali di mammifero. Vasara e colleghi (2002) hanno studiato in *T. reesei* due isoforme diverse di 14-3-3 Ftt1 e Ftt2 coinvolte nel traffico vescicolare che prelude la secrezione enzimatica.

### **1.15 Scopo della tesi**

Il paragone tra i diversi passaggi coinvolti nel processo di micoparassitismo in *Trichoderma* e i meccanismi di attacco dei funghi fitopatogeni quali il riconoscimento dell'ospite, lo sviluppo morfologico e la secrezione di idrolasi, lascia supporre che le stesse vie di trasduzione del segnale attivate nei processi di patogenicità possano essere presenti anche in questo microrganismo agente di biocontrollo.

L'obiettivo di questo lavoro è di isolare alcuni dei geni i cui prodotti sono coinvolti nella trasduzione del segnale attivata durante il micoparassitismo, creare e caratterizzare mediante analisi genomica, proteomica e fisiologica, mutanti difettivi di *T. atroviride* per i geni isolati, al fine di studiarne il coinvolgimento nei meccanismi di biocontrollo.

In particolare è stato studiato e caratterizzato il gene codificante per la subunità  $\alpha$  di una proteina G del III gruppo.

## **2 Materiali e Metodi**

### **2.1 Ceppi e condizioni di crescita**

I ceppi usati in questo lavoro di tesi sono stati trattati in condizioni di sterilità, i substrati utilizzati sono stati sterilizzati a 120 °C a 1 atm per 20 minuti, tranne quelli filtro-sterilizzati con filtri da 0.45 µM dove è specificato.

#### **2.1.1 Batteri**

E' stato usato *Escherichia coli* JM 109 (Yanisch-Perron et al., 1985) per le amplificazioni plasmidiche. Questo ceppo è stato cresciuto in terreno liquido LB (Luria Bertani) in agitazione a 150 rpm a 37 °C o su terreno solido LB Agar a 37 °C in presenza di ampicillina 100 µg/ml. Le cellule competenti di questo ceppo sono state trasformate con il protocollo dello shock termico come descritto da Sambrook e colleghi (1989).

Il ceppo *E. coli* ER1647 (Novagen, Madison Wis.) è stato usato per analizzare la libreria genomica Blue Star (Novagen). Il ceppo di *E. coli* BM25.8 (Novagen), lisogenico per i fagi, è usato per il subclonaggio automatico dei frammenti di DNA genomico presenti nella libreria fagica. I ceppi ER1647 e BM25.8 sono stati cresciuti come descritto da Zeilinger e collaboratori (2001).

#### **2.1.2 Funghi**

Il ceppo P1 di *Trichoderma atroviride* (*T. "harzianum"* ATCC 74058; Kulling et al., 2001) è stato fatto crescere su terreno solido PDA (potato dextrose agar); i conidi sono stati raccolti dopo 7 giorni a 28 °C con acqua distillata e 0.1% Tween-20. Per la trasformazione fungina è stato usato PDA con 200 µg/ml di igromicina B come mezzo

selettivo. Per vedere gli effetti del cAMP esogeno, questo composto è stato aggiunto (2, 5 e 10 mM) al PDA autoclavato e raffreddato a 48 °C.

Una sospensione di  $8 \times 10^8$  conidi/ml di *T. atroviride* è stata fatta crescere in 200 ml di SM 1X per 36 ore a 28°C in un agitatore rotante a 120 rpm, (Salt Medium 1X pH 6.6 costituito da:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  680 mg/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  870 mg/l, KCl 200 mg/l,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1000 mg/l,  $\text{CaCl}_2$  200 mg/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  200 mg/l,  $\text{FeSO}_4$  2 mg/l,  $\text{MnSO}_4$  2 mg/l,  $\text{ZnSO}_4$  2 mg/l, glicerolo 1% (v/v)) dalla quale è stato poi effettuato il prelievo della biomassa (replacement) per le successive analisi. Il micelio ottenuto, è stato raccolto con carta Miracloth, lavato con acqua sterile distillata con grado di purezza Milli-Q e poi cresciuto a 28°C su un agitatore rotante a 120 rpm in SM 1X con diverse sorgenti di carbonio a seconda delle condizioni. Al fine di indurre gli enzimi chitinolitici è stata usata come sorgente di carbonio la chitina colloidale 1% (p/v) o la 1% N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina 1% (p/v) e le analisi enzimatiche sono state effettuate dopo 3h, 5h, 10h 12h 36h e 48h dall'inoculo. Per l'analisi del proteoma il micelio è stato cresciuto in SM 1X a cui è stato aggiunto l'1% (p/v) di Biomassa (BM) di *Rhizoctonia solani* (p/v) o nel filtrato colturale (FC) di *R. solani*. L'incubazione è stata fermata a 96h dall'inoculo e la biomassa ottenuta è stata raccolta con carta Miracloth e suddivisa in aliquote da 1 grammo, mentre i filtrati colturali sono stati separati da micelio e conidi residui con filtri da 0.45  $\mu\text{M}$ . I miceli e i filtrati colturali sono stati conservati a -40°C fino al loro utilizzo. Il fungo patogeno *R. solani*, usato in questo esperimento, è stato fatto crescere per 7 giorni in terreno SM 1X con saccarosio 1% (p/v) in agitazione a 120 rpm a 25 °C, successivamente il micelio è stato raccolto con carta Miracloth, lavato abbondantemente con acqua sterile grado Milli-Q e sterilizzato prima dell'utilizzo, mentre il filtrato colturale raccolto è stato filtro-sterilizzato.

Per quanto riguarda le condizioni di crescita dell'interazione a tre antagonista-pianta-patogeno è stato messo a punto un nuovo sistema in coltura solida. Semi di pomodoro sono stati sterilizzati per 2 minuti in una soluzione di 1% di ipoclorito di sodio, poi

lavati abbondantemente con acqua sterile grado Milli-Q e lasciati ad asciugare sotto cappa a flusso laminare per tutta la notte. I semi sterilizzati sono stati posti sui margini di piastre petri di 1.5% p/v WA (water agar) da 15 cm di diametro, ricoperte con fogli di alluminio e disposte verticalmente, per simulare una condizione simile a quella *in vivo* (geotropismo). Avvenuta la germinazione, le piastre di WA sono state parzialmente scoperte e opportunamente incise per permettere l'uscita delle foglie cotiledonari (fototropismo).



Figura 2.1: piastra di WA inoculata con semi di pomodoro infettati con *R. solani*.

Il saggio con il patogeno terricolo è stato effettuato ponendo rettangoli (1.5 x 1 cm) di terreno solido PDA invasi dal micelio di *R. solani* sulle piastre di WA contenenti le radici delle piantine di pomodoro cresciute per circa 20 giorni. Il fungo è stato fatto crescere per 48h, in modo da avere l'invasione completa di tutta la piastra. Contemporaneamente, su dischi di cellophane, sterilizzati e posti su piastre Petri di 15 cm di PDA, sono stati inoculati 30  $\mu$ l di una sospensione di  $8 \times 10^8$  conidi/ml di *T. atroviride* spp e lasciati crescere per 48h a 28°C. Successivamente, i dischi di cellophane sono stati posti sulle piastre di WA, contenenti le piantine di pomodoro e il patogeno precedentemente inoculati (figura 2.2).



Figura 2.2: piastra di WA inoculata con pomodoro, *R. solani* e *T. atroviride*.

Dopo 96h il micelio del micoparassita è stato raccolto con una spatola, suddiviso in aliquote da 1 grammo e conservate a - 40°C fino al suo utilizzo.

## 2.2 Manipolazione degli acidi nucleici

Il DNA plasmidico è stato isolato dai diversi isolati batterici (JM109, BM25.8) come descritto da Sambrook e collaboratori (1989). Il DNA fungino è stato estratto seguendo il protocollo di Gruber e collaboratori (1990) e l'analisi Southern effettuata su 10 µg di DNA genomica di *T. atroviride* (isolati P1,  $\Delta tmk1$  e  $\Delta tga3$ ) è stata realizzata come descritto da Sambrook e collaboratori (1989). Il DNA genomico, isolato per l'analisi Southern, è stato digerito con l'enzima BamHI che taglia dentro la cassetta di distruzione. L'estrazione dell'RNA totale, effettuata utilizzando 500 mg di micelio di *T.*

*atroviride* (isolati P1 e  $\Delta tga3$ ) allevato in diverse condizioni culturali e la successiva analisi Northern per valutare l'espressione dei geni *tga3*, *tgb1*, *tmk1*, *ech42*, *nag1* e di *act1*, sono state effettuate come descritto da Peterbauer e collaboratori (1996). Le ibridazioni sono state eseguite con sonde radioattive, costruite a partire da prodotti di PCR e contenenti buona parte dell'ORF dei geni analizzati. Per l'analisi dell'espressione dei geni della chitinasi sono stati usati come sonde: un frammento di 1.9 Kb *Sall/XbaI* del gene *nag1*, un frammento di 1.0 Kb *PstI* di *ech42* e un frammento di 1.9 Kb *KpnI* di *act1*. Per l'analisi dell'espressione dei geni della trasduzione del segnale sono stati utilizzati come sonde: un frammento di 1.2 Kb del gene *tgb1*, un frammento di 1.1 Kb del gene *tmk1* e un frammento di 1.0 Kb del gene *tga3*.

### **2.3 Clonaggio dei frammenti dei geni *tgb1*, *tmk1*, *tmk3* e *tga3***

I frammenti dei geni *tgb1*, *tmk1*, *tmk3* e *tga3* sono stati ottenuti mediante PCR su DNA genomico usando primer (inneschi) degenerati disegnati sulle regioni conservate delle rispettive proteine di funghi fitopatogeni. I primer degenerati sono riportati in tabella 2.1.

Tabella 2.1: primer degenerati impiegati per la PCR.

Gene	primer Forward (F)/Reverse (R)	lunghezza del frammento ottenuto
<i>tgb1</i>	CANRMTACTYGACGRSCWTA/ TAWSGCMCAWACRMTYAGC	1200 bp
<i>tmk3</i>	TNSAGMAGTGWCTCGAYGA/ AGTCNTGAGSTAGAGCTWRA	1000 bp
<i>tmk1</i>	TNAGATCTAGSTGAWGGYACACNA TSAYARNTACGATWGGATGANRCAG	1100 bp
<i>tga3</i>	GGNGCNGGNGARWSNNGNAA GTRTCNGTNGCNYDNGT	1000
<i>tga3</i>	GGNGCNGGNGARWSNNGNAA/ GTRTCNGTNGCNYDNGT	1000

I prodotti ottenuti sono stati subclonati in pGEM-T (Promega, Medison, WT) e sequenziati. Le sequenze così ottenute sono state usate per analizzare la libreria genomica  $\lambda$  Blue Star di *T. atroviride* P1.

#### 2.4 Clonaggio dei geni *tgb1*, *tmk1*, *tmk3* e *tga3*

Per isolare i geni *tgb1*, *tmk3*, *tmk1* e *tga3* è stata analizzata un'aliquota di libreria genomica di *T. atroviride*, costruita con il sistema  $\lambda$ Blue Star vector system (Novagen), e utilizzando come sonde i prodotti di PCR dei singoli geni. La realizzazione e l'analisi della libreria è stata effettuata seguendo le istruzioni della casa produttrice. I fagi  $\lambda$  contenenti l'intero genoma di *T. atroviride* sono stati messi in contatto con le cellule

batteriche ospite del ceppo ER1647 e circa 40000 pfu sono state analizzate con ciascuna sonda descritta precedentemente. Le placche di lisi, formatesi dopo incubazione O/N a 37°C in terreno solido LB, sono state trasferite su una membrana di nylon che, previa denaturazione e neutralizzazione, sono state messe in contatto con una soluzione di ibridazione, contenente la sonda del gene cercato, marcata con P<sup>32</sup> radioattivo. Le placche di lisi, che hanno dato segnale d'ibridazione positivo (dopo sviluppo su lastra autoradiografica), sono state isolate e riutilizzate in un altro ciclo di infezione-lisi-sviluppo, in modo da ottenere una popolazione fagica omogenea contenente solo il frammento genico cercato. I vettori  $\lambda$  selezionati sono stati subclonati nel sito CRE del plasmide pBlueSTAR in modo da contenere solo il frammento genico di *T. atroviride* di interesse. I plasmidi pBlue Star, così isolati, sono stati tagliati con l'enzima *NotI* per liberare gli inserti, successivamente, è stata effettuata un'analisi Southern per accertarsi dell'avvenuta inserzione del frammento. Gli inserti dei plasmidi, risultati positivi, sono stati sequenziati mediante il "primer walking".

## **2.5 Costruzione di vettori per la distruzione genica mirata**

Un frammento di 1.0 kb del promotore e un frammento di 1.2 kb del terminatore del gene *tmk1* sono stati amplificati mediante PCR, usando il DNA genomico di *T. atroviride* ceppo P1 ed i primer *ptmk1(F)/HindIII* e *ptmk1(R)/XbaI* per amplificare il promotore ed i primer *ttmk1(F)/StuI* e *ttmk1(R)/BgIII* per amplificare il terminatore (tabella 2.2). I rispettivi frammenti di PCR sono stati purificati (QIAquick GEL Extraction Kit; Qiagen, Hilden, Germany) e clonati nel plasmide pGEM-T (Promega, Madison, Wi). Il DNA delle colonie contenenti il costrutto pGEM-T::*tmk1* è stato digerito con *StuI/BgIII* e il risultante frammento *tmk1* è stato clonato nel sito *StuI/BgIII* del vettore pAN7-1 (Punt et al., 1987). Il DNA delle colonie contenenti il costrutto pGEM-T::*ptmk1* è stato digerito con *HindIII/XbaI* e il risultante frammento *ptmk1* è

stato clonato nel sito *HindIII/XbaI* del vettore pAN7-1::*ttmk1* (7,956 bp). Per confermare l'inserzione del frammento *ptmk1* il vettore risultante pAN7-1::*ttmk1::ptmk1* (9.156 bp) è stato digerito con diverse combinazioni di enzimi di restrizione.

Un frammento di 1.4 kb del promotore e un frammento di 1.3 kb del terminatore del gene *tga3* sono stati amplificati con la PCR usando il DNA genomico di *T. atroviride* ceppo P1 con i primer *ptga3(F)/HindIII* e *ptga3(R)/XbaI* per amplificare il promotore e i primer *ttga3(F)/StuI* e *ttga3(R)/BglIII* per amplificare il terminatore (tabella 2.2).

I rispettivi frammenti di PCR sono stati purificati (QIAquick GEL Extraction Kit; Qiagen, Hilden, Germany) e clonati nel plasmide pGEM-T (Promega, Madison,Wi). Il DNA delle colonie contenenti il costrutto pGEM-T::*ptga3* è stato digerito con *HindIII/XbaI* e il risultante frammento *ptga3* è stato clonato nel sito *HindIII/XbaI* del vettore pAN7-1 (Punt et al., 1987). Il DNA derivante dalle colonie contenenti il costrutto pGEM-T::*ttga3* è stato digerito con *StuI/BglIII* e il risultante frammento *ttga3* è stato clonato nel sito *StuI/BglIII* del vettore pAN7-1::*ptga3* (8,156 bp). Per confermare l'inserzione del frammento *ttga3* il vettore risultante pAN7-1::*ptga3::ttga3* (9.456 bp) è stato digerito con diverse combinazioni di enzimi di restrizione.

Un frammento di 1.3 kb del promotore e un frammento di 1.4 kb del terminatore del gene *tgb1* sono stati amplificati con la PCR usando il DNA genomico di *T. atroviride* ceppo P1 con i primer *ptgb1(F)/HindIII* e *ptgb1(R)/XbaI* per amplificare il promotore ed i primer *ttgb1(F)/StuI* e *ttgb1(R)/BglIII* per amplificare il terminatore (tabella 2.2). I rispettivi frammenti di PCR sono stati purificati (QIAquick GEL Extraction Kit; Qiagen, Hilden, Germany) e clonati nel plasmide pGEM-T (Promega, Madison,Wi). Il DNA delle colonie contenenti il costrutto pGEM-T::*ptgb1* è stato digerito con *HindIII/XbaI* e il risultante frammento *ptgb1* è stato clonato nel sito *HindIII/XbaI* del vettore pAN7-1 (Punt et al 1987). Il DNA derivante dalle colonie contenenti il costrutto pGEM-T::*ttgb1* è stato digerito con *StuI/BglIII* e il risultante frammento *ttgb1* è stato clonato nel sito *StuI/BglIII* del vettore pAN 7-1::*ptgb1* (8,056 bp). Per confermare

l'inserzione del frammento *ttgb1* il vettore risultante pAN7-1::*ptgb1*::*ttgb1* (9.456 bp) è stato digerito con gli enzimi *StuI*/*BglIII*.

Tabella 2.2: primer utilizzati per costruire le cassette di distruzione.

NOMEe	SEQUENZE (5'-3')
ptmk1(F)/ <i>HindIII</i>	ATAAGCTTGGTTTCGTTTCAACAAAAGA
ptmk1(R)/ <i>XbaI</i>	ATTCTAGATCGACTGCCGTTGTGGT
ttmk1(F)/ <i>StuI</i>	TAAGGCTTTACCAAGAGATTATGCGGTA
ttmk1(R)/ <i>BglIII</i>	TAAGATCTACGATTGGATGAAAACAGC
ptga3(F)/ <i>HindIII</i>	AACTTCGAATACGAATTCGAAAT
ptga3(R)/ <i>XbaI</i>	CCTTGGGAATACGGCCTAAATT
ttgb1(F)/ <i>StuI</i>	TTTACCGGATGCAAATTAATTA
ttgb1(R)/ <i>BglIII</i>	ATTCCGAAATCGATTACCAA
ptgb1(F)/ <i>HindIII</i>	TCAAGCTTACCCTGGTACCAATGCAGAAGC
ptgb1(R)/ <i>XbaI</i>	CGAATTCTAGACGGCGGGATCGG
ttgb1(F)/ <i>HindIII</i>	AAGGCCTAACCTATGACACAGACGG
ttgb1(R)/ <i>XbaI</i>	CAAGATCTGAAATCCTGCTTTTCGTGTC

## 2.6 Trasformazione di *T. atroviride*

I vettori ottenuti sono stati linearizzati mediante enzimi di restrizione al fine di facilitare la ricombinazione genica con la copia del gene omologo presente nel ceppo P1 di *T. atroviride*, il vettore pAN7-1-*ttmk1-ptmk1* è stato linearizzato con HindIII/BglII, PAN7-1-*ptgb1-ttgb1* è stato linearizzato con BglII/NarI e il vettore PAN7-1-*ptga3-ttga3* è stato linearizzato con HindIII/BglII. I frammenti sono stati purificati come descritto da Mach e collaboratori (1994).

La trasformazione di *T. atroviride* è stata effettuata utilizzando una soluzione di  $10^8$ /ml conidi germinanti del ceppo P1 incubata con una miscela di enzimi litici, novozym (Sigma) 5 mg/ml, per 3h a 30°C. I protoplasti così ottenuti, dopo essere stati risospesi in soluzioni osmotizzanti, sono stati messi a contatto con 10 µg del costrutto di distruzione genica mirata come descritto da Mach e collaboratori (1994).

## 2.7 Saggi di biocontrollo

I saggi biologici di inibizione della germinazione sono stati condotti su conidi di *B. cinerea* B05.10 come descritto da Lorito e collaboratori (1993). Le miscele utilizzate nei saggi (90 µl), contenevano 500 conidi del fungo bersaglio sospesi in tampone sodio fosfato 30 mM pH 6,8 e nel mezzo PDB. I conidi sono stati inoculati in presenza di 10 µl dei filtrati colturali di *T. atroviride*, mutante o selvatico, cresciuti in diverse condizioni (1% (p/v) di NAG o 1% (p/v) di chitina, come descritto precedentemente). Le miscele sono state incubate in piastre ELISA poste a 25°C in camera di crescita. Le piastre sono state osservate in tempi diversi utilizzando un microscopio invertito per poter così determinare l'effetto delle miscele di proteine sulla germinazione delle conidi e sull'allungamento del tubetto germinativo. Tutti i saggi biologici effettuati

includevano dei controlli costituiti da acqua sterile. Eventuali altri solventi o tamponi sono stati saggiati da soli alla concentrazione finale d'impiego, in modo da escludere un loro effetto sul saggio. La lunghezza delle ife è stata misurata in maniera casuale su almeno 20 ife e la germinazione dei conidi è stata basata sulla conta di almeno 50 conidi per ciascuna delle repliche. Ogni esperimento è stato ripetuto in due giorni separati, almeno con tre repliche per ciascun trattamento. Per ciascun trattamento i dati rappresentati costituiscono le medie tra tutti gli esperimenti effettuati.

Il saggio di confronto è stato effettuato come descritto da Zeilinger e collaboratori (1999) ponendo su piastre Petri di PDA, coperte di cellophane, a una distanza iniziale di 15 mm rettangoli di 5 cm x 1 cm di terreno solido infungato con *T. atroviride* ceppo P1 o *Atga3* e *R. solani*. Il micelio di *T. atroviride* è stato raccolto quando la distanza tra l'antagonista e il patogeno erano rispettivamente di 10 mm, 5 mm e confluenti. Il controllo dell'esperimento è costituito dal *T. atroviride* ceppo P1 cresciuto in assenza del patogeno.

I saggi di biocontrollo sono stati realizzati usando semi di fagiolo (*Phaseolus vulgaris* cv cannellino), sterilizzati superficialmente con ipoclorito di sodio al 1% per 5 minuti, lavati abbondantemente con acqua sterile, lasciati ad asciugare sotto cappa chimica e poi posti in piastre Petri sterili, dove sono stati trattati con i conidi di *T. atroviride*. Alla sospensione di conidi è stata aggiunta una miscela adesiva (Pel gel al 15% (p/v) in acqua) nel rapporto di 1:3, in modo da avere una concentrazione finale di  $10^8$  conidi/ml. Con 1 ml di questa miscela sono stati ricoperti 10 g di semi e lasciati ad asciugare per favorire l'adesione dei conidi ai semi. I semi sono stati messi a dimora nel terreno setacciato, sterilizzato ed inoculato con il micelio del patogeno *R. solani* (ceppo 1556 isolato da pomodoro), cresciuto in coltura liquida per 1 settimana. I controlli sono stati effettuati con i semi di fagiolo non trattati con i conidi di *T. atroviride*, seminati in terreno inoculato con il patogeno. Per verificare l'effetto dei conidi dell'antagonista sulla crescita delle piante i semi di fagiolo trattati con i conidi di *T. atroviride* sono stati

seminati in terreno senza patogeno. Sono state effettuate 4 repliche per ogni condizione ponendo 7 semi per vaso e il saggio è stato ripetuto 3 volte.

La biomassa utilizzata per infettare il terreno è stata raccolta con carta Miracloth lavata con acqua sterile, omogeneizzata ed uniformemente distribuita nel terreno sterile con la dose di 3 g di biomassa per 1 l di terreno. Per i saggi effettuati con la *R. solani*, la valutazione della malattia è stata effettuata a partire dall'ottavo giorno dalla semina, e poi ad intervalli regolari di una settimana, determinando l'altezza delle piantine.

Il ceppo patogeno B05.10 di *B. cinerea* è stato utilizzato per i saggi di biocontrollo. Per ciascun trattamento sono stati messi a dimora 16 semi di fagiolo cv cannellino in una vaschetta contenente circa 3 l di terreno sterile. Dopo 10-15 giorni dalla semina, sono stati effettuati gli inoculi su 2 foglie di una stessa pianta, inoculando ciascuna foglia in almeno due punti differenti. Sono stati utilizzati 15 µl di una sospensione di  $10^6$  conidi/ml di *T. atroviride* e  $10^5$  conidi/ml di *B. cinerea* sospesi in un tampone contenente fosfato di potassio 20 mM e glucosio 20 mM. Sono stati effettuati i controlli solo con i conidi di *T. atroviride* e solo con i conidi di *B. cinerea*. Per ogni condizione gli inoculi sono stati effettuati su due foglie di 4 diverse piante di fagiolo e il saggio è stato ripetuto per 3 volte. I vasi relativi ai diversi trattamenti sono stati coperti con buste di plastica trasparenti per ottenere un microclima saturo di umidità e condizioni favorevoli allo sviluppo della malattia. Le piante sono state mantenute in camere di crescita e sono stati valutati il numero e la dimensione delle macchie necrotiche e clorotiche formatesi sulle foglie.

## **2.8 Saggi enzimatici**

E' stata determinata l'attività chitinasica associata al micelio, dei filtrati colturali e del micelio cresciuto nelle condizioni descritte sopra. L'attività enzimatica associata al micelio è stata determinata utilizzando il mezzo di coltura contenente il micelio, che è

stato rimosso per centrifugazione prima dell'analisi spettrofotometrica. Per determinare l'attività enzimatica intracellulare, il micelio raccolto è stato polverizzato con azoto liquido e risospeso in una soluzione (in rapporto 1,5 (p/v) con il micelio) contenente 0,5 mM DTT (ditiotreitolo), 1mM PMSF (phenyl methyl sulphonyl fluoride SIGMA), 1  $\mu$ M pepstatina A e 0,6  $\mu$ M leupeptina emisulfato. Dopo la sonicazione gli estratti sono stati centrifugati per 20 minuti a 20000g a 4 °C. Il surnatante è stato raccolto e dopo l'aggiunta di glicerolo al 10%, conservato a -20°C. I saggi enzimatici sono stati eseguiti, come descritto da Barman e collaboratori 1993, utilizzando come substrati p-nitrophenyl N-acetil- $\beta$ -D-glucosamide per la determinazione del N-acetylglucosaminidasi e il p-nitrophenyl  $\beta$ -D-N,N''-triacetylchitotriose per la determinazione dell'attività endochitinasica. L'attività enzimatica è relativa alla biomassa determinata con il peso secco del micelio.

## **2.9 Analisi proteomica**

### **2.9.1 Proteine intracellulari**

Per l'estrazione delle proteine intracellulari è stato utilizzato il protocollo descritto da Gorg e collaboratori (2000) con alcune modifiche. Il micelio (1g) è stato macinato in azoto liquido e alla polvere così ottenuta sono stati aggiunti 10 ml di una soluzione (conservata a -20°C) di acido tricloroacetico (TCA) 20% p/v in acetone e 0.2% DTT (ditiotreitolo) aggiunto prima dell'uso. Successivamente, i campioni sono stati centrifugati a 16000g a 4°C per 20 minuti, il pellet è stato lavato per tre volte con acetone (-20°C) contenente 0.2% DTT e asciugato O/N a temperatura ambiente sotto flusso di aria. Il precipitato ottenuto è stato risospeso in 2 ml di buffer di reidratazione (9M urea, 2% CHAPS, 1%DTT, 10mM PMSF) in agitazione a temperatura ambiente per 2h in modo da assicurare la completa solubilizzazione delle proteine. I campioni

sono stati centrifugati a 20000g a 20°C per 30 min, è stato recuperato il surnatante, e conservato in aliquote a -40°C fino al suo utilizzo.

Prima di conservare i campioni una aliquota di ciascun di essi è stata usata per determinare la concentrazione delle proteine totali con il DC protein assay kit (BIO-RAD, Richmond, CA, USA), seguendo le istruzioni della casa produttrice.

### **2.9.2 Proteine esocellulari**

Il filtrato colturale (300 ml), ottenuto dalle diverse condizioni di crescita, è stato liofilizzato, pesato ed una un'aliquota, pari ad un terzo del peso totale, è stata usata per la successiva estrazione, mentre il materiale restante è stato conservato a 4°C. L'aliquota prelevata è stata risospesa in 5 ml di acqua sterile bidistillata, 5mM di PMSF, e dializzata in tubi con cut-off 3500 per 48h contro acqua deionizzata, cambiata a i intervalli di 12 ore. Il dializzato è stato liofilizzato e alla polvere così ottenuta sono stati aggiunti 10 ml di una soluzione (- 20°C) acetone, 20% TCA, 0.2% DTT, mantenuta a - 20°C per tutta la notte per permettere la precipitazione delle proteine. Successivamente, i campioni sono staticentrifugati a 16000g a 4°C per 20 minuti, il pellet è stato lavato per tre volte con acetone (-20°C) contenente 0.2% DTT e asciugato sotto flusso di aria a temperatura ambiente per tutta la notte. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 2 ml di buffer di reidratazione (9M urea, 2% CHAPS, 1%DTT, 10mM PMSF) e posto in agitazione per 2h in modo da assicurare la completa solubilizzazione delle proteine. I campioni sono stati centrifugati a 20000g a 20°C per 30 min, il surnatante è stato recuperato e conservato in aliquote a -40°C fino al suo utilizzo. Una aliquota di ciascun campione è stata usata per determinare la concentrazione delle proteine totali con il DC protein assay kit (BIO-RAD, Richmond, CA, USA), seguendo le istruzioni della casa produttrice.

### 2.9.3 Focalizzazione isoelettrica e SDS PAGE

La IEF (Iso-Elettro-Focusing) è stata realizzata con Immobiline “Dry Strips” (Strip) (IPG, Immobilized pH Gradient), costituite da gel di poliacrilammide polimerizzato su supporto plastico, disidratato e congelato. Le strip lunghe 7 cm con intervallo lineare di pH 3-10 (BIO-RAD, Richmond, CA, USA), sono state scongelate, reidratate per 1h passivamente a temperatura ambiente e per 12h attivamente a 50V in una camera per la focalizzazione con una soluzione contenente 9 M urea, 2% CHAPS, 1% DTT, 2% amfoliti pH 3-10, 10 mM PMSF e 200 µg di proteine totali, in modo che ciascun campione sia assorbito nel gel della strip. La prima dimensione è stata condotta utilizzando il PROTEAN IEF Cell system (BIO-RAD laboratories, Richmond, CA, USA) e le IPGs strip sono state focalizzate (250V per 1h, 4000V per 3h, 4000V fino a raggiungere 10000V/h, per un totale di 15000V/h totali). Dopo la focalizzazione, le IPGs strips sono state equilibrate sotto agitazione in Equilibration Buffer I (6M Urea, 0.05M Tris/HCL pH8.8, 20% glicerolo, 2% SDS, 2% DTT) per 10 minuti su di un agitatore rotante e in Equilibration Buffer II (6M Urea, 0.05M Tris/HCL pH 8.8, 20% glicerolo, 2% SDS, 2.5% iodocetammide) per altri 10 minuti. Le strip, dopo la fase di riduzione ed alchilazione, sono state posizionate su un gel verticale di poliacrilammide (12%T) in un Mini-Protean 3 Cell (BIO-RAD laboratories, Richmond, CA, USA). Per creare continuità tra il margine del gel e quello della strip, sono stati versati 5 ml di agarosio (0,5%) sul gel di poliacrilammide prima della deposizione della strip. I gel sono stati corsi con una corrente costante di 150V per circa 75 minuti. Terminata la corsa, i gel sono stati lavati per 3 volte in acqua Milli-Q per 5 minuti e quindi colorati O/N con SimplyBlue SafeStain G-250 (Invitrogen, California, USA) in agitazione. Successivamente, il colorante è stato rimosso e i gel sono stati decolorati con acqua distillata grado Milli-Q, seguendo il manuale di istruzione.

## 2.9.4 Analisi delle immagini

Al termine della colorazione, per ciascun gel è stata fatta un'acquisizione digitale dell'immagine mediante Imaging Densitometer GS-800 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). L'immagine del gel è stata archiviata utilizzando un filtro rosso (lunghezza 595-750 nm) e una risoluzione di 36.3 X 36.3 microns per i gel piccoli (7 cm). Successivamente, tutti i gel sono stati analizzati con il software PDQUEST (Bio-Rad), che consente di confrontare ed analizzare gli spot di un dato esperimento con una condizione di controllo.

Il software consente di effettuare le seguenti operazioni:

- distinzione degli spot da eventuali rumori di fondo, grazie all'uso di un particolare algoritmo che rappresenta la densità ottica dell'immagine come una funzione  $f(x,y,z)$ ; le coordinate  $x$  e  $y$  sono i pixel delle posizioni orizzontali e verticali di un'immagine e il valore  $z$  è il segnale dell'intensità del pixel. L'intensità totale di un dato spot è la somma delle intensità di tutti i pixel che sono dello spot. L'unità dell'intensità di segnale è l'intensità ottica (OD);
- esclusione dei bordi del gel, poco significativi a causa dei difetti che possono generarsi durante la corsa elettroforetica;
- attribuzione del punto isoelettrico e del peso molecolare degli spot;
- sviluppo di una mappa, che comprende tutti gli spot presenti nei gel esaminati, al fine di effettuare un confronto qualitativo e quantitativo delle proteine analizzate;
- raggruppa le repliche. Tutti gli esperimenti effettuati in replicati che sono stati raggruppati in set di analisi ed è stata determinata la quantità media per ciascuno dei loro spot;
- indica ciascuno spot con un numero SSP (Standard Spot Number). Sono numeri unici assegnati a ciascuno spot presente nella mappa

Mediante analisi qualitativa si identificano le proteine differenzialmente espresse (presenti in un gel ma non nell'altro). Con l'analisi quantitativa si analizzano, rispetto a un controllo, gli spot del campione le cui intensità (valutate in termini di densità ottica, OD) sono "aumentate" o "diminuite" di un fattore che abbiamo posto per convenzione pari a 2.0. Gli spot "erratici" sono tutti gli spot la cui quantità e qualità è variata nei gel analizzati, mentre gli spot "conservati" sono tutti gli spot rimasti invariati tra i campioni analizzati.

### **2.9.5 Preparazione dei campioni per l'analisi MALDI-TOF**

I singoli spot proteici sono stati tagliati dal gel con un bisturi e preparati per la digestione enzimatica. I frammenti dei gel sono stati posti in eppendorf da 1.5 ml e lavati due volte con acqua bidistillata sterile. A seguito l'acqua è stata rimossa ed è stato aggiunto acetonitrile (ACN) (circa 3-4 volte il volume del gel); i campioni sono stati posti in agitazione su vortex per 15 minuti, durante i quali le particelle di gel sono diventate di colore bianco. Rimosso l'ACN, i frammenti di gel sono stati incubati con una soluzione di ammonio bicarbonato 0.1 M, 10 mM ditiotreitolo (DTT), per 45 minuti a 56°C. Il surnatante è stato rimosso e 100 µl di ACN sono stati aggiunti ai campioni e lasciati in agitazione a temperatura ambiente per 5 minuti. Rimosso l'ACN con il puntale, i frammenti di gel sono stati reidratati al buio, per 30 minuti, con una soluzione di ammonio bicarbonato 0.1 M, 55 mM iodoacetammide, e poi lavati con una soluzione di ammonio bicarbonato 0.1 M per 15 minuti a 37°C. Il surnatante è stato rimosso e dopo aver aggiunto ACN, il campione è stato posto in agitazione a temperatura ambiente per 5 minuti, l'ACN è stato successivamente rimosso. I frammenti di gel sono stati reidratati con 20 µl di ammonio bicarbonato 50 mM contenente CaCl<sub>2</sub> 5 mM e 12.5 ng/µl di tripsina (SIGMA). La soluzione è stata posta in ghiaccio per 45 minuti e poi incubata a 37°C O/N. Alle particelle di gel sono stati aggiunti 10-15 µl di acqua,

incubati a 37 °C in agitazione per 10 minuti, successivamente sono stati aggiunti 100 µl di acetonitrile ed incubati per 15 minuti a 37 °C in agitazione. Il liquido è stato rimosso e conservato a parte in provette da 500 µl, mentre le particelle di gel sono state incubate per 5 minuti a temperatura ambiente, successivamente l'ACN è stato recuperato e aggiunto al precedente estratto. Alle particelle di gel sono stati aggiunti 50 µl di acido formico al 5% e incubati per 15 minuti a 37 °C sotto agitazione, poi sono stati aggiunti 50 µl di acetonitrile e incubati per 15 minuti alla medesima temperatura. Infine il liquido è stato rimosso e aggiunto al precedente estratto e il tutto è stato portato a secco con lo Speedvac.

#### **2.9.6 Analisi mediante spettrometria di massa MALDI-TOF**

L'analisi mediante spettrometria di massa MALDI-TOF MS è stata effettuata presso i laboratori del CNR di Avellino. I peptidi digeriti sono stati reidratati con 1 µl di una soluzione di acido formico 80% e 9 µl di acqua deionizzata, sono stati caricati negli opportuni pozzetti del supporto (slide) dello spettrometro Voyager-DE-Pro MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystem, Framingham, USA) e lasciati seccare. Ad ogni campione è stato addizionato 1 µl di matrice acido- $\alpha$ -ciano-4-idrossinnamico 5 mg/ml di una miscela di acetonitrile/acido formico 5% in rapporto 1:1 (v/v). La miscela è stata fatta evaporare all'aria per consentire la formazione dei cristalli di matrice con intrappolato il campione proteico. I digeriti proteici sono stati analizzati con uno spettrometro di massa MALDI-TOF MS funzionante con un raggio laser pulsato (337 nm) di durata 1-10 nsec ed un analizzatore a tempo di volo funzionante in modalità reflector. Lo strumento misura il tempo che ciascuno ione impiega a raggiungere il rilevatore. Poiché tutti gli ioni possiedono la stessa energia cinetica, il tempo impiegato dagli ioni è esclusivamente funzione del loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ). Gli spettri sono stati calibrati usando come calibranti interni i peptidi generati dall'autoproteolisi

della tripsina oltre a due standard di peso molecolare noto (500-5000 uma) addizionati alla matrice.

### **2.9.7 Identificazione delle proteine mediante i dati di spettrometria di massa MALDI-TOF**

I valori di massa molecolare dei peptidi ottenuti per ciascun digerito proteico, sono stati utilizzati per l'identificazione delle proteine (specie proteica) in un database non ridondante (NCBIInr), utilizzando il programma Mascot (<http://www.matrix-science.com>) senza alcuna limitazione di pI, Mr nel regno dei funghi e in tutti i regni. Il programma è in grado di confrontare i valori sperimentali immessi con quelli teorici dei peptidi ottenuti dall'idrolisi virtuale di tutte le proteine contenute nella banca dati con l'agente proteolitico impiegato. La ricerca fornisce una lista di possibili candidati e ad ogni proteina è associato un valore (score) che indica la probabilità che i peptidi riscontrati nell'analisi appartengano a quella data proteina. In molti casi l'identificazione è pressoché inequivocabile, mentre in altri casi si ottiene solo una buona indicazione sulla natura della proteina.

E' stata effettuata un'ulteriore analisi con il programma Motif (<http://motif.genome.jp>) nei database Pfam e Pfam\_fs per determinare se le regioni di sovrapposizione tra la nostra proteina e quella indicata dal server Mascot, corrispondono a domini conservati. Con questo programma è possibile verificare se i peptidi provenienti dallo spettro di massa degli spot proteici presentano omologia con motivi conservati di proteine note.

### 3 Risultati

#### 3.1 Clonaggio dei geni *tgb1 tga3 tmk1 tmk3*

Il clonaggio dei geni *tgb1*, *tga3*, *tmk1* e *tmk3*, coinvolti nella trasduzione del segnale, è stato ottenuto usando primer degenerati disegnati sulle sequenze consenso conservate degli omologhi in altri generi fungini. L'amplificazione mediante PCR ha generato un frammento di 1200 bp per *tgb1*, 1000 bp per *tga3*, 1100 bp per *tmk1* e 1000 bp per *tmk3*. L'appaiamento in banca dati (disponibile presso il sito web [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) della traduzione aminoacidica dei frammenti nucleotidici ottenuti, effettuata mediante il software BLASTX 2.1, rivela una alta omologia con proteine note come descritto in tabella 3.1.

Tabella 3.1: risultato dell'appaiamento della traduzione aminoacidica teorica dei frammenti ottenuti da PCR con proteine presenti in banca dati.

Geni	Funzione putativa	Risultati del BlastX
<i>tgb1</i>	subunità $\beta$ di una proteina G	sub. $\beta$ di Cpgb1 di <i>Chryphonectria parasitica</i> ,
<i>tga3</i>	subunità $\alpha$ di una proteina G	sub. $\alpha$ di MagA di <i>Magnaporthe grisea</i>
<i>tmk1</i>	MAP-kinase	Mps1 di <i>M. grisea</i>
<i>tmk3</i>	MAP-kinase	Osm1 di <i>M. grisea</i>

Come riassunto in tabella 3.1, il gene *tgb1* è omologo ai geni che codificano per le subunità  $\beta$  di proteine G come *cpgb1* di *C. parasitica*, *fgb1* di *Fusarium oxysporum* (Kasahara and Nuss, 1997) e *sfaD* di *Aspergillus nidulans* (Rosen et al., 1999). Il gene

*tga3* è omologo ai geni che codificano per le subunità  $\alpha$  di proteine G di tipo III (secondo la classificazione di Bölker), come *magA* di *M. grisea* (Liu and Dean, 1997), *gna3* di *Neurospora crassa* e *gpa3* (Kays et al., 2000) di *Ustilago maydis* (Regenfelder et al., 1997).

I geni *mps1* di *M. grisea* (Xu and Hamer, 1996) e *maf1* di *Colletotrichum lagenarium* (Takano et al., 2000), codificanti per delle proteine chinasi, sono omologhi al gene *tmk1* e la sequenza di *tmk3* è omologa a *osm1* di *M. grisea* che codifica per una proteina chinasi coinvolta nella risposta allo stress osmotico (Dixon et al., 1999).

Mediante l'analisi di una libreria genomica di *Trichoderma atroviride* ceppo P1 sono state ottenute le sequenze del promotore, terminatore e ORF (Open Reading Frame) dei geni *tmk1*, *tgb1* e *tga3* mentre per *tmk3* è stata ottenuta solo la sequenza parziale del promotore e della ORF.

L'allineamento delle sequenze proteiche con i rispettivi omologhi di altri generi fungini ha evidenziato l'alto grado di conservazione delle sequenze dei componenti della trasduzione del segnale tra il genere *Trichoderma* ed altri generi fungini e in particolare con i funghi patogeni delle piante.

La sequenza del gene *tmk1*, è costituita da una ORF di 1335 bp contenente 3 introni e codificante per una proteina di 355 aa (41 kDa).

Il gene *tgb1*, è costituito da una ORF di 1429 bp con 4 introni e codificante per una proteina di 358 aa (39.6 kDa).

Il gene *tga3*, che codifica per una proteina di 355 aa (39 kDa), è costituito da una ORF di 1470 bp interrotta da 5 introni, le cui posizioni risultano essere conservate relativamente ad altre sequenze nucleotidiche codificanti per le proteine G fungine appartenenti al gruppo III. In particolare, l'analisi della sequenza aminoacidica di Tga3 mostra un'elevata omologia di sequenza con le altre subunità  $\alpha$  di proteine G di diversi generi fungini, come ad esempio MagA di *M. grisea* (89,6% di identità) e Gna-3 di *N.*

*crassa* (88,2% di identità); la maggior parte delle differenze sono comunque localizzate nella parte N terminale della proteina (figura 3.1).

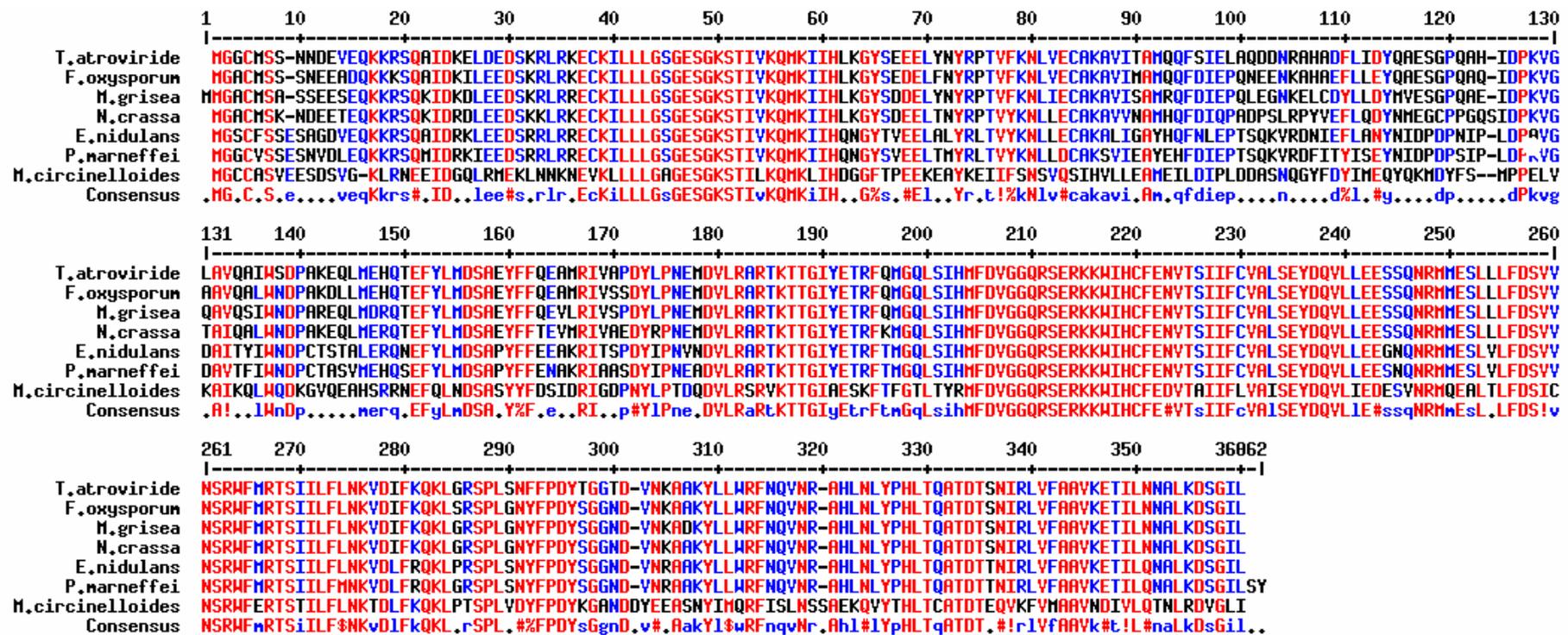
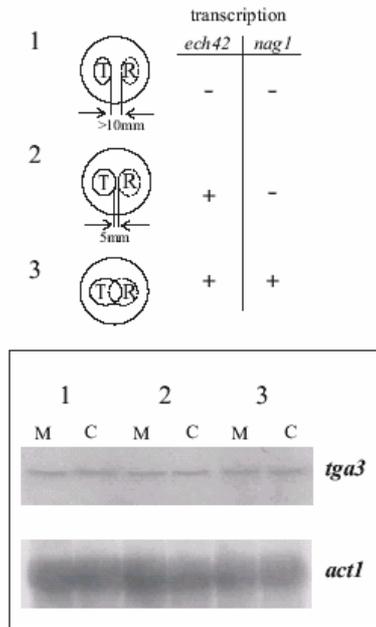


Figura 3.1: appaiamento delle sequenze aminoacidiche di differenti subunità  $\alpha$  di proteine G di diversi generi fungini.

### 3.2 Studio dell'espressione dei geni *tga3*, *tmk1* e *tgb1*

Per analizzare se l'espressione di *tmk1*, *tgb1* e *tga3* è costitutiva o indotta durante il micoparassitismo, è stata eseguita un'analisi Northern su RNA estratto da *T. atroviride* in condizioni di micoparassitismo (saggio di confronto, "confrontation assay", contro *R. solani*) come illustrato in figura 3.2. L'espressione di questi geni è stata confrontata con quella del gene *ech42*, codificante per una endochitinasi e del gene *nag1*, codificante per una N-acetyl-glucosaminidasi. I geni *ech42* e *nag1* sono tipicamente indotti in *T. atroviride* durante gli eventi di micoparassitismo, quindi la loro "accensione" è sintomo del riconoscimento tra il micoparassita e il suo ospite (Zeilinger et al., 1999) e può essere utilizzata come controllo positivo per studiare il ruolo dei geni *tmk1*, *tgb1* e *tga3*. Durante la prima fase dell'interazione quando il *Trichoderma* è distante dal suo ospite i geni *ech42* e *nag1* non sono espressi, nella fase successiva di pre-contatto, quando cioè i due funghi raggiungono una distanza di 5 mm su piastra il gene *ech42* è espresso mentre non lo è *nag1*. Durante l'ultimo stadio, ovvero quando avviene il contatto diretto tra i due funghi, sia *ech42* che *nag1* risultano fortemente espressi. (Zeilinger et al., 1999).

A)



B)

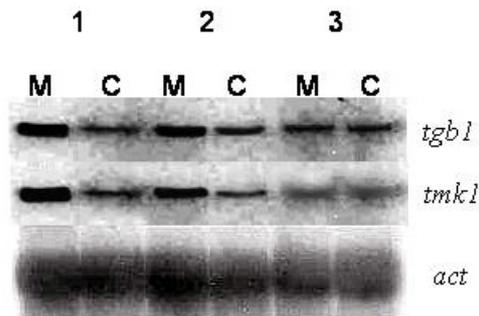


Figura 3.2: analisi dell'espressione degli mRNA di *tmk1*, *tgb1* e *tga3* durante i diversi stadi del confronto con *R. solani*. A) Rappresentazione schematizzata dei differenti stadi e relativa analisi Northern del gene *tga3*. L'mRNA del gene *act1* è stato usato come controllo. Con i segni + o - sono indicate rispettivamente la presenza (+) e l'assenza (-) dell'espressione dei geni *ech42* e *nag1* durante i diversi stadi del saggio. T: *T. atroviride*, R: *R. solani*, M: interazione tra antagonista e patogeno, C: controllo. B) Analisi Northern del geni *tmk1*, *tgb1* durante i diversi stadi del confronto con *R. solani* usando il gene *act1* di P1 come controllo.

Dall'analisi Northern risulta che l'espressione del gene *tga3* è costitutiva e non molto forte durante le diverse fasi dell'interazione con l'ospite (figura 3.2A). La trascrizione dei geni *tmk1* e *tgb1* è accentuata durante le prime fasi del micoparassitismo mentre il livello d'espressione decresce quando il *Trichoderma* entra in contatto con le ife del fungo *R. solani* (figura 3.2B).

### 3.3 Distruzione genica mirata dei geni *tmk1*, *tgb1* e *tga3* in *Trichoderma atroviride*

La trasformazione del ceppo P1 di *T. atroviride* per inattivare i geni *tmk1*, *tgb1* e *tga3* ha prodotto, per ogni evento di trasformazione, un elevato numero di colonie capaci di crescere su substrato selettivo e formare conidi. I costrutti utilizzati per la distruzione mirata tramite ricombinazione genica omologa sono riportati in figura 3.3.

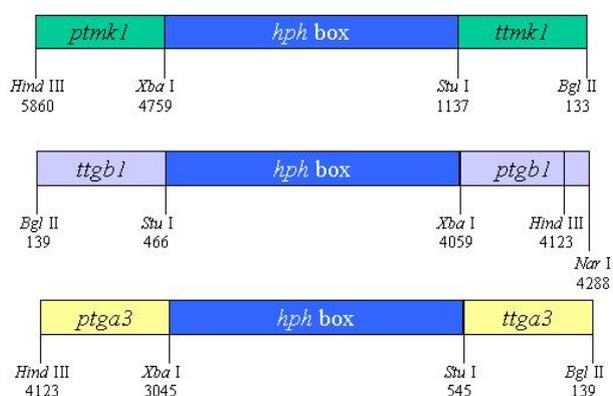
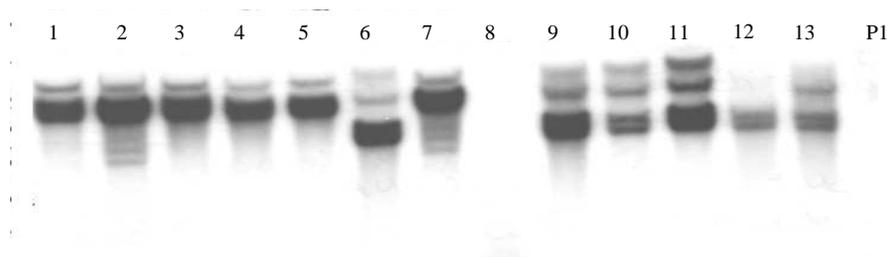


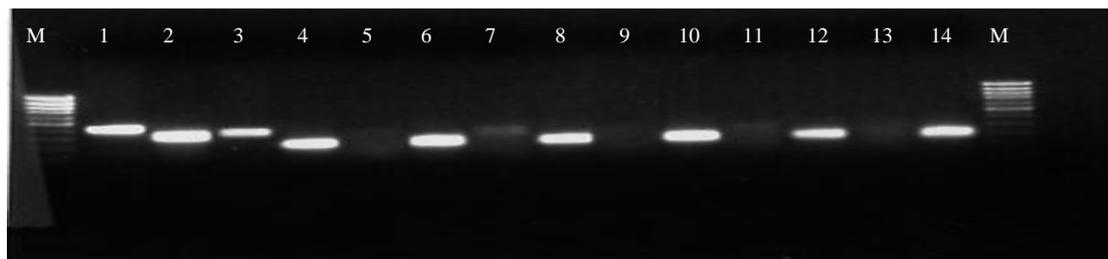
Figura 3.3: costrutti genici utilizzati per la distruzione mirata di *tmk1*, *tgb1* e *tga3*. *hph box*: cassetta codificante per il gene di resistenza all'igromicina; *ptmk1*: promotore del gene *tmk1*; *ttmk1*: terminatore del gene *tmk1*; *ptgbl*: promotore del gene *tgb1*; *ttgbl*: terminatore del gene *tgb1*; *ptga3*: promotore del gene *tga3*; *ttga3*: terminatore del gene *tga3*.

I mutanti ottenuti dalla trasformazione dei protoplasti sono stati selezionati su substrato selettivo (resistenza all'igromicina, 200 ppm) mediante tre successive subculture monoconidiche. Essi sono poi stati caratterizzati con l'analisi Southern per verificare l'inserimento della cassetta dell'igromicina nel genoma fungino e con RT-PCR al fine di confermare l'assenza dei trascritti dei geni *tmk1* e *tga3* (figura 3.4).

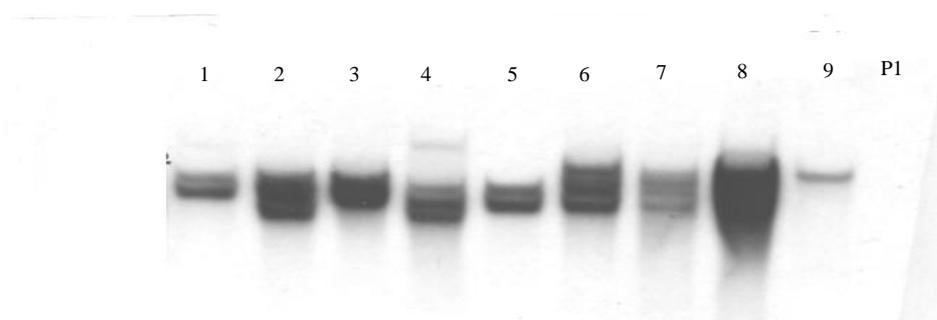
A)



B)



C)



D)

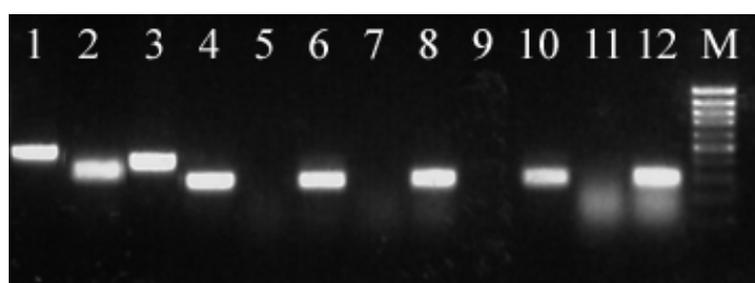


Figura 3.4: analisi Southern e RT-PCR di differenti ceppi difettivi per i geni *tmk1* e *tga3*. A) Analisi Southern di 13 ceppi difettivi per il gene *tmk1* e del ceppo selvatico P1, usando come sonda l'intera cassetta di distruzione del gene *tmk1*. B) RT-PCR per verificare la presenza del trascritto del gene *tmk1* nei medesimi ceppi difettivi per il gene *tmk1*; come controllo sono stati usati i primer specifici del gene *tmk2*. Corsie 1 e 2:

amplificati ottenuti usando primer specifici del gene *tmk1* e come stampo il DNA e cDNA del ceppo selvatico. Corsie 3 e 4: controllo positivo ottenuto dall'amplificazione del DNA e cDNA del ceppo selvatico come stampo, usando i primer per il gene *tmk2*. Corsie 5, 7, 9, 11 e 13: amplificazione dell'cDNA di diversi ceppi difettivi per il gene *tmk1* usando i primer per il trascritto del gene *tmk1*. Corsie 6, 8, 10 e 12: controllo positivo degli stessi ceppi difettivi usando i primer per il trascritto del gene *tmk2*. C) Analisi Southern dei 9 ceppi difettivi per il gene *tga3* e del ceppo P1 usando come sonda l'intera cassetta di distruzione del gene *tga3*. D) RT-PCR per verificare la presenza del trascritto del gene *tga3* nei medesimi ceppi difettivi per il gene *tga3*; come controllo positivo sono stati usati i primer del gene *tga1*. Corsie 1 e 2: DNA e cDNA del ceppo selvatico amplificati usando i primer per il gene *tga3*. Corsie 3 e 4: DNA e cDNA del ceppo selvatico amplificati usando i primer per il gene *tga1*. Corsie 5, 7, 9 e 11: RT-PCR di differenti ceppi difettivi per il gene *tga3* usando i primer per il *tga3*. Corsie 6, 8, 10 e 12: RT-PCR degli stessi ceppi difettivi usando i primer del gene *tga1* come controllo positivo.

Come indicato dalla figura 3.4 A e C l'evento di trasformazione ha prodotto diversi ceppi in cui la cassetta di trasformazione, che non risulta presente nel ceppo P1, è stata integrata nel genoma dei ceppi mutanti di *T. atroviride*. Il genoma dei ceppi mutanti è stato digerito con l'enzima *Bam*HI che taglia dentro le cassette di trasformazione dei geni *tmk1* e *tga3*. Nei campioni delle corsie 1, 3, 4, 5 e 12 di figura 3.4A, dove si evidenziano due bande, l'integrazione della cassetta di trasformazione per il gene *tmk1* è avvenuta in singola copia; similmente i campioni presenti nelle corsie 1, 3, 5 e 7 della figura 3.4C hanno integrato in singola copia la cassetta di trasformazione per il gene *tga3*, infatti anch'essi presentano solo due segnali di ibridazione. Nella figura 3.4B e D risulta evidente che l'mRNA codificante per i geni *tmk1* e *tga3* è del tutto assente nei campioni che hanno integrato correttamente la cassetta di trasformazione, per cui

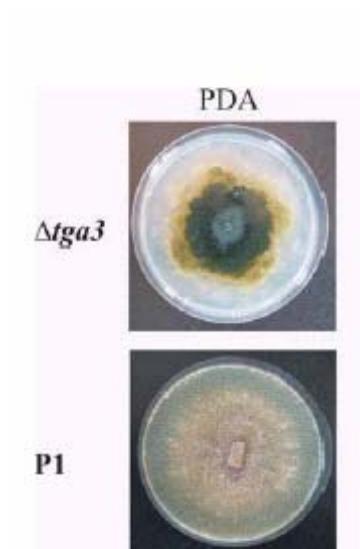
nessuno dei trasformanti di *T. atroviride* analizzati è capace di esprimere l'mRNA di *tmk1* o di *tga3*.

### **3.4 Fenotipo e sporulazione del mutante difettivo per il gene *tga3*.**

Un'ulteriore caratterizzazione è stata condotta esclusivamente sul  $\Delta tga3$ , mutante in cui è stato interrotto il gene *tga3* codificante per la subunità  $\alpha$  di una proteina G, probabilmente coinvolta nella trasduzione del segnale durante il micoparassitismo.

La caratterizzazione fenotipica del mutante  $\Delta tga3$  mostra una crescita ridotta su PDA, con un micelio non aereo, piatto e traslucido e quindi differente dal controllo non trasformato. Questo mutante produce conidi di colore, grandezza e forma simile al ceppo P1. Il  $\Delta tga3$  mostra la stessa capacità di formare conidi sia che venga allevato al buio che alla luce, al contrario del ceppo P1 che normalmente è incapace di formare conidi in assenza di luce. Questa particolarità del mutante suggerisce un coinvolgimento della subunità  $G\alpha$  Tga3, nel processo di conidiazione e di risposta allo stimolo luminoso (figura 3.5A). Per osservare il coinvolgimento di Tga3 nella regolazione dei livelli di cAMP intracellulare, questo composto è stato aggiunto (5 mM) nel terreno di coltura del  $\Delta tga3$  per tentare di revertire il fenotipo mutante (Kays et al., 2000). Nonostante l'aggiunta di cAMP esogeno il  $\Delta tga3$  non ristabilisce la crescita e la produzione di conidi ai livelli del ceppo selvatico (figura 3.5B). Inoltre, in coltura liquida, i conidi del mutante difettivo mostrano una germinazione ridotta e ritardata rispetto al ceppo P1: infatti dopo 9 ore di incubazione a 28°C germina il 30% dei conidi del ceppo P1 e solo il 10% del  $\Delta tga3$ ; dopo 11 ore germina il 55% dei conidi di P1 e il 33% del mutante difettivo. Dopo 36 ore di incubazione la biomassa prodotta dal  $\Delta tga3$  è ridotta del 30% rispetto a quella prodotta dal ceppo P1.

A)



B)

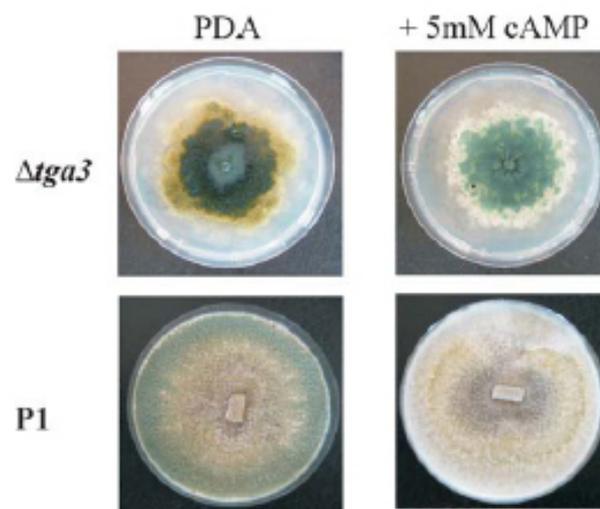


Figura 3.5: A) Confronto tra la morfologia del  $\Delta tga3$  e quella del ceppo selvaggio P1 entrambi allevati su PDA a 28°C per 7 giorni. B) Confronto tra il fenotipo del ceppo P1 di *T. atroviride* e il  $\Delta tga3$  allevati a 28°C per 7 giorni al buio su PDA dopo l'aggiunta di 5 mM di cAMP esogeno.

### 3.5 Capacità di micoparassitizzare il fungo ospite da parte di $\Delta tga3$

Per determinare se la proteina Tga3 è coinvolta nella trasduzione del segnale attivata durante il micoparassitismo, è stato effettuato un saggio di confronto in piastra del ceppo P1 e  $\Delta tga3$  di *T. atroviride* con *R. solani* e *B. cinerea*.

Il ceppo P1 dopo 3-4 giorni inizia ad attaccare il fungo ospite e nell'arco di 14 giorni riesce completamente a coprirne la colonia e parassitizzarlo (figura 3.6A). Nello stesso intervallo temporale il  $\Delta tga3$  non presenta nessun fenomeno di parassitismo nei confronti dell'ospite (figura 3.6B). Per evitare che la bassa velocità di crescita del mutante difettivo influenzi negativamente il risultato del saggio, la *R. solani* è stata inoculata sulla piastra Petri dopo che il  $\Delta tga3$  aveva già invaso metà piastra. Anche in questo caso il  $\Delta tga3$  è stato incapace di micoparassitizzare la *R. solani* (figura 3.6B). Lo stesso esperimento è stato ripetuto con il patogeno fogliare *B. cinerea* confermando i risultati precedentemente ottenuti con il patogeno terricolo *R. solani* (figura 3.6C).

A)



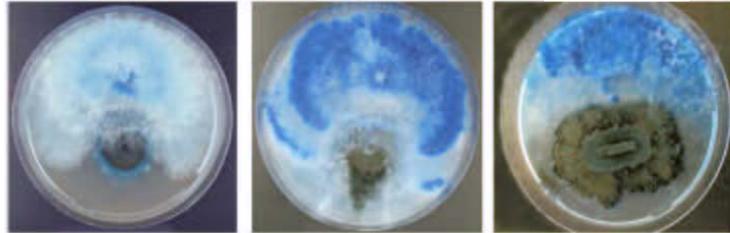
*R. solani*

*T. atroviride* P1

B) 4 giorni

7 giorni

14 giorni



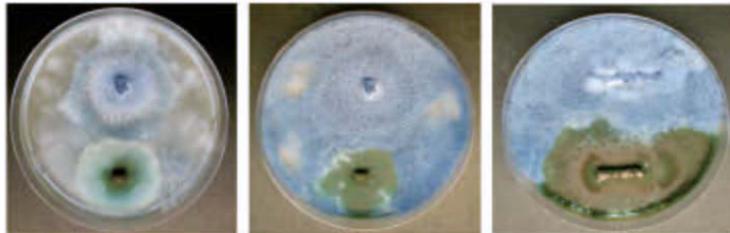
*R. solani*

*T. atroviride*  
 $\Delta tga3$

C) 4 giorni

14 giorni

14 giorni



*B. cinerea*

*T. atroviride*  
 $\Delta tga3$

4 giorni

14 giorni

14 giorni

Figura 3.6: saggio di biocontrollo *in vitro* per analizzare le capacità di  $\Delta tga3$  di micoparassitizzare i diversi ospiti. A) Saggio di confronto del ceppo selvatico P1 contro *R. solani*: le foto rappresentano la situazione 4, 7 e 14 giorni dopo l'inoculo di entrambi i funghi. B) Le prime due immagini rappresentano il saggio di confronto di  $\Delta tga3$  contro *R. solani* dopo 4 e 14 giorni dall'inoculo, nella terza immagine il mutante difettivo per il *tga3* è stato pre-inoculato nella piastra. Il patogeno è aggiunto solo quando il mutante aveva invaso metà piastra. L'immagine è stata presa 14 giorni dopo l'inoculo di *R. solani*. C) Saggio di confronto di  $\Delta tga3$  contro *B. cinerea* effettuato nelle stesse condizioni riportate in B.

### 3.6 Analisi delle attività di biocontrollo di P1 e di $\Delta tga3$ *in vitro* e *in vivo*

Per analizzare l'attività di biocontrollo del mutante rispetto a quella del ceppo selvatico, è stato effettuato un saggio *in vitro* in cui è stata valutata la capacità dei filtrati colturali, provenienti da diverse condizioni di crescita, di inibire la germinazione delle conidiospore di *B. cinerea*. Sia il P1 che  $\Delta tga3$  sono stati fatti crescere in terreno liquido SM con 1% di glicerolo e da questa coltura è stato poi effettuato il medium replacement (vedi Materiali e Metodi), con un eguale quantità di biomassa, in SM contenente come unica sorgente di carbonio N-acetilglucosamina (1% p/v) o chitina colloidale (1% p/v). I filtrati colturali sono stati quindi raccolti a tempi diversi di incubazione (3 e 5h per la N-acetilglucosamina e 36 e 48 h per la chitina) e usati per il saggio d'inibizione. In figura 3.7 sono riportati i risultati di tale esperimento dove si può notare che il filtrato colturale di  $\Delta tga3$  presenta una ridotta capacità d'inibizione della germinazione dei conidi di *B. cinerea* rispetto a quella esercitata dal filtrato colturale del ceppo P1.

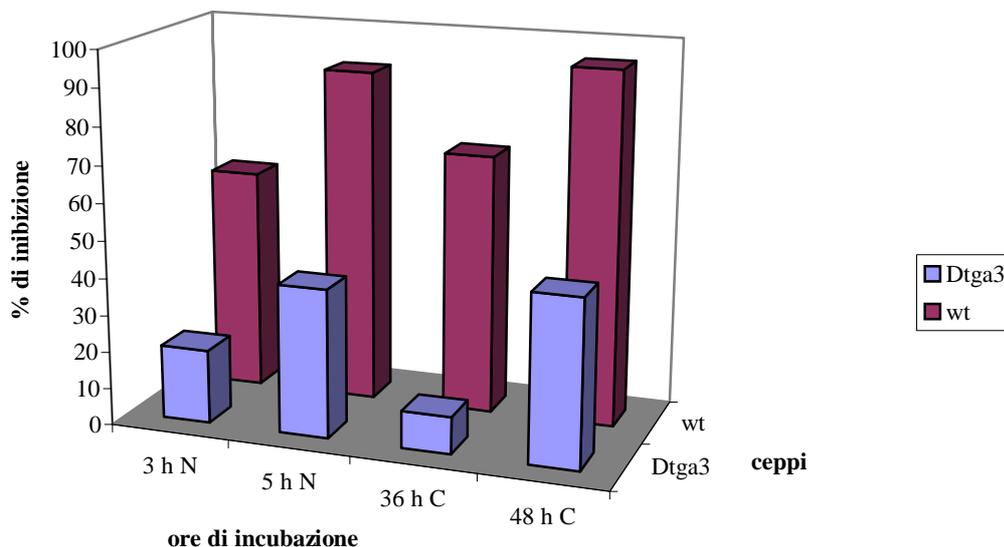
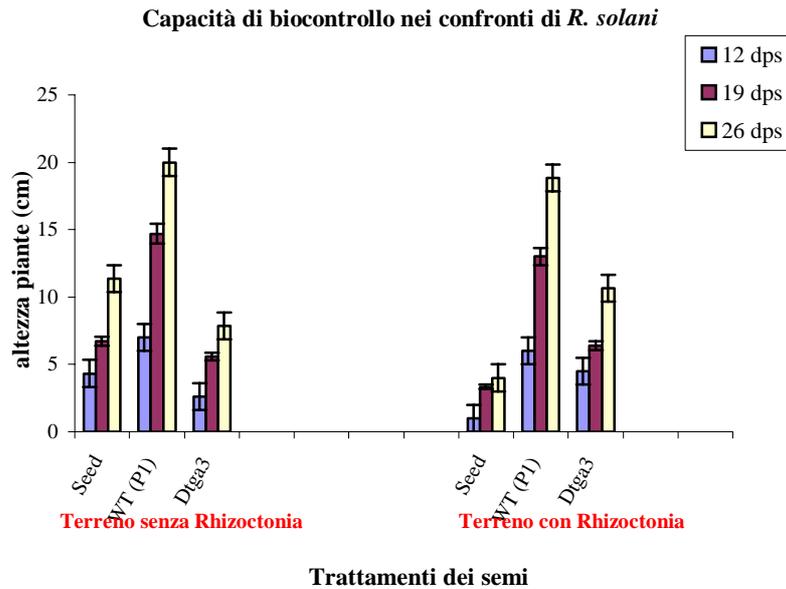


Figura 3.7: inibizione *in vitro* della germinazione dei conidi di *B. cinerea* con i filtrati colturali di P1 e di  $\Delta tga3$  (indicato con Dtga3) cresciuti in 1% di N-acetilglucosamina (p/v) per 3 ore (3N) e 5 ore (5N) e in 1% di chitina (C) per 38 e 48 ore. Ciascun istogramma rappresenta la media di tre ripetizioni. L'errore standard dei valori delle percentuali di inibizione varia tra  $\pm 10$  e  $\pm 15$  per il ceppo P1 (ceppo selvatico) e  $\pm 7$  e  $\pm 5$  per il  $\Delta tga3$ .

Per verificare la ridotta capacità antagonista del mutante difettivo  $\Delta tga3$  sono stati eseguiti saggi di biocontrollo *in vivo* contro il patogeno terricolo *R. solani* e il patogeno fogliare *B. cinerea* su piante di *Phaseolus vulgaris* cv cannellino. I saggi sono stati eseguiti come descritto nei Materiali e Metodi, valutando nei confronti del patogeno *R. solani* l'altezza delle piante dopo 12, 19 e 26 giorni dalla semina. Nel saggio di biocontrollo contro *B. cinerea* è stata valutata l'ampiezza delle aree necrotiche sviluppate dal patogeno sulle foglie dopo 48, 72 e 96 ore dall'inoculo dei conidi. Anche in questi saggi il  $\Delta tga3$  ha dimostrato una ridotta capacità di controllare la malattia causata dai funghi patogeni rispetto al ceppo selvatico (figura 3.8). Infatti le piante infettate con *R. solani* e trattate con  $\Delta tga3$  crescono di più rispetto al controllo senza antagonista, ma presentano una riduzione della altezza del 50% se confrontate con le

piante trattate con P1. Nel saggio di biocontrollo nei confronti del patogeno fogliare *B. cinerea* le aree necrotiche delle piante infettate e trattate con i conidi del *Atga3*, presentano una riduzione del 20% rispetto alle piante infettate e non trattate con l'antagonista, laddove il trattamento con P1 riduce molto più evidentemente lo sviluppo delle aree necrotiche (figura 3.8A e B).

A)



B)

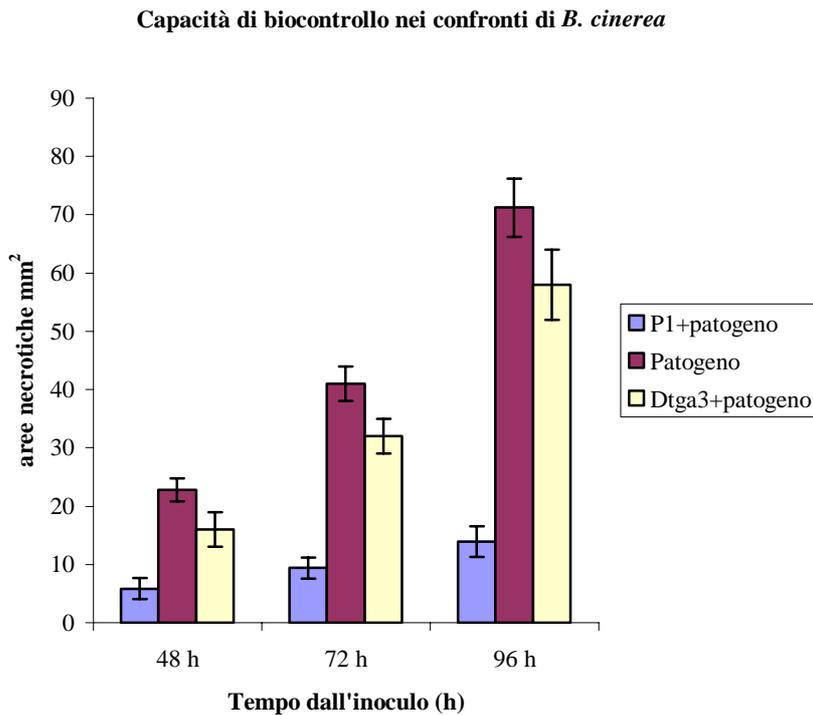


Figura 3.8: A) analisi della capacità di biocontrollo del  $\Delta tga3$  (indicato nella legenda con Dtga3) e del ceppo P1 di *T. atroviride* nei confronti di *R. solani* *in vivo* su piante di fagiolo. Ciascuna istogramma rappresenta la media di tre ripetizioni  $\pm$  l'errore standard. B) capacità di biocontrollo del  $\Delta tga3$  e del ceppo P1 di *T. atroviride* nei confronti di *B. cinerea* *in vivo* su piante di fagiolo. L' esperimento è stato ripetuto tre volte e ciascun

istogramma rappresenta la media dei valori delle aree necrotiche ( $\pm$  E. S.) causate dal patogeno fogliare *B. cinerea*.

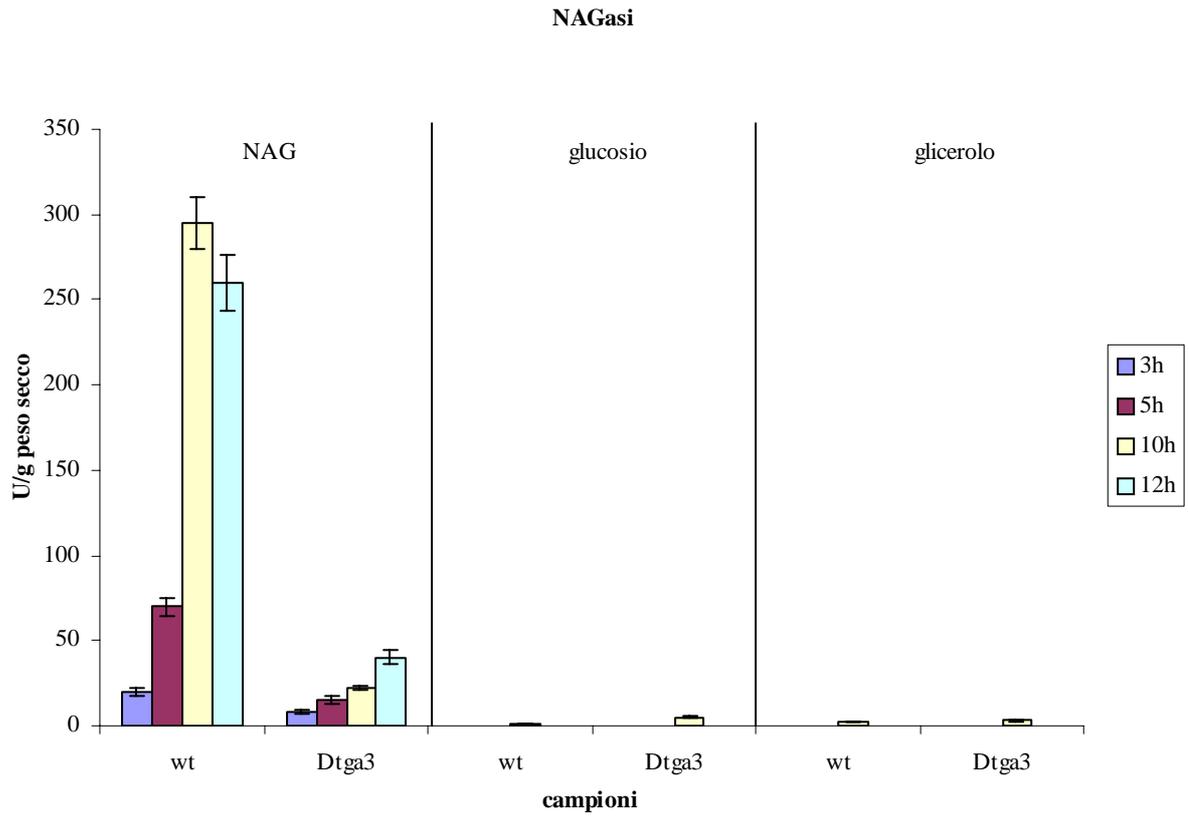
I saggi di biocontrollo *in vitro* e *in vivo* mostrano che il mutante *Atga3*, che non codifica per la subunità  $\alpha$  della proteina G di tipo III, ha una capacità di controllare i patogeni *R. solani* e *B. cinerea* ridotta rispetto al ceppo selvatico P1.

### **3.7 Analisi dell'attività chitinolitica di *Atga3*.**

In *Trichoderma* la produzione e la secrezione di chitinasi è un elemento chiave durante il micoparassitismo per la degradazione della parete cellulare del fungo ospite. A tal fine è stata confrontata l'attività N-acetilglucosaminidasi ed endochitinasi esocellulare di *Atga3* con quella di P1, cresciuti in SM 1X e 1% (p/v) di N-acetil-glucosamina o 1% (p/v) di chitina colloidale come terreni inducenti le attività chitinasiche e in SM 1X più 1% (p/v) di glucosio o 1% (v/v) di glicerolo come controllo non inducente.

Nel ceppo P1 dopo 5 e 10h dall'inoculo nel terreno non inducente non si rileva alcuna attività chitinasi (figura 3.9A). Invece quando il ceppo P1 cresce in presenza di N-acetil-glucosamina mostra attività N-acetilglucosaminidasi (NAGasi) a partire da 3 h dopo l'inoculo, raggiungendo la produzione massima (290U/g p.s.) dopo 10 h. Se il ceppo selvatico è fatto crescere in terreno contenente chitina colloidale l'attività NAGasi ed endochitinasi si rileva dopo 36 h e raggiunge il suo massimo (1800 U/g p.s.) dopo 48 h (figura 3.9B). Il *Atga3*, come il P1, non produce chitinasi in presenza di glucosio e glicerolo, ma nel terreno con N-acetil-glucosamina mostra una notevole riduzione (90%) dell'attività NAGasi rispetto al ceppo selvatico. Inoltre il mutante difettivo allevato in presenza di chitina colloidale mostra un'attività NAGasi ed endochitinasi ridotta di circa il 50% rispetto al P1 (figura 3.9A-B).

A)



B)

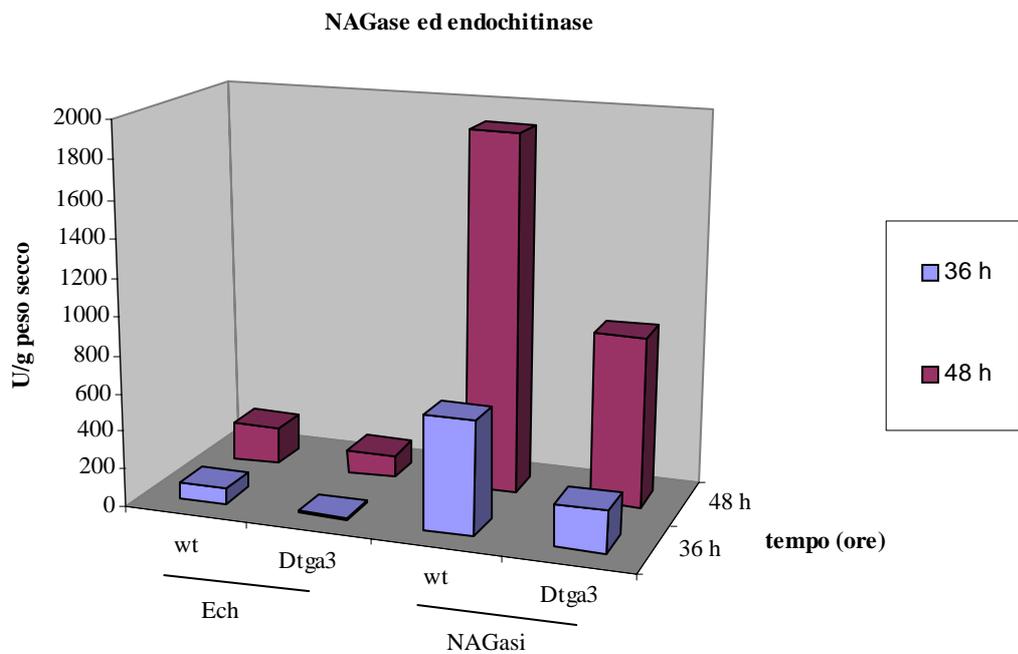


Figura 3.9: analisi dell'attività di NAGasi esocellulari presente nei filtrati culturali di *T. atroviride* ceppo P1 e  $\Delta tga3$  (indicato con Dtga3) dopo 3, 5, 10 e 12 ore di crescita in

terreno inducente contenente l'1% di N-acetil-glucosamina e dopo 10 ore in terreno non inducente (A). L'attività NAGasi nei filtrati colturali del ceppo selvatico e del mutante difettivo è stata determinata in relazione al peso secco del micelio. B) Determinazione dell'attività di NAGasi (indicata con NAGasi) e endochitinasi (indicata con Ech) presenti nei filtrati colturali raccolti dopo 36 h e 48 h di crescita dei 2 isolati in presenza di chitina colloidale (1%). L'attività enzimatica è riportata come unità per grammi di micelio secco; ciascun istogramma rappresenta la media di tre ripetizioni  $\pm$  l'errore standard. In B l'errore standard è compreso tra i valori di  $\pm 12$  e  $\pm 150$  per la NAGasi, e  $\pm 1$  e  $\pm 8$  per l'endochitinasi.

### **3.8 Analisi dell'espressione di *nag1* ed *ech42* nel $\Delta tga3$**

Per determinare se la ridotta attività chitinasica esocellulare del  $\Delta tga3$  era dovuta ad una riduzione della trascrizione dei geni *nag1* ed *ech42*, è stata eseguita un'analisi Northern dei trascritti di *nag1* ed *ech42* in P1 e  $\Delta tga3$  allevati in presenza di N-acetilglucosamina (1% p/v) o di chitina colloidale (1% p/v) (figura 3.10). Nel ceppo P1 di *T. atroviride* la trascrizione di *nag1* è massima 5 h dopo il trasferimento in N-acetilglucosamina, diminuisce dopo 10 h ed è nulla dopo 12 h. Quando la chitina colloidale è utilizzata come sorgente di carbonio, i geni *nag1* ed *ech42* sono trascritti dopo 36 e 48 ore. L'espressione del gene *nag1* di  $\Delta tga3$  cresciuto in presenza di N-acetilglucosamina è maggiore rispetto al ceppo P1 e anche la crescita in chitina colloidale induce una maggiore espressione di *nag1* ed *ech42* in  $\Delta tga3$  rispetto al P1 (figura 3.10).

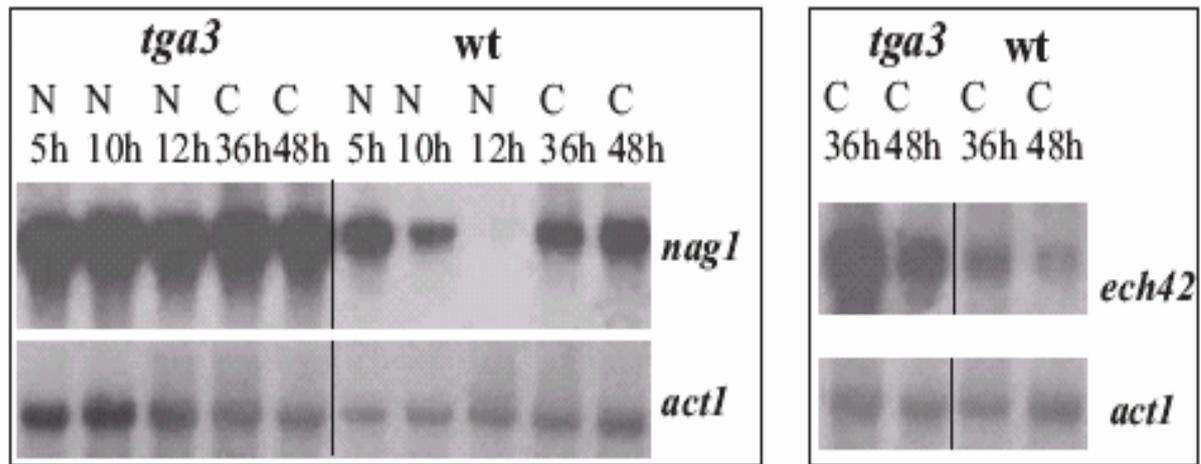
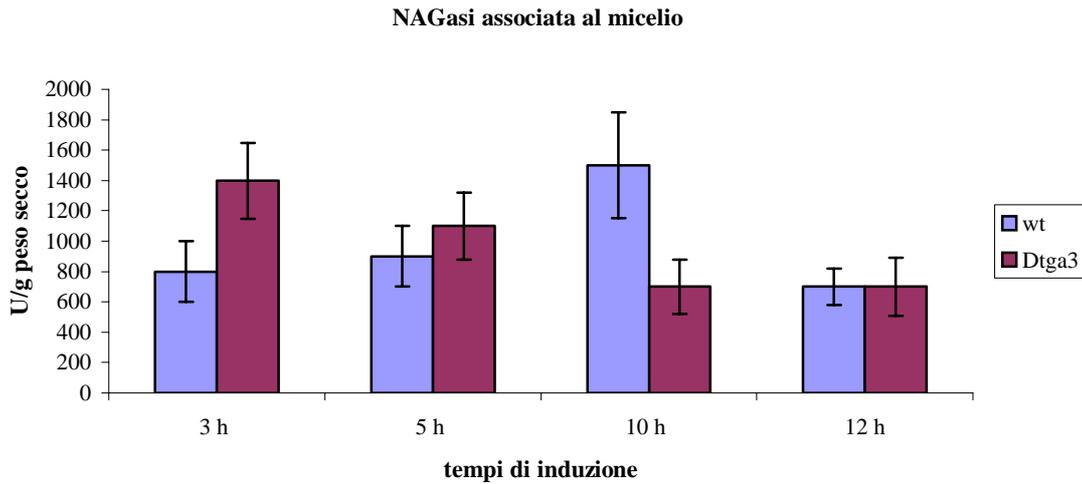


Figura 3.10: Northern blotting di *nag1* ed *ech42* in *T. atroviride* ceppo P1 (ceppo selvatico) e nel  $\Delta tga3$  (indicato come *tga3*) cresciuti in presenza di N-acetilglucosamina o di chitina colloidale. Analisi dell'espressione di *nag1* 5, 10 e 12 ore dopo l'inoculo in terreno contenente N-acetilglucosamina (N) e 36 e 48 ore dopo l'inoculo in terreno contenente chitina colloidale (C). La trascrizione di *ech42* è stata analizzata dopo 36 e 48 ore l'induzione con chitina colloidale. Per normalizzare l'espressione di *nag1* ed *ech42* è stato utilizzato, come controllo interno, il livello di espressione dell'mRNA del gene dell'actina *act1* di *T. atroviride* ceppo P1.

### 3.9 Analisi dell'attività NAGasi intracellulare e associata al micelio

Sebbene i mutanti difettivi per il gene *tga3* mostrino un'elevata quantità di trascritto dei geni *nag1* e *ech42*, la quantità di attività chitinasica esocellulare è apparsa ridotta rispetto al ceppo P1. E' stata misurata l'attività NAGasi intracellulare e associata al micelio del mutante  $\Delta tga3$  e del ceppo P1 di *T. atroviride* cresciuti in condizioni che inducono la produzione dell'enzima. Come risulta evidente dalla figura 3.11A e B sono stati riscontrati livelli simili di attività NAGasi legata al micelio ed intracellulare in entrambi i ceppi in tutte le fasi di coltura analizzate.

A)



B)

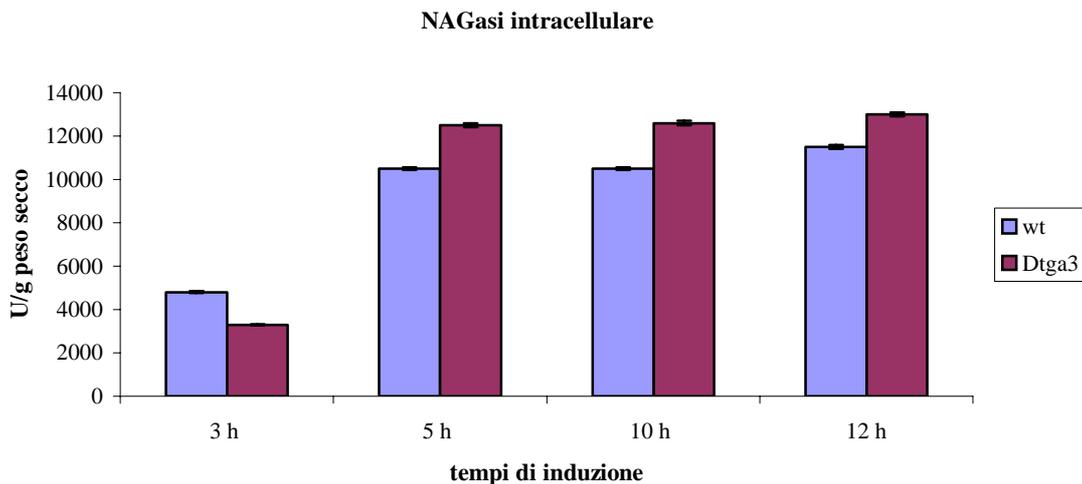


Figura 3.11: attività NAGasi associata al micelio (A) e intracellulare (B) del ceppo P1 (ceppo selvatico) e *Δtga3* (indicato con Dtga3) cresciuti come descritto precedentemente (vedi figura 3.9). L'attività enzimatica è riportata come unità per grammi di micelio secco; ciascun istogramma rappresenta la media di tre ripetizioni ± l'errore standard.

I risultati mostrano che 10 h dopo l'induzione in N-acetilglucosamina 1%, l'attività NAGasi legata al micelio in P1 è 5 volte maggiore di quella esocellulare (vedere per

confronto la figura 3.9), mentre l'attività NAGasi associata al micelio in *Δtga3* è 17 volte più alta di quella esocellulare (vedere per confronto la figura 3.9).

### **3.10 Analisi proteomica del mutante *Δtga3* e del P1 di *T. atroviride*.**

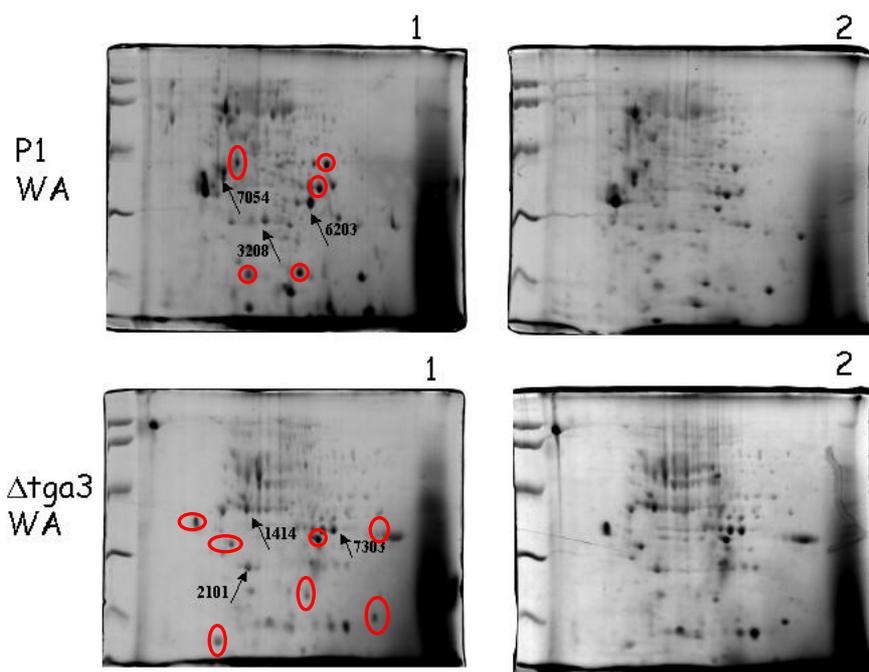
E' stata effettuata l'analisi proteomica delle proteine intracellulari ed esocellulari di *Δtga3* e P1 cresciuti in diverse condizioni colturali. Le proteine (200 μg) sono state separate su gel 2D utilizzando strip da 7 cm pH 3-10 e 4-7, le strip con intervalli di pH ristretti sono state usate per migliorare la separazione delle miscele proteiche. Le analisi mediante il software PDQUEST riportate di seguito sono state eseguite sui gel 2D ottenuti dalla isoelettrofocalizzazione delle proteine intracellulari ed esocellulari con strip di 7 cm negli intervalli di pH 3-10 e 4-7. Le mappe proteomiche ottenute con l'analisi dei gel 2D mediante il PDQUEST sono state eseguite con una speciale funzione fornita dal software che permette di raggruppare le repliche dei gel e quindi determinare la quantità media dei loro spot proteici. Le due repliche dei gel 2D delle proteine intracellulari ed esocellulari, di P1 e *Δtga3* cresciuti in diverse condizioni di crescita, sono state confrontate tra loro. Da questa analisi preliminare è stata ottenuta una mappa, in cui il valore di OD di ciascuno spot è il risultato della media dei valori di OD del medesimo spot nelle due repliche. Successivamente sono state confrontate le mappe del ceppo P1 e *Δtga3* cresciuti nelle medesime condizioni per ottenere le mappe riassuntive finali su cui sono stati valutati gli spot differenzialmente espressi.

### **3.11 Analisi proteomica delle proteine intracellulari di P1 e *Δtga3* cresciuti su substrato solido**

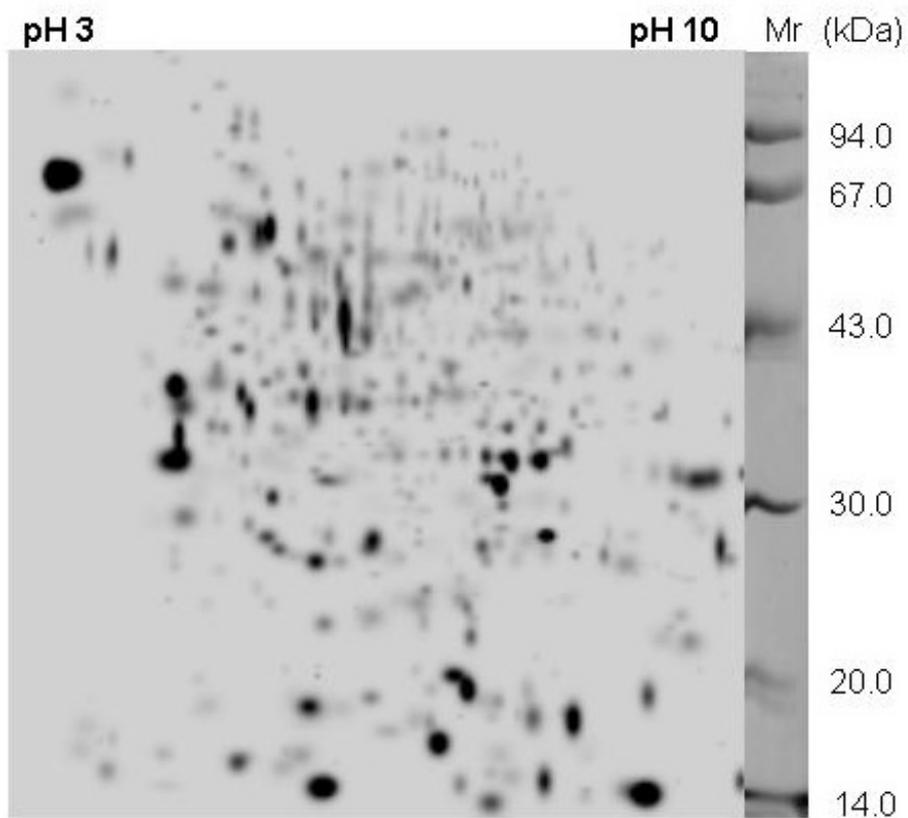
In figura 3.12A2 e B2 sono riportate le mappe proteomiche delle proteine intracellulari di *Δtga3* e P1 cresciuti in condizioni di interazione a 3 (pianta-patogeno-antagonista)

(vedere Materiali e Metodi). Le mappe proteomiche sono state ottenute rispettivamente dai gel presentati in figura 3.12A1 e B1.

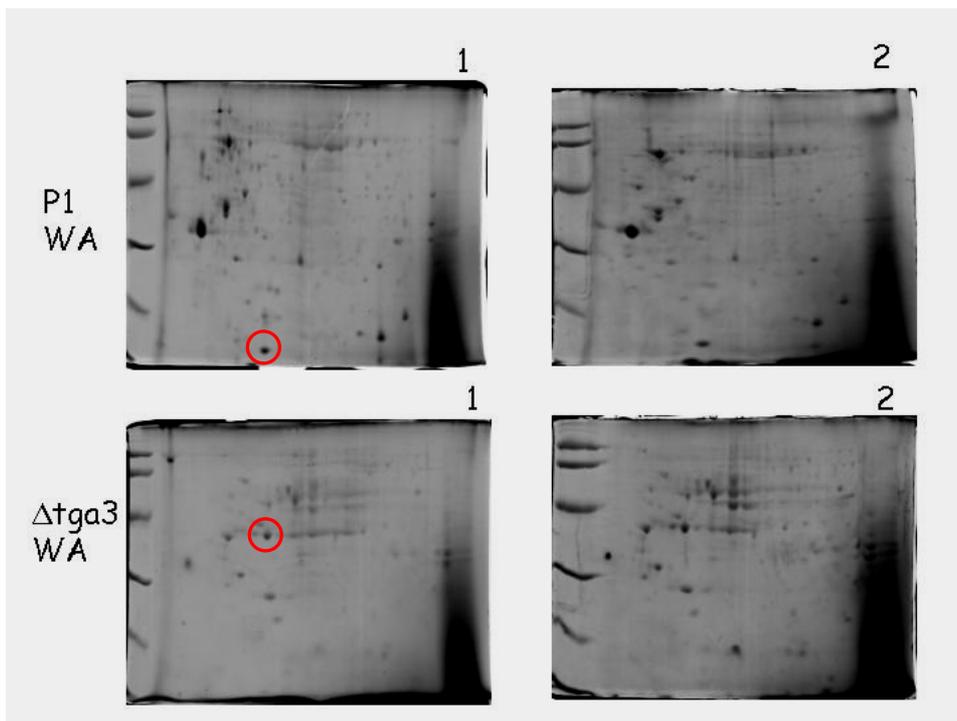
A1)



A2)



B1)



B2)

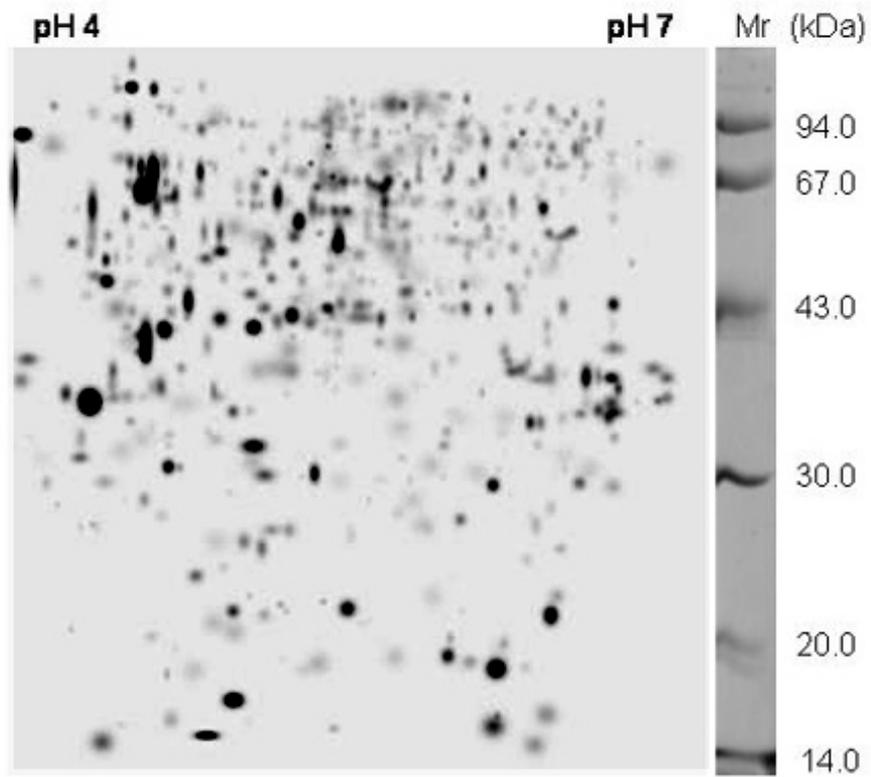


Figura 3.12: mappe proteomiche delle proteine intracellulari di *Atga3* e P1 cresciuti su WA con piantine di pomodoro e *R. solani* (interazione a tre). La separazione della miscela proteica è stata ottenuta con strip di 7 cm con intervallo di pH 3-10 (A1) e 4-7 (B1). In figura A1 e B1 sono riportati i gel da cui derivano rispettivamente le mappe A2 e B2. Gli spot che sono stati identificati mediante analisi MALDI-TOF sono indicati con una freccia e il numero identificativo dello spot. Con i cerchi sono indicati gli spot il cui PMF (peptide mass fingerprinting) non è interpretabile.

In tabella 3.2 sono riportati i risultati dell'analisi PDQUEST delle mappe di figura 3.12 delle proteine intracellulari di *Atga3* e P1 cresciuti su WA con piantine di pomodoro e *R. solani*, separate con strip da 7 cm con intervallo di pH 3-10 e 4-7. I risultati dell'analisi delle immagini sono indicati con la nomenclatura di seguito riportata: con il termine “on” sono stati indicati tutti gli spot che sono presenti in *Atga3* e assenti nel P1; con “off” sono riportati gli spot assenti nel *Atga3* e presenti nel P1. Con la dicitura “incrementati” sono indicati tutti gli spot presenti in entrambi i ceppi e la cui quantità (intesa come densità ottica, OD) è almeno il doppio nel *Atga3* rispetto al P1, mentre con “decrementati” sono indicati tutti gli spot presenti sia nel mutante difettivo che nel P1, la cui quantità intesa come intensità ottica, nel *Atga3* è almeno la metà rispetto al P1. Con il termine “erratici” sono indicati gli spot che variano tra i due campioni ovvero è la somma degli spot on, off, incrementati e decrementati; con la dicitura “conservati” sono indicati tutti gli spot presenti in entrambi e la cui intensità ottica nei due campioni è invariata e infine con il termine “totali” è riportato il numero totale di tutti gli spot presenti nella mappa.

Tabella 3.2: risultato dell'analisi effettuata con il software PDQUEST delle mappe proteomiche di *Atga3* e P1 cresciuti in WA+Pomodoro+ *R. solani*, riportate in figura 3.12 A2 e B2.

	<i>ON</i>	<i>OFF</i>	<i>Incrementati</i>	<i>Decrementati</i>	<i>Erratici</i>	<i>Conservati</i>	<i>Totali</i>
<b>pH 3-10</b>	26	46	88	94	254	150	404
<b>pH 4-7</b>	13	29	38	52	132	82	214

Nel *Atga3*, le proteine differenziali per intensità di espressione e per espressione *ex novo* sono inferiori rispetto al ceppo selvatico; infatti gli spot (ON) presenti *ex novo* nel *Atga3* e assenti nel P1 sono 26 nell'intervallo di pH 3-10 e 13 nell'intervallo di pH 4-7, mentre gli spot (OFF) assenti nel *Atga3* e presenti nel P1 sono 46 nell'intervallo di pH 3-10 e 29 nell'intervallo di pH 4-7. Gli spot presenti in entrambi i campioni la cui intensità ottica è almeno il doppio nel *Atga3* rispetto al P1 sono 88 nell'intervallo di pH 3-10 e 38 nell'intervallo di pH 4-7; quelli invece presenti in entrambi e la cui intensità ottica è almeno il doppio nel P1 rispetto al *Atga3* sono 94 nell'intervallo di pH 3-10 e 52 nell'intervallo di pH 4-7. Gli spot erratici sono 254 e 132 rispettivamente negli intervalli di pH 3-10 e 4-7, mentre i conservati sono 150 e 82 negli intervalli di pH 3-10 e 4-7.

Tra le proteine differenzialmente espresse in P1 e in *Atga3* sono stati scelti per l'analisi MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight) gli spot che avevano peso molecolare e punto isoelettrico simile alle proteine note coinvolte nel micoparassitismo. Laddove ciò non è stato possibile, gli spot da analizzare sono stati scelti tra gli spot on, off, incrementati, decrementati e conservati. Venti spot sono stati sottoposti a MALDI-TOF e di questi alcuni hanno un PMF tale da permettere il successivo confronto nelle banche dati.

L'analisi in banca dati delle proteine o dei geni di un organismo il cui genoma non è stato completamente sequenziato non permette un'identificazione sempre univoca delle proteine di interesse e quindi in questi casi si ricorre al CSI (cross species

identification), come descritto da Wilkins and Williams (1997). Infatti le proteine di organismi il cui genoma non è completamente noto possono essere identificate confrontando il loro PMF con il PMF di proteine di organismi ben conosciuti. La composizione aminoacidica e il peso molecolare sono parametri altamente conservati e permettono quindi di ampliare il database di proteine in cui è possibile fare la ricerca.

Tra gli spot presenti solo nel ceppo P1 cresciuto su WA in presenza di pomodoro e *R. solani* sono stati identificati con spettrometria di massa MALDI-TOF i seguenti spot:

**spot 3208** di 30 kDa ed avente punto isoelettrico (pI) di 5.8. Questo è stato identificato corrispondente ad una proteina di *N. crassa* di 35.8 kDa e pI .6.5 omologa alla proteina IME4 di *S. cerevisiae*;

**spot 7054** di 36 kDa e pI 8.6. Questo è stato identificato con una fosfatasi di 36.9 kDa e pI 8.7 di *Candida albicans* che presenta un dominio conservato PTP (protein tyrosine phosphatases);

**spot 6203** avente un peso molecolare di 33 kDa ed un punto isoelettrico di 6.8 è presente in entrambi i ceppi ma con un valore di OD doppio (pari a 30) nel ceppo P1 rispetto al ceppo difettivo. Questo è stato identificato con un fattore di trascrizione di *Aspergillus fumigatus*, di 36 kDa e pI 6.3 avente un dominio conservato WD40.

Tra le proteine intracellulari del ceppo difettivo *Atga3*, lo **spot 1414** di 40 kDa e pI di 5.0 è stato identificato con una proteina ipotetica di *C. neoformans*, di 40.6 kDa e pI 5.0 che ha un dominio conservato WD40.

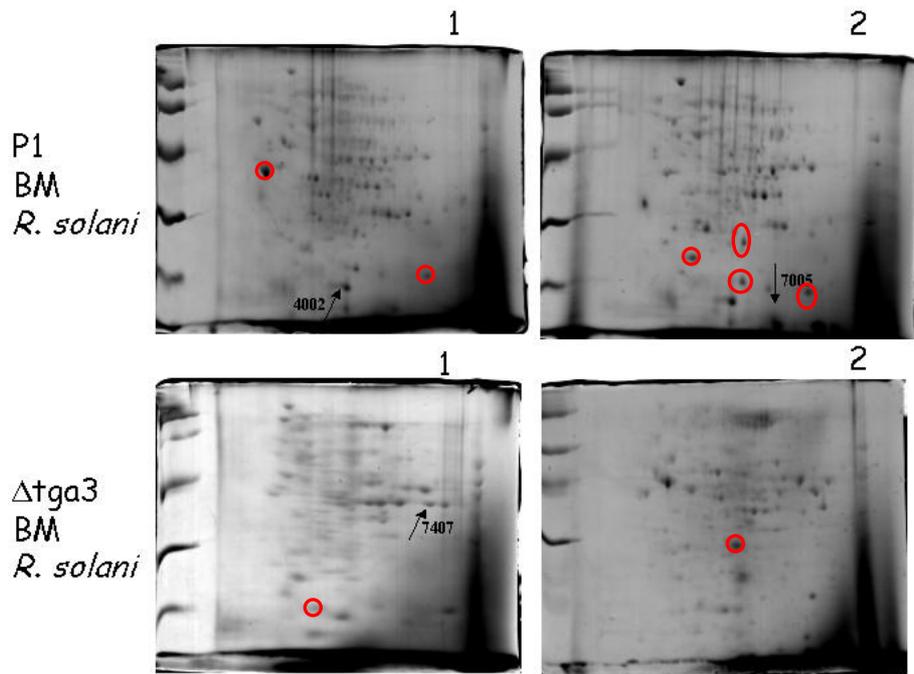
Lo **spot 7303** di 33 kDa e pI 5.8 presente in entrambi i ceppi ma espresso in quantità doppia (OD=22) nel *Atga3*, è stato identificato con la glucosamina fosfato N-acetyltransferasi di *M. grisea* di 20 kDa e pI 5.0.

Tra gli spot “ON”, presenti solo nel *Atga3*, il **2101** di 28 kDa e pI 4.8 risulta simile a una proteina di *Giberella zeae* di 14 kDa e pI 5.9 (tabella 3.7) con il dominio conservato per una GKAP (GMP-Kinase Anchor Protein).

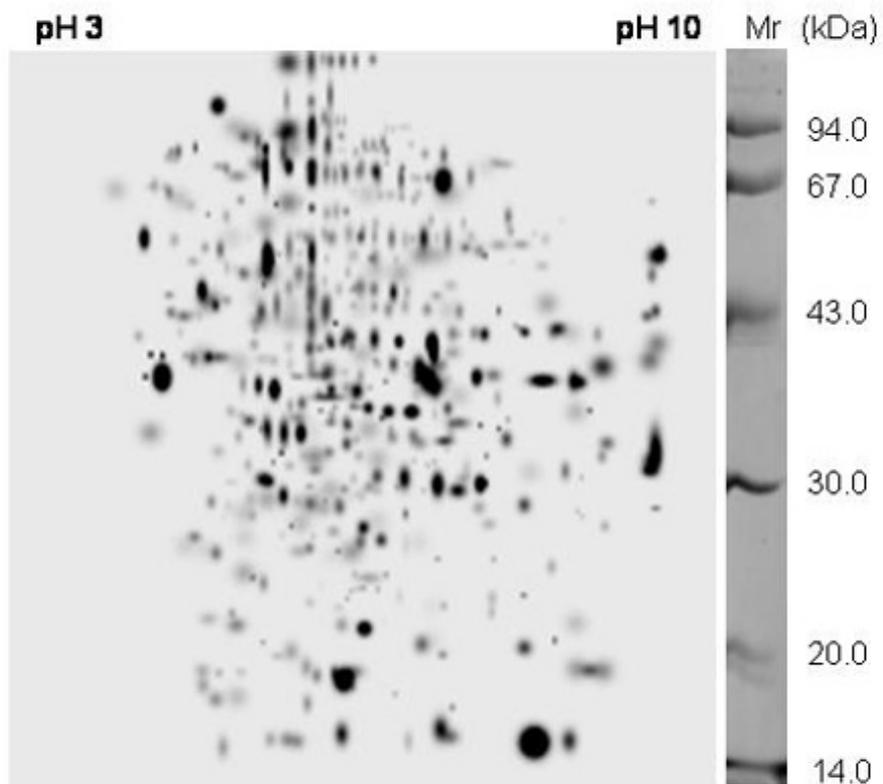
### **3.12 Analisi proteomica delle proteine intracellulari di *Atga3* e P1 cresciuti in substrato liquido**

Le proteine intracellulari (200 µg) di P1 e del *Atga3* cresciuti in SM 1X con aggiunta di 1% (p/v) di biomassa (BM) di *R. solani* sono state separate su strip, pH 3-10 e pH 4-7 e sono state ottenute le mappe proteomiche riportate in figura 3.13A2 e B2. I gel 2D da cui sono state originate le mappe proteomiche sono riportati in figura 3.13A1 per l'intervallo di pH 3-10 e 3.13B1 per l'intervallo di pH 4-7.

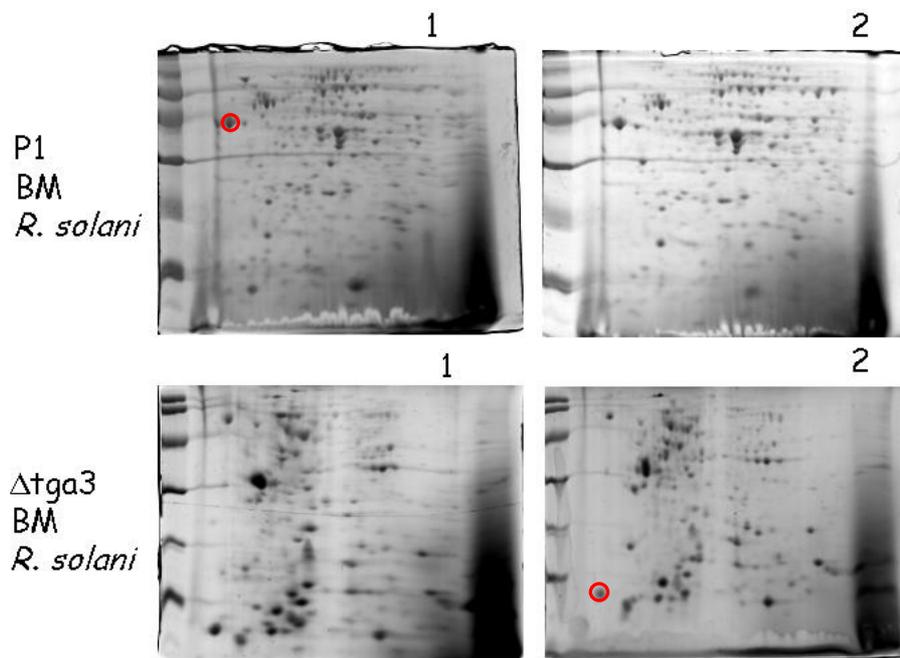
A1)



A2)



B1)



B2)

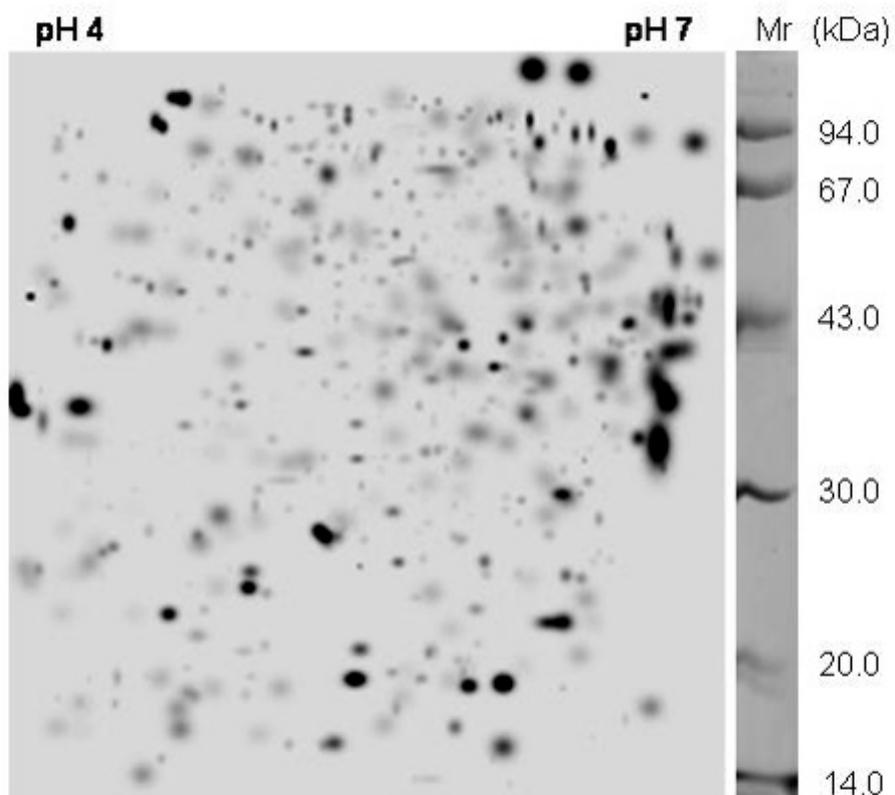


Figura 3.13: gel bidimensionali delle proteine intracellulari di *Atga3* e P1 cresciuti in SM 1X con aggiunta di 1% di BM di *R. solani* separate rispettivamente su strip 7 cm con intervallo di pH 3-10 (A1) e intervallo di pH 4-7 (B1). Mappe proteomiche delle proteine intracellulari nell'intervallo di pH 3-10 (A2) e 4-7 (B2). Gli spot che sono stati identificati mediante analisi MALDI-TOF sono indicati con una freccia e il numero identificativo dello spot. Con i cerchi sono indicati gli spot il cui PMF non è interpretabile.

In tabella 3.3 sono indicati i risultati dell'analisi eseguita con il PDQUEST delle mappe proteomiche delle proteine intracellulari di *Atga3* e P1 cresciuti in SM 1X + 1% BM *R. solani* separate con strip 7 cm negli intervalli di pH 3-10 e 4-7.

Tabella 3.3: risultato dell'analisi effettuata con il software PDQUEST delle mappe proteomiche di *Atga3* e P1 riportate in figura 3.13A2 e B2.

	<i>ON</i>	<i>OFF</i>	<i>Incrementati</i>	<i>Decrementati</i>	<i>Erratici</i>	<i>Conservati</i>	<i>Totali</i>
<b>pH 3-10</b>	20	61	99	138	318	105	423
<b>pH 4-7</b>	15	40	54	60	169	43	212

Nel *Atga3* le proteine differenziali per intensità di accumulo e per produzione *ex novo* sono inferiori rispetto al ceppo selvatico; infatti gli spot (ON) presenti *ex novo* nel *Atga3* e assenti nel P1 sono 20 nell'intervallo di pH 3-10 e 15 nell'intervallo di pH 4-7, mentre gli spot (OFF) assenti nel *Atga3* e presenti nel P1 sono 61 nell'intervallo di pH 3-10 e 40 nell'intervallo di pH 4-7. Gli spot presenti in entrambi i campioni la cui intensità ottica è almeno il doppio nel *Atga3* rispetto al P1 sono 99 nell'intervallo di pH 3-10 e 54 nell'intervallo di pH 4-7; quelli invece presenti in entrambi e la cui intensità è almeno doppia nel P1 rispetto al *Atga3* sono 138 nell'intervallo di pH 3-10 e 60

nell'intervallo di pH 4-7. Gli spot erratici sono 318 e 169 rispettivamente negli intervalli di pH 3-10 e 4-7, mentre i conservati sono 105 e 43 negli intervalli di pH 3-10 e 4-7.

Sono stati analizzati con analisi MALDI-TOF 13 spot ma di questi solo alcuni sono stati identificati.

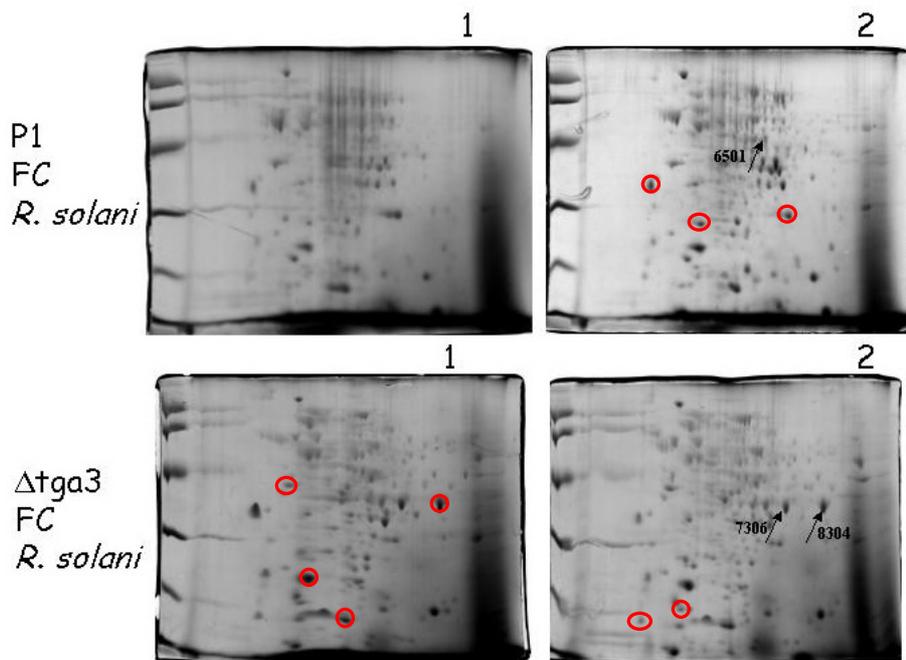
Lo **spot 7005** di 36 kDa e pI 8.0 presente solo in P1 è stato identificato con una proteina 14-3-3 di *Trichoderma reesei* di 30 kDa e pI di 4.9.

Lo **spot 7407** di 55 kDa e pI 7.0, la cui espressione è conservata, è stato identificato con una  $\beta$ -1,3-glucosidase di *Schizosaccharomyces pombe* di 53.5 kDa e pI 5.7 (tabella 3.7).

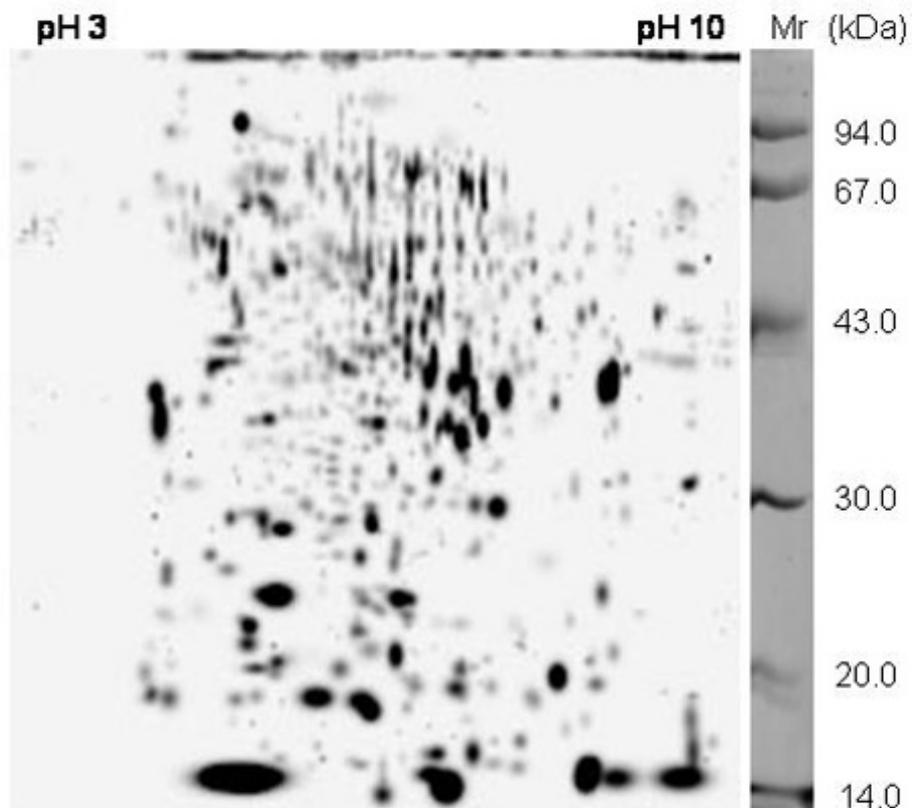
E' stato analizzato il proteoma delle proteine intracellulari del ceppo P1 di *T. atroviride* e del *Atga3* cresciuti in substrato liquido in presenza del filtrato colturale (FC) di *R. solani*. In figura 3.14 sono riportate le mappe proteomiche delle proteine intracellulari separate con strip di 7 cm negli intervalli di pH 3-10 (3.14A2) e 4-7 (3.14B2) e i gel da cui sono queste originate (3.14A1 e B1).

In tabella 3.4 sono riportati i risultati dell'analisi con il software PDQUEST delle mappe proteiche di seguito riportate.

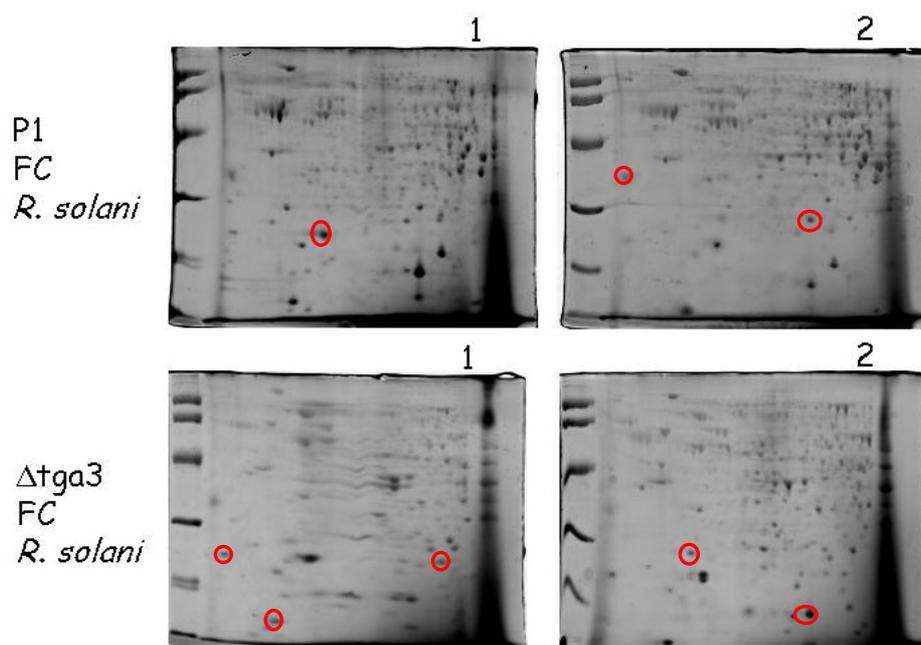
A1)



A2)



B1)



B2)

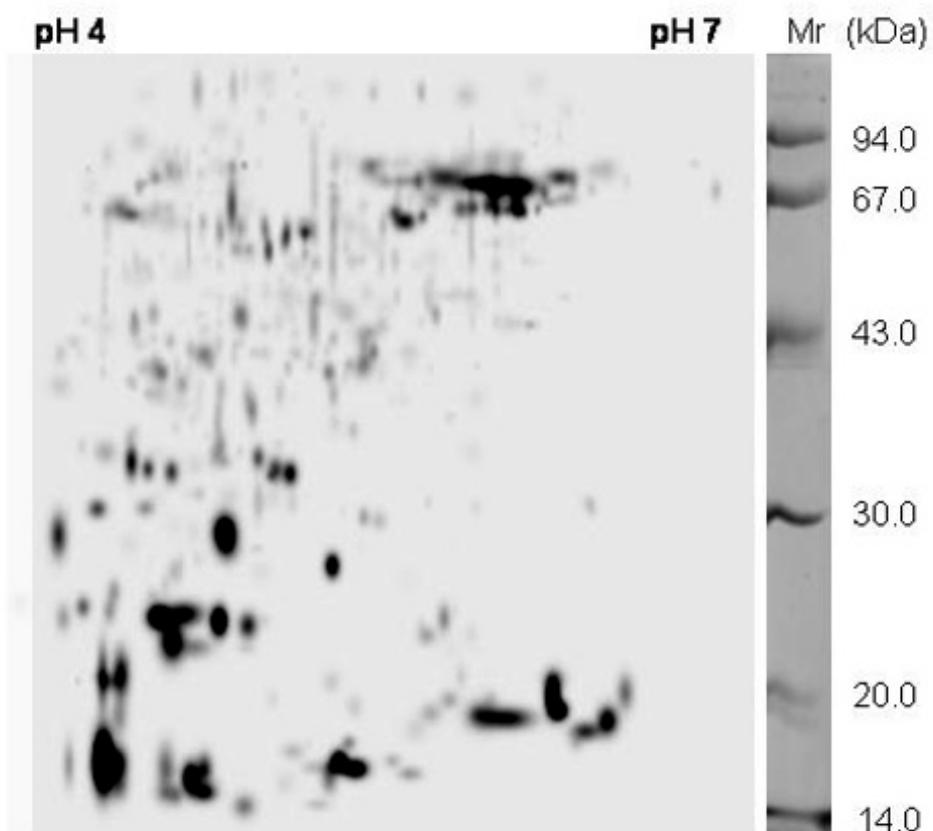


Figura 3.14: gel bidimensionali delle proteine intracellulari di *Δtga3* e P1 cresciuti in FC *R. solani* separate rispettivamente su strip 7 cm con intervallo di pH 3-10 (A1) e intervallo di pH 4-7 (B1). Mappe proteomiche delle proteine intracellulari nell'intervallo di pH 3-10 (A2) e 4-7 (B2). Gli spot che sono stati identificati mediante analisi MALDI-TOF sono indicati con una freccia e il numero identificativo dello spot. Con i cerchi sono indicati gli spot il cui PMF non è interpretabile.

Tabella 3.4: risultato dell'analisi effettuata con il software PDQUEST delle mappe proteomiche delle proteine intracellulari di *Δtga3* e P1 cresciuti in FC di *R. solani*, riportate in figura 3.14A2 e B2.

	<i>ON</i>	<i>OFF</i>	<i>Incrementati</i>	<i>Decrementati</i>	<i>Erratici</i>	<i>Conservati</i>	<i>Totali</i>
<b>pH 3-10</b>	23	28	140	179	370	120	490
<b>pH 4-7</b>	16	15	83	89	203	73	276

Nel *Δtga3* le proteine differenziali per intensità di espressione e per espressione *ex novo* sono inferiori rispetto al ceppo selvatico; infatti gli spot (ON) presenti *ex novo* nel *Δtga3* e assenti nel P1 sono 23 nell'intervallo di pH 3-10 e 16 nell'intervallo di pH 4-7, mentre gli spot (OFF) assenti nel *Δtga3* e presenti nel P1 sono 28 nell'intervallo di pH 3-10 e 15 nell'intervallo di pH 4-7. Gli spot presenti in entrambi i campioni la cui intensità ottica è almeno il doppio nel ceppo difettivo rispetto al P1 sono 140 nell'intervallo di pH 3-10 e 83 nell'intervallo di pH 4-7. Gli spot presenti in entrambi e la cui intensità è almeno il doppio nel P1 rispetto al *Δtga3* sono 179 nell'intervallo di pH 3-10 e 89 nell'intervallo di pH 4-7. Gli spot erratici sono 370 e 203 rispettivamente negli intervalli di pH 3-10 e 4-7, mentre i conservati sono 120 e 73 negli intervalli di pH 3-10 e 4-7.

Tra le proteine differenzialmente espresse sono stati analizzati con la tecnica MALDI-TOF 20 spot, ma solo per alcuni di essi è stato possibile effettuare l'analisi in banca dati.

Lo **spot 6501** di 43 kDa e pI di 6.5 presente solo in P1 è stato identificato con un'ipotetica proteina di 66.7 kDa e pI 6.13 di *U. maydis* che presenta il dominio conservato WD40.

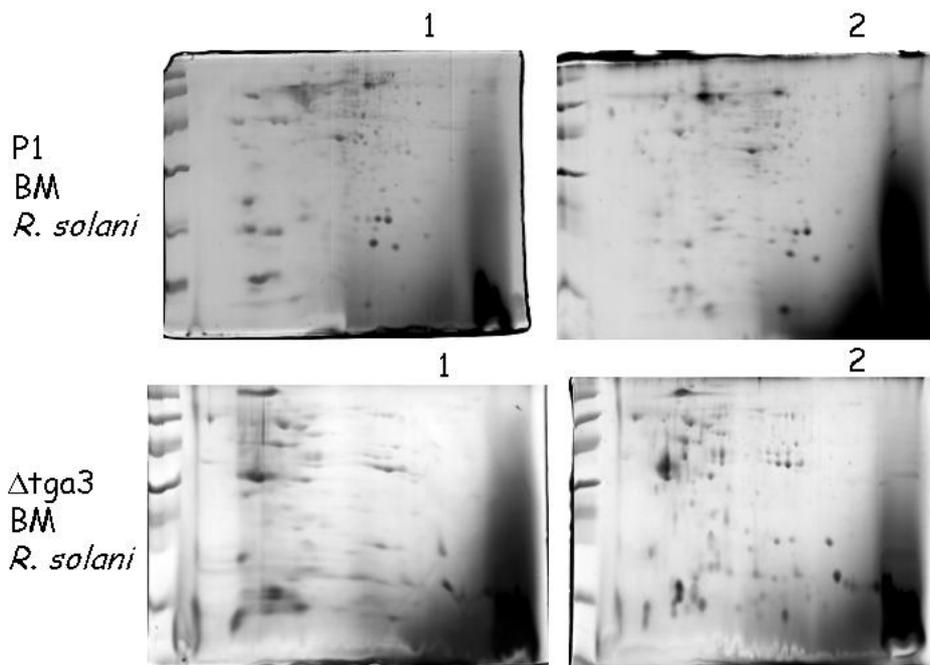
Lo **spot 8304** di 34 kDa e pI 8.7 presente solo nel ceppo difettivo è stato identificato con una endoglucanasi di classe V di *Humicola insolens* di 11 kDa e pI 6.5.

### **3.13 Analisi proteomica delle proteine esocellulari di P1 e $\Delta tga3$ cresciuti in substrati liquidi**

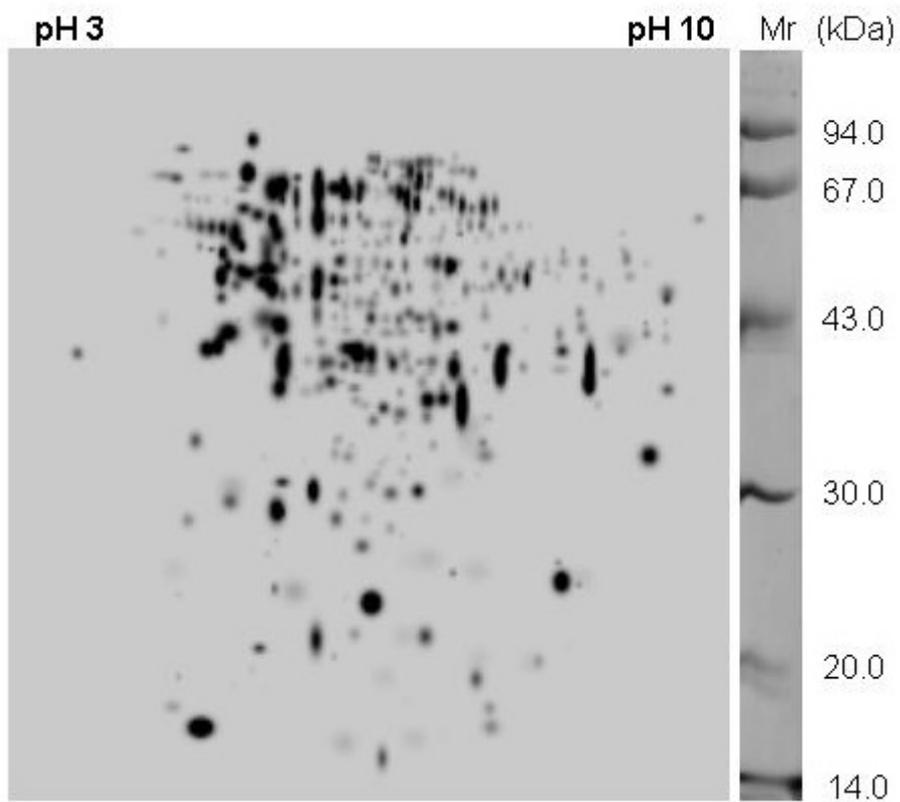
Come precedentemente indicato sono state confrontate le miscele proteiche delle proteine esocellulari del  $\Delta tga3$  cresciuto in SM 1X con aggiunta di 1% di BM (biomassa) di *R. solani* con quelle del P1 cresciuto nelle medesime condizioni.

In figura 3.15 sono riportate le mappe delle proteine esocellulari separate con strip di 7 cm con intervallo di pH 3-10 (A2) e intervallo di pH 4-7 (B2) di  $\Delta tga3$  e P1 cresciuti in SM 1X + BM *R. solani* e i gel da cui sono state originate le mappe (3.15A1 e B1).

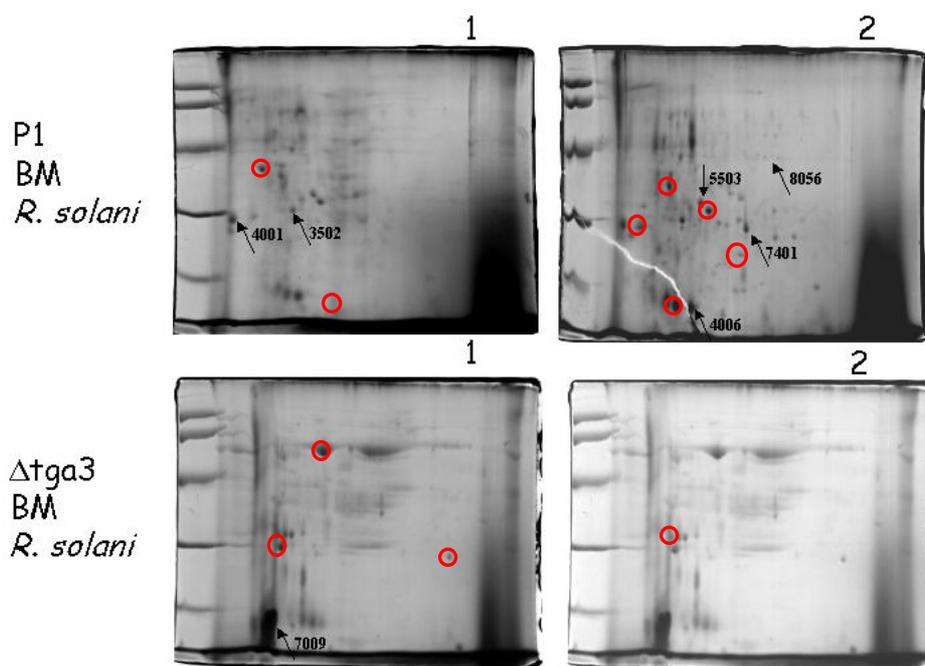
A1)



A2)



B1)



B2)

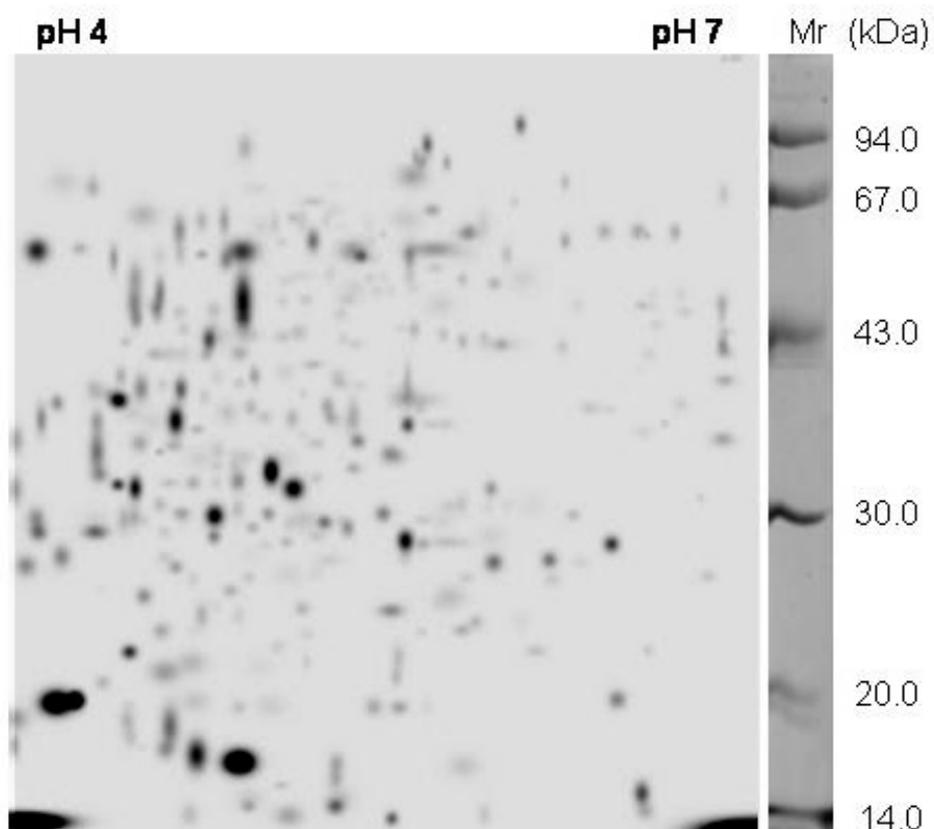


Figura 3.15: gel bidimensionali delle proteine esocellulari di *Δtga3* e P1 cresciuti in SM 1X con aggiunta di 1% (p/v) di biomassa di *R. solani* separate rispettivamente su strip 7 cm con intervallo di pH 3-10 (A1) e intervallo di pH 4-7 (B1). Mappe proteomiche delle proteine intracellulari nell'intervallo di pH 3-10 (A2) e 4-7 (B2). Gli spot che sono stati identificati mediante analisi MALDI-TOF sono stati indicati con una freccia e il numero identificativo dello spot. Con i cerchi sono indicati gli spot il cui PMF non è interpretabile.

In tabella 3.5 sono riportati i risultati dell'analisi delle mappe proteomiche delle proteine esocellulari di *Δtga3* e P1 cresciuti in SM 1X+ 1% (p/v) BM *R. solani* separate su strip 7 cm intervallo di pH 3-10 e intervallo di pH 4-7.

Tabella 3.5: risultato dell'analisi effettuata con il software PDQUEST delle mappe proteomiche di *Δtga3* e P1 cresciuti in SM 1X+1% (p/v) BM *R. solani*, riportate in figura 3.15A2 e B2.

	<i>ON</i>	<i>OFF</i>	<i>Incrementati</i>	<i>Decrementati</i>	<i>Erratici</i>	<i>Conservati</i>	<i>Totali</i>
<b>pH 3-10</b>	17	23	40	59	139	30	169
<b>pH 4-7</b>	9	15	14	25	63	22	85

Nel *Δtga3* le proteine differenziali per intensità di espressione e per espressione *ex novo* sono inferiori rispetto al ceppo selvatico; infatti gli spot (ON) presenti *ex novo* nel *Δtga3* e assenti nel P1 sono 17 nell'intervallo di pH 3-10 e 9 nell'intervallo di pH 4-7, mentre gli spot (OFF) assenti nel *Δtga3* e presenti nel P1 sono 23 nell'intervallo di pH 3-10 e 15 nell'intervallo di pH 4-7. Gli spot presenti in entrambi i campioni la cui intensità ottica è almeno il doppio nel *Δtga3* rispetto al P1 sono 40 nell'intervallo di pH 3-10 e 14 nell'intervallo di pH 4-7; quelli invece presenti in entrambi e la cui intensità è

almeno il doppio nel P1 rispetto al *Atga3* sono 59 nell'intervallo di pH 3-10 e 25 nell'intervallo di pH 4-7. Gli spot erratici sono 139 e 63 rispettivamente negli intervalli di pH 3-10 e 4-7, mentre i conservati sono 30 e 22 negli intervalli di pH 3-10 e 4-7.

Di 18 spot differenzialmente espressi è stata eseguita l'analisi di spettrometria di massa MALDI-TOF. La ricerca in banche dati del PMF delle proteine è stata eseguita come descritto precedentemente per le proteine intracellulari. La problematica principale affrontata con lo studio delle proteine esocellulari di *T. atroviride* ceppo P1 e *Atga3* è stata la scarsa informazione a disposizione in banca dati delle proteine esocellulari nel regno fungino.

Lo **spot 7009** di 17 kDa e pI 4.5 è presente in entrambi i ceppi ma in *Atga3* presenta un OD doppio (pari a 40) rispetto al P1 ed è stato identificato con il precursore dell'elicatore NIP1 di *Rhinchosporium secalis* proteina di 8.8 kDa e pI 8.0.

Tra gli spot OFF, ovvero presenti solo nel P1, dall'analisi in banca dati dei PMF risulta che:

lo **spot 3502**, di 35kDa e pI 5.4, ha dato un'alta omologia con il PMF di un  $\beta$ -1,4-glucanasi di *Neocallimastix frontalis* di 54.6 kDa e pI 4.8;

lo **spot 7401** di 35 kDa e pI 4.5, è stato identificato con una proteasi acida di *Candida boidinii* di 45 kDa e pI 4.7;

lo **spot 4001** avente un peso molecolare di 27 kDa e pI 4.0 è stato identificato con una serina proteasi di *Bionectria ochroleuca* di 24.8 kDa e pI 10.0;

lo **spot 8056**, di 43 e pI 5.8, è stato identificato con un antigene di 44 kDa e pI 6.2 avente il dominio conservato MSG (major surface glycoprotein) di *Pneumocystis carinii*;

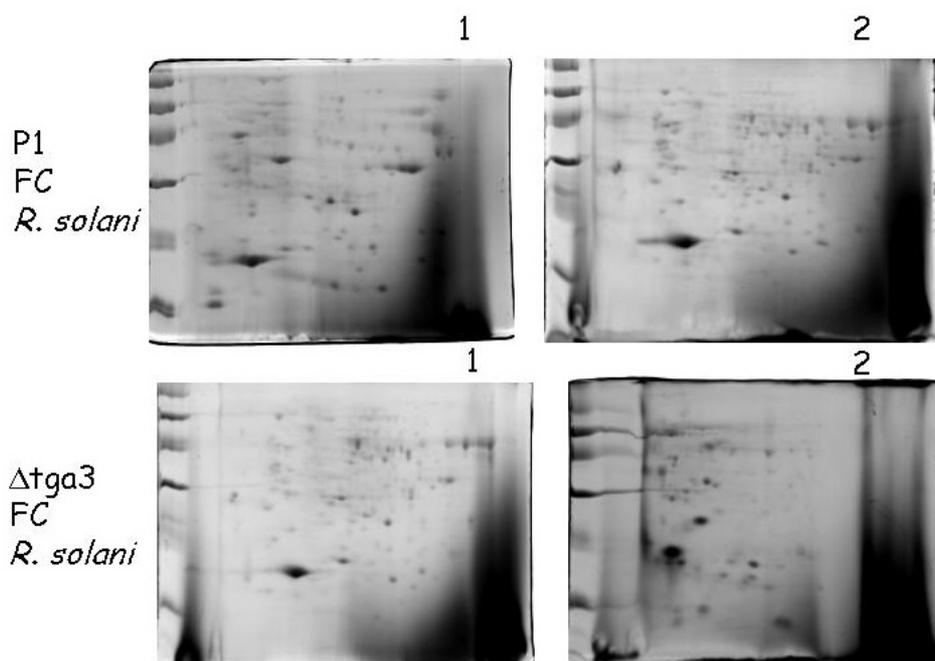
lo **spot 5503** di 33 kDa e pI 5.7 è stato identificato con una  $\beta$ -xilanase di *Bacillus* spp di 60 kDa e pI di 5.8;

lo **spot 1836** di 47 kDa e pI 4.8 è stato identificato con una chitinasi di *Rhizopus microsporus* di 45.7 kDa e pI 6.

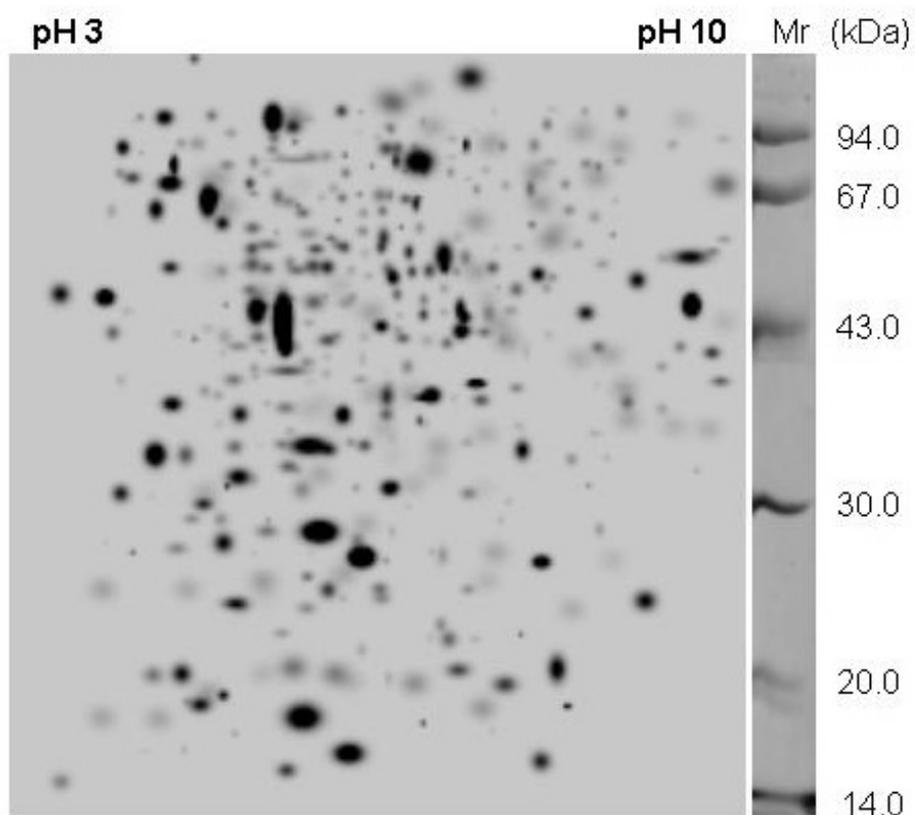
Tra le proteine decrementate, lo **spot 4006** di 28 kDa e pI 5.0, con un valore di OD doppio (pari a 20) nel P1, è stato identificato con una proteina di 30 kDa e pI 9.6 di *Ustilago maydis* avente il dominio conservato tipico delle proteine esocellulari correlate con la patogenicità (tabella 3.8).

Dall'estrazione delle proteine esocellulari di P1 e  $\Delta tga3$  cresciuti nel filtrato colturale (FC) di *R. solani* sono stati ottenuti i gel 2D negli intervalli di pH 3-10 (A1) e 4-7 (B1) e le mappe proteomiche intervallo di pH 3-10 (A2) e intervallo di pH 4-7 (B2) riportate in figura 3.16.

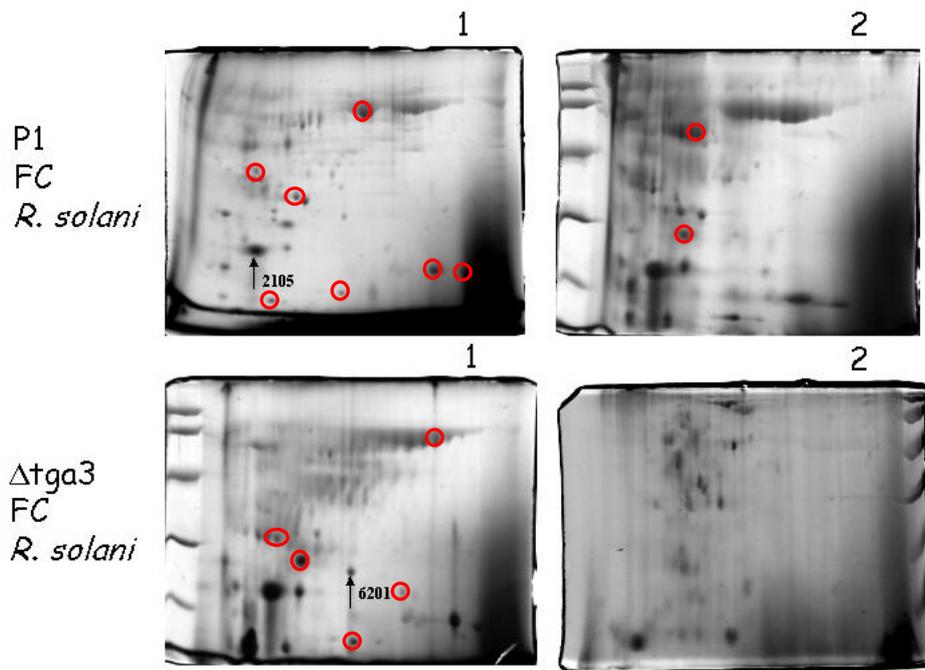
A1)



A2)



B1)



B2)

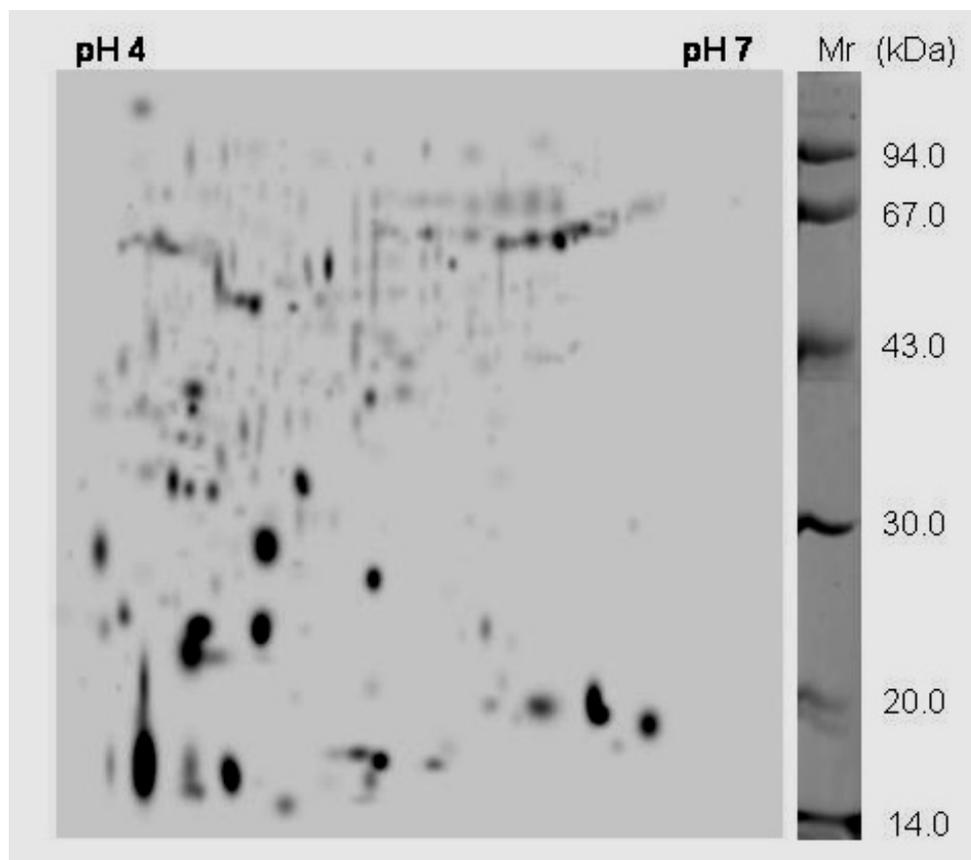


Figura. 3.16: gel bidimensionali delle proteine esocellulari di *Δtga3* e P1 cresciuti in FC di *R. solani* separate rispettivamente su strip 7 cm con intervallo di pH 3-10 (A1) e intervallo di pH 4-7 (B1). Mappe proteomiche delle proteine esocellulari nell'intervallo di pH 3-10 (A2) e 4-7 (B2). Gli spot che sono stati identificati mediante analisi MALDI-TOF sono indicati con una freccia e il numero identificativo dello spot. Con i cerchi sono indicati gli spot il cui PMF non è interpretabile.

In tabella 3.6 sono indicati i risultati dell'analisi del proteoma delle proteine esocellulari di *Δtga3* e P1 cresciuti in FC di *R. solani* separate con strip intervallo di pH 3-10 e intervallo di pH 4-7.

Tabella 3.6: risultato dell'analisi effettuata con il software PDQUEST delle mappe proteomiche di *Δtga3* e P1 cresciuti in FC *R. solani*, riportate in figura 3.16A2 e B2.

	<i>ON</i>	<i>OFF</i>	<i>Incrementati</i>	<i>Decrementati</i>	<i>Erratici</i>	<i>Conservati</i>	<i>Totali</i>
<b>PH 3-10</b>	13	19	35	79	146	25	171
<b>PH 4-7</b>	8	10	18	55	91	13	104

Nel *Δtga3* le proteine differenziali per intensità di espressione e per espressione *ex novo* sono inferiori rispetto al ceppo selvatico; infatti gli spot (ON) presenti *ex novo* nel *Δtga3* e assenti nel P1 sono 13 nell'intervallo di pH 3-10 e 8 nell'intervallo di pH 4-7, mentre gli spot (OFF) assenti nel *Δtga3* e presenti nel P1 sono 19 nell'intervallo di pH 3-10 e 10 nell'intervallo di pH 4-7. Gli spot presenti in entrambi i campioni la cui intensità ottica è almeno il doppio nel *Δtga3* rispetto al P1 sono 35 nell'intervallo di pH 3-10 e 18 nell'intervallo di pH 4-7; quelli invece presenti in entrambi e la cui intensità è almeno il doppio nel P1 rispetto al *Δtga3* sono 79 nell'intervallo di pH 3-10 e 55

nell'intervallo di pH 4-7. Gli spot erratici sono 146 e 91 rispettivamente negli intervalli di pH 3-10 e 4-7, mentre i conservati sono 25 e 13 negli intervalli di pH 3-10 e 4-7.

Tra gli spot differenziali analizzati tramite MALDITOF sono stati identificati:

lo **spot 6201** di 30 kDa e pI 5.5 presente in entrambi i ceppi ma in quantità doppia (20) nel ceppo *Δtga3* è stato identificato con una chitosanasi di *Fusarium solani* f. sp *robiniae* di 31 kDa e pI 5;

lo **spot 2105** di 25 kDa e pI 4.8, espresso egualmente nei due campioni è stato identificato con una N-acetylglucosamina-6-fosfato deacetilasi di *Haemophilus somnus* di 41 kDa e pI 5.21. (tabella 3.8).

	N spot	Funzione	specie	N. accesso (GI)	MW Teorico (KDa)	MW osservato (KDa)	pI teorico	pI osservato	coverage (%)
<b>WA</b>									
P1	<b>3208</b>	IME4 fattore di trascrizione	<i>Neurospora crassa</i>	32417112	35.8	30	6.5	5.8	18
P1	<b>7054</b>	PTP, protein tyrosine phosphatase	<i>Candida albicans</i>	46436787	36.9	36	8.7	8.6	22
<b>P1-<i>Atga3</i></b>	<b>6203</b>	WD40 Regolatore della trascrizione	<i>Aspergillus fumigatus</i>	41581315	36	33	6.3	6.8	30
<i>Atga3</i>	<b>1414</b>	WD40 Proteina ipotetica	<i>Cryptococcus neoformans</i>	50260567	40.6	40	5.3	5	18
<b>P1-<i>Atga3</i></b>	<b>7303</b>	Glucosammina fosfato N-acetil transferase	<i>Magnaporthe grisea</i>	38100467	20	33	5.0	5.8	26
<i>Atga3</i>	<b>2101</b>	proteina GKAP	<i>Giberella zeae</i>	42549616	14	28	5.9	4.8	36
<b>BM</b>									
P1	<b>7005</b>	14-3-3	<i>Trichoderma reesei</i>	CAC20378	30	36	4.9	8.0	15
<b>P1-<i>Atga3</i></b>	<b>7407</b>	$\beta$ -1,3-glucosidasi	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	19113016	53.5	55	5.7	7.0	17
<b>FC</b>									
<b>P1</b>	<b>6501</b>	WD40 Proteina ipotetica	<i>Ustilago maydis</i>	46098287	66.7	43	6.1	6.5	15
<i>Atga3</i>	<b>8304</b>	Endoglucanasi di classe V	<i>Humicola insolens</i>	1ENG2	11	34	6.5	8.7	27

Tabella 3.7: tabella riassuntiva dell'identificazione delle proteine intracellulari di *T. atroviride* ceppo selvatico P1 e mutante *Atga3* cresciuti in diverse condizioni: WA (sistema a "tre" *Trichoderma* + pomodoro + *R. solani*), BM (Salt Medium 1 X + 1% (p/v) di biomassa di *R. solani*) e FC (filtrato colturale di *R. solani*). In grassetto è stato evidenziato il campione in cui lo spot ha un OD maggiore. (coverage: percentuale di appaiamento tra i PMF della proteina analizzata e quella presente in banca dati).

Tabella 3.8: tabella riassuntiva dell'identificazione delle proteine esocellulari di *T. atroviride* ceppo selvatico P1 e mutante *Atga3* cresciuti in diverse condizioni: BM (Salt Medium + 1% (p/v) di biomassa di *R. solani*) e FC (filtrato culturale di *R. solani*). In grassetto è stato evidenziato il ceppo in cui lo spot ha un OD maggiore. (coverage: percentuale di appaiamento tra i PMF della proteina analizzata e quella presente in banca dati)

	N° spot	Funzione	specie	N° accesso (GI)	MW Teorico (KDa)	MW osservato (KDa)	pI teorico	pI osservato	<b>coverage (%)</b>
<b>BM</b>									
P1- <i>Atga3</i>	<b>7009</b>	Elicitore NIP1	<i>Rhinosporium secalis</i>	2147813	8.8	17	8.0	4.5	81
P1	<b>3502</b>	β-1,4-glucanasi	<i>Neocallimastix frontalis</i>	3712668	54.6	35	4.8	5.4	19
P1	<b>7401</b>	Proteasi acida	<i>Candida boidinii</i>	30024582	45	35	4.7	4.5	13
P1	<b>4001</b>	Serina proteasi	<i>Bionectria ochroleuca</i>	38327027	24.8	27	10.0	4.0	28
P1	<b>8056</b>	Antigen, MSG-major surface protein	<i>Pneumocystis carinii</i>	309820	44	43	6.2	5.8	34
P1- <i>Atga3</i>	<b>4006</b>	Pathogenesis Related protein	<i>Ustilago maydis</i>	46096755	30	28	9.6	5.0	25
P1	<b>5503</b>	β-xylanasi	<i>Bacillus spp</i>	46096755	60	33	5.8	5.7	15
P1	<b>1836</b>	chitinasi	<i>Rhizopus microsporus</i>	1565203	45.7	47	6.0	4.8	18
<b>FC</b>									
P1- <i>Atga3</i>	<b>6201</b>	chitosanasi	<i>Fusarium solani</i>	22474525	31	30	5.5	5.5	19
P1- <i>Atga3</i>	<b>2105</b>	Chitina deacetilasi	f.sp. <i>robiniae</i> <i>Haemophilus somnus</i>	46156356	41	25	5.2	4.8	30



## 4 Discussione

Il micoparassita *T. atroviride* è impiegato in agricoltura come agente di biocontrollo per un ampio numero di patogeni delle piante. L'interazione micoparassita-ospite è un tipo di interazione ospite-specifica in cui i segnali provenienti dal fungo ospite sono riconosciuti dal micoparassita. In particolare i funghi del genere *Trichoderma* reagiscono alla presenza dell'ospite mediante cambiamenti morfologici, secrezione di enzimi litici ed antibiotici. I composti prodotti dall'antagonista e che agiscono direttamente sul patogeno sono stati ampiamente descritti (Lorito et al., 1994b; Kubicek et al., 2001; Rey et al., 2001; Viterbo et al., 2002), mentre sono ancora poco noti sia i fattori che attivano la risposta micoparassitica in *Trichoderma* sia le vie di trasduzione del segnale coinvolte nel biocontrollo.

Nei funghi diverse subunità  $\beta$  delle proteine G sono coinvolte nei meccanismi di patogenicità (Kasahara and Nuss, 1997; Kasahara et al., 2000). Ad esempio, i mutanti difettivi per la proteina Fgb1 di *F. oxysporum*, subunità  $\beta$  di una proteina G del gruppo I, mostrano un abbassamento dei livelli di cAMP (AMP ciclico), una ridotta patogenicità, un'alterazione della morfologia delle colonie e della frequenza di formazione e germinazione dei conidi (Jain et al., 2003).

Anche le MAP (Mitogen Activated Protein) chinasi, nei funghi, sono coinvolte nei processi di patogenicità. Isolati di *C. purpurea* difettivi per la MAP chinasi Cpmk1, omologa a Tmk1 di *T. atroviride*, non formano conidi e hanno una ridotta virulenza (Mey et al., 2003). Kojima e colleghi (2002) hanno dimostrato che la proteina Maf1 di *C. lagenarium*, MAP chinasi omologa a Tmk1, è coinvolta nel differenziamento dell'appressorio e nei meccanismi di patogenicità di questo fungo.

Le subunità  $G\alpha$  delle proteine G sono state isolate in diversi funghi. Per studiare il coinvolgimento delle subunità  $G\alpha$ , nelle diverse vie di trasduzione del segnale nei funghi sono stati generati mutanti difettivi per queste subunità tramite distruzione

genica mirata (Liu and Dean, 1997; Regenfelder et al., 1997). In diversi funghi patogeni è stato osservato che le proteine G $\alpha$  hanno un ruolo fondamentale sia durante i processi di riconoscimento dell'ospite sia nella virulenza (ad esempio la formazione delle strutture di infezione) come è stato dimostrato per le proteine MagA di *M. grisea*, Gpa3 di *U. maydis* e Cpg1 di *C. parasitica* (Liu and Dean, 1997; Regenfelder et al., 1997). Inoltre, è stato dimostrato che in *C. parasitica* Cpg1 regola l'espressione di una cellobioidrolasi I, enzima implicato nella degradazione della parete cellulare (CWDE) (Wang and Nuss, 1995; Chen et al., 1996). Le subunità G $\alpha$  fungine attivano sia la via di trasduzione del segnale che regola la produzione di messaggeri secondari, come il cAMP, sia la cascata di reazione delle MAP chinasi (Bolker, 1998).

In *Trichoderma* le subunità  $\alpha$  delle proteine G dei gruppi I, II e III, svolgono diverse funzioni. La proteina Tga1 del gruppo I, di *T. atroviride* è coinvolta nel "coiling" (avviluppamento delle ife intorno a quelle del patogeno), nella produzione di metaboliti antifungini, nella regolazione dell'espressione di chitinasi e nella formazione dei conidi (Reithner et al., 2004, Rocha-Ramirez et al., 2002). In *T. virens* sono state studiate le subunità G $\alpha$  TgaA e TgaB, la prima è coinvolta nell'antagonismo contro *S. rolfisii*, mentre TgaB sembra non avere un ruolo specifico nello sviluppo e nel micoparassitismo (Mukherjee et al., 2004). In *T. virens* oltre a queste proteine G sono state studiate anche alcune MAP chinasi, come la proteina TmkA, che è coinvolta nell'attività di biocontrollo (Mukherjee et al., 2003). Infatti, i mutanti difettivi per questa proteina hanno una ridotta capacità di controllare *S. rolfisii* e di attaccarne gli sclerozi (Mukherjee et al., 2003).

In questo lavoro sono state ottenute le sequenze complete delle proteine Tmk1, Tgb1 e Tga3, codificanti rispettivamente per una MAPK, una subunità  $\beta$  di una proteina G del gruppo I e una subunità  $\alpha$  di una proteina G del gruppo III, ed è stato studiato il livello di espressione dei loro mRNA durante le diverse fasi del micoparassitismo.

I geni *tmk1* e *tgb1* sono risultati sovra-espressi durante le prime fasi del micoparassitismo, lasciando supporre un loro diretto coinvolgimento nell'attività di biocontrollo, mentre il *tga3* è espresso in modo costitutivo durante tutte le fasi del processo. Per studiare il coinvolgimento, durante il micoparassitismo, dei geni *tmk1*, *tgb1* e *tga3* di *T. atroviride*, sono stati ottenuti mutanti difettivi per ognuno di questi tre geni tramite la trasformazione del ceppo selvatico P1. La successiva caratterizzazione è stata effettuata sul mutante difettivo per il gene *tga3*, denominato *Δtga3*, poiché le proteine G sono tra le prime ad essere coinvolte nella trasduzione del segnale e in particolare, le subunità  $\alpha$  delle proteine G dei funghi filamentosi svolgono un ruolo cruciale nella patogenicità e nei meccanismi di riconoscimento (Horwitz et al., 1999, Ivey et al., 1996; Jain et al., 2002; Kays et al., 2002; Liu e Dean, 1997; Regenfelder et al., 1997; Truesdell et al., 2000; Zuber et al., 2002).

Per studiare il coinvolgimento di Tga3 nella trasduzione del segnale durante il micoparassitismo in *T. atroviride*, è stata effettuata un'analisi morfologica, fisiologica, molecolare e proteomica di *Δtga3*.

La sequenza della proteina Tga3 è omologa ad altre subunità  $\alpha$  delle proteine G fungine del gruppo III; questo dimostra che in *Trichoderma* spp sono presenti membri di ogni gruppo di queste proteine, come è già stato descritto per *N. crassa* e *M. grisea* (Kays et al., 2000; Liu and Dean, 1997; Turner et al., 1993).

Il gene *tga3* è trascritto a livello basale, in modo costitutivo, durante le diverse fasi del micoparassitismo a prescindere dalla presenza del fungo ospite (figura 2 dei Risultati). E' stato visto che la sua espressione non è correlata con quella di Tga1. Infatti, è stato recentemente provato che la distruzione mirata del gene *tga1*, codificante per una subunità  $G\alpha$  del sottogruppo I, non altera i livelli di trascrizione di *tga3* (Reithner et al., 2004). Questo risultato è in linea con gli studi effettuati in *N. crassa*, infatti, Kays e colleghi (2000) hanno dimostrato che l'inattivazione di uno dei geni delle subunità  $G\alpha$  non ha effetti sulle altre subunità  $\alpha$ .

I mutanti difettivi *Atga3* non producono ife aeree, hanno un tasso di crescita ridotto e formano in modo permanente conidi su terreno solido, così come riportato per il ceppo *Agna-3* di *N. crassa* (Kays et al., 2000). Nel ceppo *Atga3* non si osserva conidiogenesi in coltura liquida e i conidi mostrano una riduzione e un ritardo nella germinazione rispetto al ceppo selvatico. E' stato recentemente riportato che GasC, una subunità  $\alpha$  di una proteina G di tipo III, di *Penicillium marneffei* è coinvolta nella regolazione della germinazione (Zuber et al., 2003).

Nella trasduzione del segnale un esempio noto di secondo messaggero è il cAMP, che regola l'espressione genica mediante l'attivazione delle proteine CREB (cAMP response element binding protein). Le proteine G possono attivare l'adenilato ciclasi inducendo un aumento del livello di cAMP. Nei funghi le proteine del gruppo I delle subunità  $\alpha$ , omologhe alle subunità  $G\alpha_i$  dei mammiferi, inibiscono l'adenilato ciclasi (Turner and Borkovich, 1993), mentre i componenti del gruppo III influiscono positivamente sui livelli di cAMP e sull'attività dell'adenilato ciclasi, come le subunità  $G\alpha_s$  dei mammiferi.

Fanno parte del gruppo III le proteine  $G\alpha$  fungine quali la Cpc-2 di *C. parasitica* (Gao and Nuss, 1996), la Gna-3 di *N. crassa* (Kays et al., 2000) e la Gpa3 di *U. maydis* (Regenfelder et al., 1997). È stato osservato che i mutanti difettivi per queste subunità  $\alpha$  ristabiliscono il fenotipo selvatico dopo l'aggiunta di cAMP nel mezzo di crescita. E' stato verificato se alterazione fenotipica del mutante *Atga3* di *T. atroviride* fosse legata eventualmente ad un abbassamento dei livelli intracellulari di cAMP. La persistenza del fenotipo ipersporulante, dopo l'aggiunta di cAMP esogeno al terreno colturale del fungo, ha invece dimostrato un'assenza di coinvolgimento di Tga3 in questo processo (figura 5B dei risultati). Quindi, contrariamente a quanto è stato riportato per altre subunità  $\alpha$  del gruppo III, Tga3 sembra non influire positivamente sui livelli di cAMP. Anche in *M. grisea* è stata osservata un'anomalia nei modelli di trasduzione del segnale dipendente dalle proteine G. Infatti, i mutanti difettivi per MagB, subunità  $G\alpha$  del

gruppo I, ristabiliscono il fenotipo selvatico dopo l'aggiunta di cAMP nel terreno colturale, sebbene questa classe di proteine normalmente deprime la formazione di questo composto (Liu and Dean, 1997)

I risultati riportati in questo lavoro di tesi fanno supporre che la distruzione del gene *tga3* possa aver causato una alterazione dell'espressione di proteine coinvolte nei meccanismi di regolazione della duplicazione cellulare. Infatti, mediante analisi proteomica delle proteine intracellulari del ceppo P1 è stata identificata una proteina (spot 7054-Tabella 3.7) omologa ad una protein-tirosina fosfatasi (PTP) di *C. albicans*. Le PTP catalizzano la defosforilazione dei peptidi fosforilati nella tirosina e, insieme alle protein-tirosina chinasi, regolano i livelli di fosforilazione di questi peptidi che sono coinvolti nella trasduzione del segnale (Krueger et al., 1990; Guan et al., 1991; den Hertog et al., 1995; Tracy et al., 1995; Tertoolen et al., 2001; Blanchelot and den Hertog, 2000). Le PTP possono essere sia proteine transmembrana, legate a recettori, sia citosoliche, non legate a recettore (Maeda et al., 1993; Harder et al., 1998). In lievito le PTP sono attivate quando la cellula è in condizioni di privazione d'azoto (Guan et al., 1992) e durante la mitosi (Maeda et al., 1993), come nel caso delle PTP  $\alpha$  dei fibroblasti (Petroni and Sap, 2000; Taylor and Shalloway, 1996) che attivano la duplicazione cellulare (Zheng and Shalloway, 2001). È stato osservato che le PTP (Schwartz et al., 1995) sono attivate sia dai recettori dei fattori di crescita sia dalle molecole di adesione, che sono necessarie per la proliferazione e il differenziamento cellulare (Fashena and Zinn, 1995). L'assenza nel ceppo difettivo della proteina omologa a una PTP (spot 7054-Tabella 3.7) potrebbe spiegare la sua ridotta capacità di crescita rispetto al ceppo selvatico.

La crescita ridotta di *Δtga3* potrebbe essere connessa anche con l'attivazione nel mutante di una proteina (spot 2101 - Tabella 3.7), omologa a una GKAP (cGMP dependent protein kinase anchoring protein) di *Danio rerio*. È stato dimostrato che le proteine GKAP sono coinvolte nei meccanismi di trasduzione del segnale che

inibiscono la proliferazione cellulare nei fibroblasti cardiaci (Fiedler and Wollert, 2004; Smolenski et al., 2004).

In *Trichoderma*, similmente ad altri funghi filamentosi, la conidiogenesi è attivata da un segnale luminoso (Betina, 1995; Gao and Nuss, 1996; Roncal and Ugalde, 2003; Yager et al., 1998) ed essa non avviene se il fungo cresce al buio. I mutanti difettivi per Tga3 formano conidi sia quando vengono fatti crescere in condizioni di buio sia se esposti alla luce come avviene nei mutanti difettivi per *tga1* (Reithner et al., 2004; Rocha-Ramirez et al., 2002). Questi risultati suggeriscono che in *T. atroviride* entrambe le proteine G $\alpha$  Tga1 e Tga3 regolano i meccanismi di conidiogenesi, condividendo a valle componenti della trasduzione del segnale. La sovrapposizione dei ruoli di diverse subunità G $\alpha$  è stata precedentemente dimostrata sia in *N. crassa*, dove Gna-1 e Gna-3 regolano la sporulazione (Ivey et al., 1996; Kays et al., 2000), che in *P. marneffei*, in cui la trasduzione del segnale, mediata da GasA e GasC, regola la sporulazione e la produzione del pigmento rosso (Zuber et al., 2002; Zuber et al., 2003). L'ipotesi che Tga3 sia coinvolta nei meccanismi di regolazione della sporulazione è stata supportata anche dall'identificazione, tramite analisi MALDI-TOF, di una proteina intracellulare (spot 3208 - Tabella 3.7), espressa solo nel P1, omologa a una proteina di *N. crassa* con il dominio conservato IME4 caratteristico degli attivatori trascrizionali coinvolti nella trasduzione del segnale. Shah e Clancy (1992) hanno dimostrato che IME4 regola in *S. cerevisiae* i meccanismi di sporulazione. In particolare, IME4 in *S. cerevisiae* promuove la sporulazione nelle cellule diploidi MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$  quando esse sono in condizioni di stress nutrizionali, e nelle cellule incapaci di sporulare (*mat-insufficient*). I fattori MAT di *S. cerevisiae* regolano la sporulazione in due modi indipendenti ed antagonisti: tramite RME1 che la reprime e mediante IME4 che la attiva (Shah and Clancy, 1996; Clancy et al., 2002).

Oltre alla regolazione della crescita e della sporulazione, Tga3 sembra rivestire un ruolo importante nel micoparassitismo. Infatti, il ceppo  $\Delta tga3$  perde la sua patogenicità nei

confronti dei funghi ospiti *R. solani* e *B. cinerea* (figura 6 dei Risultati). Mediante saggi *in vitro* dell'inibizione della germinazione delle spore di *B. cinerea* è stata analizzata l'attività antifungina del filtrato colturale di *Atga3* allevato in condizioni inducenti le chitinasi, che come è noto sono importanti per l'attività di biocontrollo in *Trichoderma* (Kubicek et al., 2001; Rey et al., 2001; Viterbo et al., 2002). E' stato osservato che senza Tga3, il filtrato colturale di *T. atroviride* è incapace di inibire la germinazione delle spore del patogeno. Il risultato di questi saggi sono stati confermati dai risultati dei saggi di biocontrollo su pianta (fagiolo) nei confronti di *R. solani* e *B. cinerea*. Infatti, negli esperimenti *in vivo* il ceppo difettivo ha mostrato una ridotta capacità di biocontrollo, rispetto al P1, verso entrambi i patogeni. Probabilmente, la residua capacità di controllare il patogeno è imputabile o alla secrezione di antibiotici (Whilhite et al., 1994; Davis et al. 1992) e/o alla competizione per lo spazio e le sostanze nutritive (Duijff et al., 1994, Silvan and Chet, 1989).

Le piante allevate in assenza del patogeno i cui semi sono stati trattati con i conidi del *Atga3* sono risultate più basse rispetto alle piante i cui semi sono stati trattati con il P1. Si deduce che il ceppo difettivo *tga3* ha una ridotta capacità di indurre nella pianta effetti benefici (Whipps, 1997). Inoltre, tra le proteine presenti in entrambi i ceppi ed espresse in maggiore quantità nel *Atga3*, è stata identificata una proteina (spot 7009 - Tabella 3.8) omologa a NIP1, un prodotto di un gene di avirulenza del fungo fitopatogeno di *Rhynchosporium secalis*. I fattori di avirulenza svolgono un ruolo fondamentale nella resistenza. L'interazione pianta-patogeno si definisce compatibile quando la pianta suscettibile è attaccata dal fungo patogeno e incompatibile quando la pianta è resistente e non si sviluppa la malattia (Laugé and De Wit, 1998). In questo caso, uno specifico elicitore (prodotto del gene di avirulenza) è riconosciuto da un recettore (prodotto dal rispettivo gene di resistenza) presente nella pianta resistente. Durante l'interazione incompatibile viene attivata la trasduzione del segnale che induce la resistenza, spesso coinvolgendo la risposta ipersensibile (RI), che per la pianta ha un

elevato costo metabolico e quindi può causare riduzione della crescita (Lamb, 1994). Gli elicitori NIP1, NIP2 e NIP3 di *R. secalis* sono peptidi di basso peso molecolare che inducono necrosi, sono stati purificati dal filtrato colturale e agiscono come tossine aspecifiche su orzo, altri cereali e fagiolo (Wevelsiep, 1993). Nip1 attiva l'espressione delle proteine PR (pathogenesis-related) solo nelle cultivar di orzo che posseggono il gene di resistenza Rrs1 (resistance to *R. secalis*). Steiner-Lange e collaboratori (2003) hanno analizzato l'espressione dei geni di difesa attivati dalla pianta dopo l'infezione di *R. secalis*, e hanno dimostrato che NIP1 induce nelle piante resistenti l'espressione di PR1, PR5 e PR9 nel mesofillo e PR10 nell'epidermide. La presenza, in P1 e in maggior quantità nel *Δtga3*, di un elicitore tipico dei funghi patogeni delle piante lascia supporre che *T. atroviride* abbia modificato nel tempo il suo rapporto con la pianta passando da parassita a mutualista e che l'espressione di Tga3 possa anche regolare i meccanismi di interazione con la pianta modulando la produzione di fattori di avirulenza.

La ridotta capacità antifungina del *Δtga3* sembra essere legata all'assenza di enzimi chitinolitici nel mezzo di coltura. La capacità antifungina di questi enzimi e il ruolo che rivestono durante il micoparassitismo, è stato ampiamente dimostrato (Kubicek et al., 2001; Rey et al., 2001; Viterbo et al., 2002). E' interessante notare che il mutante ha una notevole riduzione dei livelli esocellulari di endochitinasi e di N-acetil-glucosaminidasi. Inaspettatamente, i livelli di mRNA di *nag1* e *ech42* (figura 10 dei Risultati) sono maggiori nel mutante rispetto al P1, mentre tra i due ceppi si equivalgono i livelli di attività chitinasica intracellulare ed associata al micelio (figura 11 dei Risultati). Questi risultati sono stati confermati dallo studio delle mappe proteomiche di P1 e del *Δtga3* allevati in differenti terreni di coltura. Tramite l'analisi MALDI-TOF sono state identificate tra le proteine intracellulari una  $\beta$ -1,3-glucosidasi (spot 7407 - Tabella 3.7), presente nelle stesse quantità in entrambi i ceppi, e una endoglucanasi di classe V (spot 8304 - Tabella 3.7) presente, invece, solo nel mutante difettivo. Il ruolo delle endoglucanasi nel sistema enzimatico dei funghi appartenenti al genere *Trichoderma* è

essenziale per l'attività di biocontrollo (Lorito et al., 1994b; Kubicek et al., 2001). Gli enzimi che idrolizzano i  $\beta$ -glucani sono classificati in base al tipo di legame che scindono:  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,6 e  $\beta$ -1,4-glucanasi (Lorito et al., 1994b) e sono distinti in eso- ed endo-glucanasi. Le eso-glucanasi idrolizzano il polimero dall'estremità non riducente, dando come prodotto finale monomeri mentre le endo-glucanasi agiscono all'interno della molecola in più punti a caso, rilasciando oligosaccaridi solubili di varie dimensioni. Una endoglucanasi di classe V è stata identificata in *T. reesei* (Saloheimo et al., 1995; Saloheimo et al.; 1997; Wang et al., 2004). Nel 1995 Saloheimo e colleghi hanno clonato il gene *egl5* di *T. reesei*, appartenente a una nuova famiglia di glucanasi, contenenti un dominio catalitico chiamato EGV-CBD (cellulose-binding domain), differente dai domini catalitici delle altre endoglucanasi di *T. reesei* (van Casteren, 1999). La presenza tra le proteine intracellulari del *Atga3* di una  $\beta$ -1,3-glucosidasi dimostra, che dopo l'evento di trasformazione, l'espressione di questo enzima litico è rimasta inalterata, mentre l'espressione della endoglucanasi di classe V sembra essere attivata dalla distruzione del gene *tga3*.

Dai saggi dell'attività chitinolitica esocellulare si deduce che il ceppo difettivo per la proteina Tga3 è incapace di secernere gli enzimi chitinolitici. Infatti in questo studio mediante l'analisi proteomica, sono state messe in evidenza alcune proteine esocellulari del ceppo P1 che sono regolarmente espresse nel micoparassitismo, mentre tali proteine non sono state rilevate nel ceppo *Atga3*. E' stato dimostrato che nel *Atga3* gli enzimi litici sono regolarmente presenti tra le proteine intracellulari mentre sono scarse o assenti nei filtrati colturali. La mancata secrezione degli enzimi litici nel mutante difettivo per la Tga3 può essere dovuta ad alterazioni dei meccanismi di secrezione proteica. Questa ipotesi è stata avvalorata dall'identificazione di una proteina (spot 7005-Tabella 3.7) presente solo in P1 ed omologa alla 14-3-3 di *T. reesei*, che ha a sua volta il 98% di identità con una 14-3-3 di *T. harzianum* (Vasara et al., 2002) ed è coinvolta nei meccanismi di secrezione enzimatica. Le 14-3-3 sono proteine altamente

conservate e ubiquitarie. Nei mammiferi e nelle piante ne esistono diverse isoforme (Ferl et al., 2002; DeLille et al., 2001), mentre finora nei funghi sono state identificate solo 2 isoforme in *S. pombe* e altre 2 in *T. reesei* (Aiken, 1996; van Hemert, 2001; Vasara et al., 2002). Le 14-3-3 sono coinvolte in numerosi processi cellulari, come ad esempio nella regolazione del ciclo cellulare, apoptosi (Zha et al., 1996; Peng et al., 1997; Xinh et al., 2000), e trascrizione (Grozinger and Scheiber, 2000), interazione tra componenti di vie di traduzione del segnale (Braselman and McCormick, 1995, Chang and Rubin, 1997; Sehnke et al., 2002), modulazione di attività enzimatiche (Chung et al., 1999) e regolazione del catabolismo (Chung et al., 1999, Cotelle et al., 2000, Sehnke et al., 2001). Le 14-3-3 possono attivare la trascrizione genica mediante interazione con fattori di trascrizione bZIP (Igarashi et al., 2001) e possono agire sia come chaperonine (essenziali al mantenimento del “folding” delle proteine) sia come regolatrici della localizzazione intracellulare delle loro proteine-bersaglio (Yang et al., 1999). Il meccanismo d'azione delle 14-3-3 non è stato ancora chiarito ma si pensa che controllino la funzione dei loro bersagli agendo sulla stabilità, (Aitken, 1996) attività o localizzazione cellulare (Fu et al., 2000; Muslin and Xing, 2000). Vasara e colleghi (2002) hanno studiato in *T. reesei* due isoforme diverse di 14-3-3, *ftt1e ftt2*, capaci di complementare i mutanti negativi di lievito per i geni di *bmhp1* e *bmh2p* (proteine 14-3-3 di *S. pombe*) ristabilendo il traffico vescicolare, la secrezione enzimatica e la crescita cellulare quasi al livello del ceppo selvatico. La proteina identificata con lo spot 7005, omologa a Ftt1 di *T. reesei*, probabilmente è anch'essa coinvolta nel traffico vescicolare in *T. atroviride*. Infatti, questa proteina è presente solo nel P1 ed è assente nel ceppo *Atga3*, in cui probabilmente il sistema di secrezione enzimatica è stato danneggiato a seguito della distruzione di *tga3*.

L'alterazione del sistema di secrezione di *Atga3* potrebbe essere dovuta anche ad un'alterazione della struttura della parete cellulare. Infatti, in *A. nidulans*, la subunità  $G\alpha$  FadA e la subunità  $G\beta$  SfaD regolano il contenuto di chitina e la porosità della

parete cellulare (Coca et al., 2000). Tra le proteine intracellulari presenti in entrambi i ceppi, ma espresse in maggior quantità nel ceppo difettivo, è stata identificata una proteina (spot 7303 - Tabella 3.7) simile alla glucosamina fosfato N-acetiltransferasi, enzima chiave nella biosintesi della chitina. In lievito è stato dimostrato che la glucosamina fosfato N-acetiltransferasi è espressa in maggior quantità in condizioni ambientali difficili quando la parete fungina subisce delle alterazioni (Lagorce et al., 2002). Queste modifiche si hanno quando si verificano mutazioni o alterazioni dell'espressione dei geni connessi alla biosintesi della parete cellulare e che causano un incremento del 20-30% nella formazione di chitina. Questo incremento nella sintesi di chitina probabilmente contribuisce a rafforzare la parete cellulare e può essere considerato un meccanismo di compensazione dei danni subiti dalla parete stessa in condizioni di stress (Lagorce et al., 2002).

La maggiore espressione della glucosamina fosfato N-acetiltransferasi, nel ceppo *Δtga3* potrebbe essere connessa con un'alterazione dell'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi della parete cellulare.

Tra le proteine esocellulari di P1 sono state identificate proteine appartenenti a diverse classi di proteasi (spot 7401 e 4001 - Tabella 3.8). Durante il micoparassitismo nei funghi del genere *Trichoderma* le proteasi sono prodotte principalmente in presenza dell'ospite (Sivan and Chet, 1989) per facilitare la penetrazione del parassita (Geremia et al., 1993; Reichard et al., 2000; Kolattukudy et al., 1993; Sreedhar et al., 1999). È stato clonato e caratterizzato il gene della proteasi alcalina *prb1* di *T. harzianum* coinvolta nel micoparassitismo contro *R. solani* (Geremia et al., 1993; Flores et al., 1997). Pozo e colleghi (2004) hanno caratterizzato una serina proteasi di *T. virens* codificata dal gene *tvsp1*. I ceppi che esprimono in maggior quantità la proteina Tvsp1 hanno un'aumentata capacità di biocontrollo nei confronti del patogeno *R. solani*. Nella miscela delle proteine esocellulari di P1 oltre alle proteasi è stata identificata una β-1,4-glucanasi (spot 3502) e una chitinasi (spot 1836 - Tabella 3.8), i cui ruoli nel

micoparassitismo di *Trichoderma* sono stati ampiamente dimostrati (Lorito et al., 1994b; Kubicek et al., 2001; Rey et al., 2001; Viterbo et al., 2002) inoltre è stata identificata anche una  $\beta$ -1,4-xilanasi (spot 5503 - Tabella 3.8). Gli xilani sono i componenti principali delle emicellulose e costituiscono circa il 30% del peso secco totale delle piante superiori. (Filho et al., 1993; Filho, 1994). I polimeri di xilano sono costituiti in media da circa 150-200 residui di D-xilanopiranosio con legami  $\beta$ -1,4 e a seconda dell'origine dello xilano, possono essere legati a residui di acetile, arabinosio, glucuronato, ferulato e di cumarato (Biely et al., 1997). Per la degradazione dello xilosio è necessaria l'azione di una endo- $\beta$ -1,4-xilanasi e di una  $\beta$ -xilosidasi (Biely, 1985). La endo- $\beta$ -1,4-xilanasi idrolizza lo xilano e gli xilo-oligosaccaridi a xilobiosio. La  $\beta$ -xilosidasi idrolizza lo xilobiosio e i piccoli xilo-oligosaccaridi a D-xilosio (Biely et al., 1997). In *Trichoderma* spp. sono presenti diversi isoenzimi di  $\beta$ -xilosidasi (Ximenes et al., 1996). Tra le proteine esocellulari, espresse in eguale quantità in P1 e in *Δtga3*, è stata identificata una chitina deacetilasi (spot 2105), mentre tra le proteine presenti in entrambi ed espresse in maggior quantità nel mutante difettivo è stata identificata una chitosanasi (spot 6201). La chitina può essere degradata sinergicamente dalla chitina deacetilasi e dalla chitosanasi. La chitina deacetilasi converte la chitina nella sua forma deacetilata, ovvero il chitosano, che può essere facilmente degradato dalle chitosanasi (Nahar et al., 2004). Gli oligosaccaridi ottenuti dall'azione delle chitosanasi possono essere ulteriormente processati in monomeri dalle glucosaminidasi (Nanjo et al., 1990). Le chitina deacetilasi (Trudel and Asselin, 1990; Kafetzopolous et al., 1993) potrebbero essere importanti nei funghi patogeni per scardinare i meccanismi di resistenza della pianta (Deising and Seigrist, 1995). Infatti, molte chitinasi di pianta tagliano, preferenzialmente, i substrati altamente acetilati e la loro attività diminuisce quando si abbassa il tasso di acetilazione (Ride and Barber, 1990). Quindi una deacetilazione della chitina, presente sulla superficie delle ife che entrano in contatto con la pianta, può conferire resistenza alle chitinasi vegetali e quindi facilitare la penetrazione del fungo

nella pianta stessa. Le chitosanasi fino ad ora trovate sono state raggruppate in 5 famiglie, in base all'omologia della sequenza peptidica, e sono state ulteriormente classificate in 3 tipi, distinti in base alla modalità di degradazione del chitosano (Fukamizo et al., 1994). La presenza tra le proteine esocellulari del mutante difettivo per Tga3 di una chitosanasi e di una chitina deacetilasi suggerisce che *tga3* regola la secrezione solo di alcuni enzimi come proteasi, chitinasi e glucanasi.

Nei ceppi P1 e *Δtga3* è stata identificata una proteina (spot 4006 - Tabella 3.8), espressa maggiormente nel ceppo selvatico, avente il dominio conservato tipico delle proteine esocellulari correlate con la patogenicità. Le proteine correlate con la patogenicità sono state individuate per la prima volta nel 1970 in foglie di tabacco attaccate da TMV (tobacco mosaic virus), che mostravano la RI (Risposta Ipersensibile) (Van Loon, 1985). Le proteine PR sono spesso presenti in piccole quantità, ma si accumulano ad elevate concentrazioni sia nella cellula che negli spazi intercellulari in risposta all'attacco di un patogeno o a stress abiotici.

Nelle piante le proteine PR sono state classificate in undici famiglie (Van Loon, 1985) a seconda della funzione, delle caratteristiche sierologiche, della sequenza aminoacidica, del peso molecolare ed di altre proprietà biologiche. La classe di proteine PR comprende enzimi come glucanasi, proteasi, lisozimi, ribonucleasi, chitosanasi, perossidasi, inibitori di proteasi, proteine ricche in glicina o cisteina, taumatine, osmotine e proteine simili, per ciascun tipo si contano varie isoforme. Le prime cinque famiglie (PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5) sono le più ampiamente studiate. Ognuna di queste famiglie presenta due sottofamiglie: una che comprende le proteine di natura basica, con localizzazione vacuolare, ed una che comprende le proteine di natura acida a localizzazione esocellulare (apoplastica) (Kitajima and Sato, 1999).

Le proteine correlate con la patogenicità sono state trovate anche negli organismi umani, infatti Szyperski e collaboratori (1998) hanno dimostrato che la proteina GliPR umana (glioma pathogenesis-related) è altamente espressa nelle cellule tumorali del

cervello, ed è interessante notare che ha di omologia di sequenza del 35% con la PR14a di pomodoro, che ha un ruolo importante nel sistema di difesa della pianta (Fernandez et al., 1997).

La riduzione della capacità di biocontrollo del ceppo difettivo per *tga3* potrebbe essere causata non solo dalla ridotta attività chitinolitica dei filtrati colturali, ma anche all'incapacità di riconoscere l'ospite. In *U. maydis* la mancata espressione della proteina G $\alpha$  del gruppo III Gpa-3 porta una perdita della virulenza e l'incapacità di percepire e rispondere al segnale del feromone (Regenfelder et al., 1997). La percezione dei segnali coinvolti nel riconoscimento del fungo ospite ha un ruolo fondamentale nel micoparassitismo nel genere *Trichoderma* (Barak et al., 1985; Mukherjee et al., 2003; Mukherjee et al., 2004). I segnali derivanti dall'ospite sono molecole diffusibili, come composti a basso peso molecolare rilasciati dalla parete cellulare dell'ospite sotto l'azione delle chitinasi secrete da *Trichoderma*; questi funzionano da induttori di precontatto dei geni espressi durante l'antagonismo (Barman et al., 2004; Kullnig et al., 2000; Zeilinger et al., 1999). Nel mutante *Atga3*, probabilmente a seguito dell'evento di trasformazione, è stata causata un'alterazione nei meccanismi di riconoscimento. Infatti, tra le proteine esocellulari è stato possibile trovare solo nel ceppo selvatico P1 una proteina (spot 8056 - Tabella 3.7) omologa a MSG (Major Surface Glycoprotein). Le MSG (o glicoproteina A) sono la classe di proteine maggiormente espresse sulla superficie del fungo patogeno opportunisto *Pneumocystis carinii*, e svolgono un ruolo fondamentale nella patogenesi di questo fungo, consentendo il riconoscimento e l'adesione alle cellule polmonari dell'ospite (Zimmerman et al., 1992). Esistono molteplici forme proteiche di MSG, correlate ma diverse tra di loro; Infatti le proteine MSG sono codificate da una famiglia genica composta da circa 60-140 geni; l'abbondanza di copie geniche è importante per aumentare la variabilità genica. Solo i geni che presentano al 5' una sequenza denominata UCS (upstream conserved sequence) sono trascritti. Tuttavia, grazie a fenomeni di ricombinazione genica, l'UCS

può trasferirsi da una copia all'altra consentendo anche all'interno della stessa popolazione fungina una elevata variabilità delle MSG (Stringer and Keely, 2001). Questo sistema indica che *P. carinii* ha sviluppato un meccanismo elaborato di variabilità genica molto presumibilmente per evitare le difese dell'ospite (Mei et al., 1998).

L'identificazione di una proteina con il dominio MSG soltanto nel ceppo selvatico, lascia supporre che anche in *T. atroviride* esista un sistema di riconoscimento dell'ospite, come in *P. carinii*, che è probabilmente regolato da Tga3.

Dall'analisi delle proteine intracellulari, differenzialmente espresse in P1 e in *Atga3*, sono state identificate proteine omologhe a fattori di trascrizione aventi un dominio conservato WD40. La proteina identificata con lo spot 6203, presente in entrambi ma in maggior quantità nel ceppo P1, la proteina identificata con lo spot 1414, presente solo nel *Atga3* e la proteina identificata con lo spot 6501 (Tabella 3.7), presente solo nel ceppo selvatico, appartengono alla famiglia delle proteine con il dominio conservato WD40, che comprende più di 30 differenti componenti (Garcia-Higuera et al., 1996), suddivise in sottogruppi in base alle similarità strutturali, al partner di legame e alla funzione svolta (Smith et al., 1999). I membri della famiglia di proteine WD40, presenti in tutti gli eucarioti, regolano la trascrizione, lo splicing del mRNA, l'organizzazione del citoscheletro e la fusione vescicolare, fanno parte di questa famiglia anche le subunità  $\beta$  delle proteine G (Smith et al., 1999; Garcia-Higuera et al., 1996). Tutte le proteine appartenenti alla famiglia WD40 sono costituite da sequenze ripetute separate da circa 40 aminoacidi. Ogni sequenza ripetuta è costituita da due domini caratteristici: un dominio A, poco conservato, recante una coppia di glicina e istidina (GH) e un dominio B, ben conservato, costituito da una coppia di triptofano e acido aspartico (WD). Ciascuna proteina può essere costituita da 4 a 8 domini conservati WD40. La distanza che li separa e la composizione aminoacidica sono altamente variabili e sono fattori di discriminazione in sottofamiglie (Zhu et al., 2004). Recentemente, è stato

dimostrato che le proteine G $\beta$ -like WD40 agiscono in modo diverso dalle G $\beta$  proteine, inibendo una via di trasduzione del segnale dipendente da MAPK (Kim et al., 2001; Xia et al., 2001; Zhu et al., 2004). Infatti sebbene appartengano alla stessa famiglia e condividano gli stessi domini conservati, le differenzia il numero di domini WD40. La sottofamiglia G $\beta$ -like è costituita da 5 o 6 domini conservati, mentre le proteine G $\beta$  sono costituite da 7 domini WD40 (Zhu et al., 2004).

In *A. nidulans* il gene *creC* codifica per una proteina costituita da 5 domini conservati WD40 che insieme alla proteina codificata dal gene *creB* formano un complesso proteico che regola il metabolismo del carbonio (Boase and Kelly, 2004).

Le proteine appartenenti alla famiglia WD40 possono svolgere ruoli diversi, per cui questi spot (6203; 1414; 6501) potrebbero essere coinvolti nella regolazione di differenti processi cellulari come la sporulazione, la secrezione degli enzimi, il metabolismo o il riconoscimento del patogeno.

Uno studio capace di complementare le analisi morfologiche fisiologiche e molecolari, permettendo di avere un panoramica delle alterazioni provocate dalla distruzione di *tga3*, è stato possibile grazie l'ausilio della tecnica proteomica, che è in grado di identificare un elevato numero di proteine in miscele molto complesse.

La proteomica consente di effettuare studi di espressione e funzionali, per analizzare le differenze tra il proteoma del ceppo selvatico e del mutante, con l'obbiettivo di ottenere informazioni sull'attività biologica di singole proteine. Dall'analisi dei risultati ottenuti con il software PDQUEST, risulta evidente che in tutte le condizioni di crescita saggiate il mutante *Atga3* presenta un numero di proteine totali, differenzialmente espresse e conservate, sempre inferiore rispetto al ceppo selvatico P1, lasciando supporre che siano molteplici i bersagli delle vie di trasduzione del segnale attivate da Tga3.

Gli studi condotti in questa tesi, possono aiutare a capire in parte alcuni dei meccanismi che regolano importanti processi nel fungo micoparassita *T. atroviride* quali la crescita, la conidiogenesi, il riconoscimento dell'ospite (pianta o fungo) e la secrezione di enzimi

litici. L'assenza di Tga3 causa una alterazione della crescita infatti il mutante *Δtga3* cresce molto più lentamente del ceppo P1 (sia in assenza che in presenza dell'ospite). Questa differenza può essere messa in relazione con l'assenza nel *Δtga3* di una PTP, proteina correlata con la duplicazione cellulare e con la presenza di una proteina GKAP, che invece è coinvolta in fenomeni di inibizione della proliferazione cellulare nelle cellule umane. Per quanto riguarda i meccanismi che regolano la conidiogenesi, il mutante *Δtga3* forma conidi in condizioni sia di luce che di buio e con i gel 2D è stata evidenziata la mancata espressione di una proteina omologa a IME4 di *S. cerevisiae*, che è coinvolta nella regolazione della sporulazione. Quindi, questa proteina potrebbe giocare un ruolo fondamentale nella regolazione dei processi di conidiogenesi anche in *T. atroviride* ed è probabilmente regolata dall'espressione di Tga3.

La percezione dell'ospite è un fenomeno molto complesso, che implica la partecipazione di molti eventi come ad esempio la presenza di molecole diffusibili che entrano in contatto con recettori di superficie capaci di trasmettere il segnale all'interno della cellula. Il *Δtga3* sembra essere carente proprio in questi sistemi di riconoscimento superficiali. Infatti, solo nel ceppo P1 è stata messa in evidenza una proteina simile alle MSG (Major Surface Proteins) utilizzata dai funghi patogeni umani come *P. carinii*, per regolare l'adesione alle cellule dell'ospite (cellule polmonari). Il *Δtga3* quindi, potrebbe non essere in grado di riconoscere l'ospite e di micoparassitizzarlo. La scarsa capacità di controllare il patogeno (sia esso *B. cinerea* o *R. solani*) è probabilmente legata anche alla mancata secrezione di enzimi litici. Infatti, il *Δtga3* mantiene inalterata la produzione di chitinasi, glucanasi, xilanasi e cellulasi (presenti in abbondanza sia a livello di mRNA che di proteine intracellulari) ma non riesce a liberarli nel filtrato colturale. Un'importante differenza tra il ceppo P1 e il *Δtga3*, evidenziata grazie all'analisi proteomica, è l'assenza di espressione nel mutante di una proteina 14-3-3 che in *T. reesei* è coinvolta nei meccanismi di secrezione enzimatica e di proliferazione cellulare. Infine, è stata messa in evidenza una proteina omologa a NIP1 del patogeno

fungino *R. secalis*, presente in quantità maggiore nel  $\Delta tga3$ , suggerendo che la delezione di *tga3*, ha causato l'alterazione dei meccanismi di interazione con la pianta. Questo risultato è stato confermato dal saggio *in vivo*, in cui le piante di fagiolo trattate con  $\Delta tga3$  risultano meno stimolate nella crescita rispetto alle piante trattate con P1. L'identificazione del recettore, che opera a monte delle proteine G, e degli elementi della trasduzione del segnale coinvolti nel riconoscimento dell'ospite aiuterà a comprendere più a fondo i processi che regolano il micoparassitismo di *T. atroviride*.

## 5 Bibliografia

- Aitken A.** (1996). 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signaling pathways. *Trend Cell Biol.* 6: 341-347.
- Alabouvette C.,** Eparvier A., Couteaudier Y., Steinberg C. (1992). Methods to be used to study the competitive interaction between pathogenic and nonpathogenic *Fusarium* spp. in the rhizosphere at the root surface. In *New Approaches in Biological Control of soil-borne disease.* (eds. D.F. Jensen, J. Hockenhull and N. J. Fokkema). Copenhagen: European Foundation for Plant Pathology/International Organization for Biological Control, pp. 1-7.
- Alsbaugh J. A.,** Perfect J. R., Heitman J. (1998). Signal transduction pathways regulating differentiation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* 25: 1-14.
- Anderson C. M.,** Willits D. A., Kosted P. J., Ford E. J., Martinez-Espinoza A. D. Sherwood J. E. (1999). Molecular analysis of the pheromone and pheromone receptor genes of *Ustilago hordei*. *Gene* 240: 89-97.
- Armstrong J.,** Craighead M. W., Watson R., Ponnambalam S., Bowden S. (1993). *Schizosaccharomyces pombe* ypt5: a homologue of the rab5 endosome fusion regulator. *Mol Biol Cell* 4:583-592.
- Atienza J. M.,** Suh M., Xenarios I., Landgraf R., Colicelli J. (2000). Human EKK1 induces filamentous growth and cell wall remodelling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275: 20638-20646.
- Bachmann M.,** Huber J. L., Athwal G. S., Wu K., Ferl R. J., Huber S. C. 14-3-3 proteins associate with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf nitrate reductase in an isoform-specific manner and reduce dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS Lett* 1996, 398:26-30.
- Baker K. F.**(1987). Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 25: 67-85.

- Banuett F.** (1998). Signaling in the yeast: an informational cascade with links to filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 249-274.
- Bencina M.,** Panneman H., Ruijter G. J. G., Legisa M., Visser J., (1997). Characterization and overexpression of the *Aspergillus niger* gene encoding the cAMP-dependent kinase catalytic subunit. *Microbiology* 143:1211-1220.
- Barak R.,** Elad Y., Mirelman D., Chet I. (1985). Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 75: 458-462.
- Benhamou N. and Chet I.,**(1996). Parasitism of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspect of the interaction. *Phytopatolology*, 86: 405-416.
- Betina V.** (1995). Photoinduced conidiation in *Trichoderma viride*. *Folia Microbiol.* 40:219-224.
- Blanchetot C.,** Tertoolen L.G.J., den Hertog J. (2002). Regulation of receptor protein-tyrosine phosphatase  $\alpha$  by oxidative stress. *EMBO J* 21(4):493-503.
- Biely P.** (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3:286-290.
- Biely P.,** Vrsanska M., Tenkanen M., Kluepfel D. (1997). Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol* 57:151-166.
- Birnbaumer L.** (1992). Receptor-to-effector signaling through G proteins: role for  $\beta\gamma$  dimers as well as  $\alpha$  subunit. *Cell* 71: 1069-1072.
- Blanchelot C. and den Hertog J.** (2000). Multiple interactions between receptor protein-tyrosine phosphatase (RPTP) $\alpha$  membrane-distal protein-tyrosine phosphatase domains of various RPTPs. *J Biol Chem* 275, 12466-12452.
- Bölker M.,** Urban M., Kahmann R. (1992). The mating type locus of *U. maydis* species cell signalling components. *Cell* 68: 441-450.

- Bolker M.** 1998. Sex and Crime: Heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. *Fungal Genet. Biol.* 25: 143-156.
- Booase N. A. and Kelly J. M.** (2004). A role for creD, a carbon catabolite repression gene from *Aspergillus nidulans*, in ubiquitination. *Molecular Microbiology* 53 (3): 929-940.
- Braselman S. and McCormick P. C.** (1995). BCR and RAF form a complex *in vivo* via 14-3-3 proteins. *EMBO J.* 14: 4839-4848.
- Bruno K. S., Aramayo R., Minke P.F., Metzenbegr R. L., Plamman M.** (1996) Loss of growth polarity and mislocalization of septa in a *Neurospora* mutant altered regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J.* 15: 5771-5782.
- Buchert, J., Ranua, M., Siika-aho, M., Pere, J, Viikari L.** (1994). *Trichoderma reesei* cellulase in the bleaching of Kraft pulp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40: 941-945.
- Chang H. C. and Rubin G. M.** 14-3-3 epsilon positively regulates Ras mediated signaling in *Drosophila*. *Genes Dev* 1997, 11:1132-1139.
- Chen B., Gao S., Choi G. H., Nuss D.L.** (1996). Extensive alteration of fungal gene transcript accumulation and elevation of G-protein-regulated camp levels by a virulence-attenuating hypovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7996-8000.
- Chet I.**(1987). *Trichoderma*: application, 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, pp. 137-160.
- Choi G. H., Chen B., Nuss D.L.** (1995). Virus mediated suppression of a G-protein a subunit and attenuation of fungal virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 305-309.
- Chung H. J., Sehnke P. C., Ferl R. J.** The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism. *Trends Plant Sci* 1999, 4:367-371.

- Clancy M. J.**, Shambaugh M. E., Timpte C. S., Bokar J. A. (2002). Induction of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* leads to the formation of N<sup>6</sup>-methyladenosine in mRNA: a potential mechanism for the activity of the *IME4* gene. *Nucleic Acid Research*, 30(20): 4509-4518.
- Clavet C.**, Pera J., Barea J. M. (1993). Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant and Soil*, 148: 1-6.
- Coca M. A.**, Damsz B., Yun D.-J., Hasegawa P. M., Bressan R. A., Narasimhan M. L. (2000). Heterotrimeric G-protein of filamentous fungus regulate cell wall composition and susceptibility to a plant PR-5 protein. *Plant J.* 22:61-69.
- Cook R. J. and Baker, K. F.**(1983). "The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogen". The American Phytopathology Society, St.PAUL, MN.
- Cook R. J.**, Bruckart W. L., Coulson J. R., Goettel M. S., Humbber R. A., Lumsden R. D., Maddox J. V., Mc Manus M. L., Moore L., Meyer S. F. (1996). Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: framework for scientific evaluation. *Phytopathology*, 7: 333-351.
- Cook R. J.** (1997). Biological control of soilborne plant pathogen: past, present and future. *International Symposium Clean Agriculture, Saporu (Japan)*,pp.35-48.
- Cordwell S. J.**, Nouwens A. S., Walsh B. J. (2001) Comparative proteomics of bacterial pathogens. *Proteomics*, 1: 461-472.
- Cortes C.**, Gutiérrez A., Olmedo V., Inbar J., Chet I., Herrera-Estrella A. (1998). The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by diffusible factor. *Mol. Gen. Genet.* 260: 218-225.
- Cotelle V.**, Meek S. E., Provan F., Milne F. C., Morrice N., MacKintosh C. (2000). 14-3-3 regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved *Arabidopsis* cells . *EMBO J.* 19: 2869-2876.

- Davis G. J.**, Dodson G. G., Hubbard R. E., Tolley S. P., Dauter Z., Wilkson K. S., Hjort C., Mikkelsen J. M., Rasmussen G., Schulein M. (1993). Structure and function of endoglucanase V. *Nature* 365 (6444): 362-4.
- Davis R. F.**, Backman P. A., Rodriguez-Kabana R., Kokallis-Burell N. (1992). Biological control of apple fruit disease by *Chaetomium globosum* formulation containing cellulose. *Biological Control*, 2: 118-123.
- De la Cruz J.**, Hidalgo-Gallego A., Lora J. M., Benítez. Pintor-Toro J. A., Llobell A. (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry*, 206: 859-867.
- De Wit P. J. G. M.** (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Sci.* 2: 452-458.
- den Hertog J.**, Sap J., Pals C. E., Schlessinger J., Kruijier W. (1995). Stimulation of receptor protein-tyrosine phosphatase  $\alpha$  on Tyr789, a binding site for the SH2-SH3 adaptor protein GRB-2 *in vivo*. *EMBO J.* 13: 303-307.
- Deising H. and Seigrist. B.** (1995). Chitin deacetylase activity of the rust *Uromyces viciae fabae* is controlled by fungal morphogenesis. *FEMS Microbiol Lett* 127: 207-212.
- DeLille J.M.**, Sehnke P.C., Ferl R.J: The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators. *Plant Physiol* 2001, 126: 35-38.
- Dennis C and Webster J.** (1991). Antagonistic properties of species-group of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. *Trans. BRI. Mycol. Soc.* 57: 363-369.
- Dickman M. B. and Yarden O.** (1999). Serine/threonine kinases and phosphatases in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 26: 99-117.
- 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.

- Di Pietro A.**, Garcia-MacEira F. I., Meglecz E., Roncero M. I. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 39(5): 1140-52.
- Dixon K. P.**, Xu J. R., Smirnov N., Talbot N. J. (1999). Independent signalling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe grisea*. *Plant cell* 11: 2045-2058.
- Dohlman H. G.**, Thorner J., Caron M. G., Lefkowitz R. J. (1991). Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptor. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 653-688.
- Duijff B. J.**, Baker P. A. H. M., Schippers B. (1994). Suppression of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas putida* WCS358 at different levels of disease incidence and iron availability. *Biocontrol Science and Technology*, 4: 279-288.
- Dürrenberger F.**, Wong K., Kronstad J. W. (1998). Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5684-5689.
- El Goray S.**, Leite A., Crivellaro O., El Dorry H. and Eveleigh, D. E. (1990). *Trichoderma reesei* cellulase from mutant to induction. In *Trichoderma reesei Cellulase: Biodiversity, Genetics, Physiology and Application*. (eds. C. P. Kubicek, D. E. Eveleigh, W. Esterbauer and E.M. Kubicek-Praz). Cambridge: Royal Society of Chemistry, pp. 200-211.
- Elad Y. and Shtienberg D.** (1996). *Trichoderma harzianum* T39 (Trichodex) integrated with fungicides for the control of grey mould of strawberry, vegetable greenhouse-crops and grapes. In *Advances in Biological Control of Plant Diseases*. (eds. T. Wenhua, R.J. Cook and A. Rovira). Beijing: Agricultural University Press, pp. 310-319.

- Eparvier A. and Alabouvette C.** (1994). Use of ELISA and GUS-trasformed strains to study competition between pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* for root colonization. *Biocontrol Science and Technology*, 4: 35-47.
- Fashena S. J. and Zinn K.** (1995). The ins and outs of receptor tyrosine phosphatases. *Curr. Biol.* 5: 1367–1369.
- Faull J. L. and Scarletti R.** (1994). In vitro activity of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycological Research*, 98: 1207-1209.
- Fekete E., Benedeczky I., Timmermans J. P., Resch B.A., Scheuermann D. W.** (1996). Assignment of a PCR-amplified chitinase sequence cloned from *Trichoderma hamatum* to resolved chromosomes of potential biocontrol species of *Trichoderma*. (1996). *FEMS Microbiol Lett.* 15; 145(3): 385-91.
- Ferl R. J., Manak M.S., Reyes M.F.**(2002). The 14-3-3s. *Genome Biol* 3(7): 1-7.
- Fernandez C., Szyperski T., Bruyere T., Ramage P., Mosinger E., Wuthrich K.** (1997). NMR solution structure of the pathogenesis-related protein P14a. *J Mol Biol* 266 (3): 576-593.
- Fiedler B and Wollert K. C.** 2004 Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca<sup>2+</sup>-calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* Aug 15;63(3): 450-7.
- Filho E. X. F., Puls J., Coughlam M.P.** (1993). Physiochemical and catalytic properties of a low molecular weight Endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase from *Myrothecium verrucaria*. *Enzyme Microb Technol* 15: 535-540.
- Filho E. X. F.** (1994) The xylan-degrading eznyme system. *Braz J Med Biol Res* 27: 1093-1109.
- Flor H. H.** (1946). Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini*. *J. Agric. Res.* 73: 335-357.

- Flor H. H.** (1955). Host-parasite interaction in flax rust-Its genetics and other implication. *Phytopathology* 45: 680-685.
- Flores A.,** Che I., Herrera-Estrella A. (1997). Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Current Genetics*, 31: 30-37.
- Fowler T. J.,** De Simone S. M., Mitton M. F., Kurjan J., Raper C. A. (1999). Multiple sex pheromones and receptor of a mushroom-producing fungus elicit mating in yeast. *Mol. Biol.* 10: 2559-2572.
- Fu H.,** Subramanian R. R., Masters S. C. (2000). 14-3-3 proteins: structure, function and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 40: 617-647.
- Fukamizo T.,** Ohkawa T., Ikeda Y., Goto S. (1994) Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*. *BBA* 1205: 183-188
- Garcia-Higuera I.,** Fenoglio J., Li Y., Lewis C., Panchenko M. P., Reiner O., Smith T. F., Neer E. J. (1996). Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the G protein beta subunit. *Biochemistry*. 35 (44): 13985-94.
- Gao S. and Nuss D. L.** (1996). Distinct roles for two G protein a subunits in fungal virulence, morphology and reproduction revealed by targeted gene disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14122-14127.
- Geremia R.A.,** Goldman G.H., Jacobs D., Ardiles W., Vila S.B., Van Montagu M., Herrera-Estrella A. (1993). Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *pbr1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Molecular Microbiology*, 8: 603-613.
- Gigliotti F.,** Garvy B. A., Harmsen A. G. (1996). Antibody-mediated shift in the profile of glycoprotein A phenotypes observed in a mouse model of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infect. Immun.* 64: 1892-1899.

- Gold S. E.**, Brogdon S. M., Mayorga M. E., Kronstad J. W. 1997. The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell* 9: 1585-1594.
- Gooday G.W.**, Humphereys M., Mc Intosh W.H. (1985). Roles of chitinases in fungal growth. In *Chitin in nature and technology*. (Muzzerelli, R., Jeuniaux, C., and Gooday, G.W.) Plenum Press, N.Y., 83-91.
- Gorg A.**, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Sheibe B, Wildgruber R, Weiss W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilize pH gradients. *Electrophoresis* April; 21 (6): 1037-53.
- Gorvel J.-P.**, Chavrier P., Zerial M., Gruenberg J. (1991). Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64, 915-925.
- Grozinger C. M. and Scheiber S. L.** (2000) Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 7835-7840.
- Gruber F.**, Visser J., Kubicek C. P., de Graaff L. H. (1990). The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a pyrG-negative mutant strain. *Curr Genet.* 18: 71-76.
- Guan K.L. and Dixon J.E.** (1991). Cloning and expression of a yeast protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 266: 17026-17030.
- Guan K. L.**, Hakes D. J., Wang Y., Park H. D., Cooper T. G., Dixon J. E. (1992). A yeast protein phosphatase is induced by nitrogen starvation. *PNAS* 89: 12175-12179.
- Gustin M. C.**, Albertyn J., Alexander M., Davenport K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1264-1300.

- Gutkind J. S.** (1998). The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* 273: 1839-1842.
- Hagen D. C.,** Mc Caffrey G., Sprague G.F. (1986) Evidence that the yeast STE3 gene encodes a receptor for the peptide pheromone kinase cascades. *J. Biol. Chem.* 273: 1839-1842.
- Handelsman J. and Stabb E.V.** (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell*, 8: 1855-1869.
- Harder K.W.,** Moller N.P.H., Peacock J.W., Jirik F.R. (1998). Protein-tyrosine phosphatase  $\alpha$  regulates Src family kinases and alters cell-substratum adhesion. *J Biol Chem* 273: 31890-31900.
- Harman G. E.,** Hayes, C. K., Lorito, M., Boadway R. M., Di Pietro A., Tronsmo, A. (1993). Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology*, 83: 313-318.
- Harman G.E. and Bjorkman T.** (1997). Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In *Trichoderma and Gliocladium* Vol 2, Harman, G.E. and Kubicek, C.P. eds., London: Taylor & Francis, pp 229-261.
- Harman G.E. and Kubicek C. P.** (1997). *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol 1.eds., London: Taylor & Francis.
- Harman G. E.,** Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbiont. *Nature Rev. Microbiol.* 2: 43-56.
- Haran S.,** Schickler H., Oppenheim A. Chet I. (1996). Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinase during mycoparasitism. *Phytopathology*, 86: 980-985.
- Hayes C.K.,** Klemsdal S., Lorito M., Di Pietro A., Peterbauer C., Nakas J.P., Tronsmo A., and Harman G.E. (1994). Isolation and sequence of an endochitinase-

- encoding gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*. *Gene*, 138: 143-148.
- Hong Y.**, Pasternak J.J., Glick B.R. (1991). Biological consequences of plasmid transformation of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology*, 37: 796-799.
- Horwitz B. A.**, Sharon A., Lu S., Ritter V., Sandrock T. M., Yolder O. C., Turgen B. G. (1999). A G protein alpha subunit from *Cochliobolus heterostrophus* involved in mating and appressorium formation. *Fungal Genet.* 26: 19-32.
- Igarashi D.**, Ishida S., Fukazawa J., Takahashi Y. (2001). 14-3-3 proteins regulate intracellular localization of the bZIP transcriptional activator RSG. *The Plant Cell* 13: 2483-2497.
- Inbar J. and Chet I.** 1992. Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lection-coated nylon fibers. *J. Bacteriol.* 174: 1055-1059.
- Inbar J. and Chet I.** 1994. A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 140: 651-657.
- Inbar J. and Chet I.** 1995. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 141: 2823-2829.
- Inbar J. and Chet I.** (1997). Lectins and biocontrol. *Critical Reviews of Biotechnology*, 17: 1-20.
- Ivey F. D.**, Hodge P. N., Turner G. E., Borkovich K. A. (1996). The Gai homologue *gna1* controls multiple differentiation pathways in *Neurospora crassa* *Mol. Biol. Cell* 7: 1283-1297.
- Ivey F. D.**, Yang Q., Bokovich K. A. (1999) Positive regulation of adenylyl cyclase activity by a G-alpha<sub>i</sub> homolog in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.* 26: 48-61.

- Jach G.**, Gornhardt B., Mundy J., Logemann J., Pinsdorf E., Leah R., Schell J. Mass C. (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant Journal*, 8: 97-109.
- Jain S.**, Akiyama K., Mae K., Ohguchi T., Takata R. (2002). Targeted gene disruption of a G protein  $\alpha$  subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* 41: 407-413.
- Kafetzopoulos D.**, Martinou A., Bouriotis V. (1993). Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *PNAS USA* 90: 2564-2568.
- Katayama A. and Matsumara F.** (1993). Degradation of organochloride pesticides, particularly endosulfan, by *Trichoderma harzianum*. *Environmental and Toxicological Chemistry*, 12: 1059-1065.
- Kasahara S. and Nuss (1997).** Targeted disruption of a fungal G-protein beta subunit gene result in increased vegetative growth but reduced virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 984-993.
- Kasahara S.**, Wang P., Nuss D. L. (2000). Identification of *bdm1*, a gene involved in G protein  $\beta$ -subunit function and a subunit accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 412-417.
- Kays A. M.**, Rowley P. S., Baasiri R. A., Borkovich K. A. (2000). Regulation of conidiation and adenylyl cyclase levels by the alpha protein GNA3 in *Neurospora Crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7693-7705.
- Kim H. W.**, Yang P., Qyang Y., Lai H., Du H., Henkel J. S., Kumar K., Bao S., Liu M., Marcus S. (2001). Genetic and molecular characterization of Skb15, a highly conserved inhibitor of the fission yeast PAK, Shk1. *Mol Cell* 7: 1095-1101.
- Kitajima S. and Sato F.** (1999). Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. *J. Biochem.* 125: 1-8.

- Kleifeld O. and Chet I.** (1992). *Trichoderma harzianum* interaction with plants and effect on growth response. *Plant and Soil*, 144: 22667-272
- Klemsdal S. S., Hayes C. P., Hjeljord L., Lorito M., Harman G. E., Tronsmo A.** (1996). Isolation and characterization of a cDNA from *Trichoderma harzianum* P1 encoding a 14-3-3 protein homolog. *Gene* 171: 123-127.
- Kloepper J.W., Lifshitz R., Zabllotowics R.M.** (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, 7:39-44.
- Kojima K., Kikuchi T., Takano Y., Oshiro E., Okuno T.** (2002). The mitogen-activated protein kinase gene MAF1 is essential for the early differentiation phase of appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15(12): 1268-76.
- Kolattukudy P. E., Lee J. D., Rogers L. M., Zimmerman P., Ceselski S., Fox B., Stein B., Copelan E. A.** (1993). Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis. *Infect. Imm.*, 61: 2357-2368.
- Kronstad J., De Maria A., Funnel D., Laidlaw R. D., Lee N., Moniz de Sa M., Ramesh M.** (1998). Signaling via cAMP in fungi: interconnections with mitogen-activated protein kinase pathways. *Arch. Microbiol.* 170: 395-404.
- Krueger N.X., Streuli M., Saito H.** (1990). Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *EMBO J* 18: 2459-2471.
- Kubicek C. P., Eveleigh D. E., Esterbauer H., Steiner W. Kubicek-Pranz E. M.**(1990). *Trichoderma reesei* cellulase: biodiversity, genetics, physiology and applications. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Kubicek C. P., Mach R. L., Peterbauer C. K., Lorito M.** (2001). *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *J. Plant. Pathol.* 83: 11-23.
- Kullnig C. M. Mach R. L., Lorito M., Kubicek C. P.** (2000). Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum*) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite

for triggering *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact.

Appl. Environ. Microbiol. 66: 2232-2234.

**Lagorce A., Le Berre-Anton V., Aguilar-Uscanga B., Martin-Yken H., Dagkessamanskaia A., Francois J. (2002).** Involvement of *GFAI* which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J Biochem 269: 1697-1707.

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

**Laugé R. and De Wit P. J. G. M. (1998).** Fungal Avirulence Genes: structure and possible functions. Fungal Gen. Biol.. 24: 285-297.

**Leberer E., Harcus D., Broadbent I. D., Clatk K. L., Diignard D., Ziegelbauer K., Shimidt A., Gow N. A., Brow A. J., Thomas D. J. (1996).** Signal transduction through homologs of the STE20p and STE7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13217-13222.

**Lev S., Sharon A., Hadar R., Ma H., Horwitz B. (1999).** A mitogen activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation appressorium formation and pathogenicity: divers roles for mitogen-activated protein kinase homologs in foliar pathogens. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96: 13542-13547.

**Lev S. and Horwitz B.A (2003)** A Mitogen-Activated Protein Kinase pathway modulates the expression of two cellulase genes in *Cochliobolus heterostrophus* during plant infection. Plant Cell. 15 (4): 835–844.

**Lewin B. (1997)** La trasduzione del segnale in Gene VI capitolo 35 pp 904-934. Oxford University Press and Cell Press.

- Lewis J.A., Roberts D. P. Hollenbeck M. D. (1991).** Introduction of cytoplasmic leakage from *Rhizoctonia solani* hyphae by *Gliocladium virens* and partial characterization of a leakage factor. *Biocontrol Science and Technology*, 1: 21-29.
- Lewis T. S., Shapiro P. S., Ahn N. G. (1998).** Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 74:49-139.
- Li D., Roges L., Kolattukudy P.E. (1997).** Cloning and expression of cDNA encoding a mitogen-activated protein kinase from a phytopathogenic filamentous fungus. *Gene* 195: 161-166.
- Lichter A., and Mills D. (1997).** Fil1, a G protein alpha subunit that acts upstream of cAMP and is essential for dimorphic switching in haploid cells of *Ustilago hordei*. *Mol. Gen. Genet.* 256: 426-435.
- Liebmann B, Muller M, Braun A, Brakhage AA. (2004)** The cyclic AMP-dependent protein kinase a network regulates development and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 72 (9): 5193-203.
- Liu S., and Dean R. A. (1997).** G protein alpha subunit genes control growth, development and pathogenicity in *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 1075-1086.
- Lorito M., Harman G.E., Hayes C.K., Broadway R.M, Tronsmo A., Woo S.L. and Di Pietro, A. (1993).** Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, 83: 302-307.
- Lorito M., Peterbauer C., Hayes C.K., Harman. G.E. (1994a).** Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology*, 140: 623-629.
- Lorito M., Hayes C.K., Di Pietro A., Woo S.L. and Harman G.E. (1994b).** Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- $\beta$ -glucosidase and an N-

acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 84: 398-405.

**Lorito M.**, Mach R., Sposato P., Strauss J., Peterbauer C.K., Kubicek C.P. (1996). Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 14868-14872.

**Lorito, M.** (1997). Chitin in agriculture. *Carbohydrates in Europe*, 19: 24-29

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

**Luan S.** (2002) Tyrosine phosphorylation in plant cell signalling. *PNAS* 99(18): 11567-11569.

**Mac Donald W.L. and Fulbright D.W.**(1991). Biological control of chestnut blight: Use and limitations of transmissible hypovirulence. *Plant Disease*, 75: 656-661.

**Mach R. L.**, Schindler M, Kubicek CP (1994). Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Curr Genet* 1994 Jun;25(6): 567-70.

**Madhani H. D. and Fink G. R.** (1998). The riddle of MAP kinase signaling specificity. *TIG* 14: 151-155.

**Maeda T.**, Tsai A.Y.M., Saito H. (1993). Mutations in a protein tyrosine phosphatase gene (PTP2) and a protein serine/threonine phosphatase gene (PTC1) cause a synthetic growth defect. *Mol Cell Biol*. 13(9): 5408-5417.

**Mandel Q. and Baker. R.** (1991). Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt on cucumber with strain of non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 81: 461-469.

- Margolles-Clark E.**, Harman G. Penttila M. (1996). Enhanced expression of endochitinase in *Trichoderma harzianum* with the *cbh1* promoter of *Trichoderma reesei*. Applied and Environmental Microbiology, 62: 2152-2155.
- Mayorga M. E. and Gold S. E.** (1999). A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and virulence. Mol. Microbiol. 34: 485-497.
- Mei Q.**, Turner R. E., Sorial V., Klivinton D., Angus W. C., Kovacs J. A. (1998). Characterization of major surface glycoprotein genes of Human *Pneumocystis carinii* and high-level expression of a conserved region. Infect. Immun. 66 (9): 4268-4273.
- Mendoza-Mendoza A.**, Pozo M. J., Grzegorski D., Martinez P., Garcia J. M., Olmedo-Monfil V., Cortes C., Kenerley C., Herrera-Estrella A. (2003). Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma* through inactivation of a mitogen-activated protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 100 (26): 15965-70.
- Mey G.**, Held K., Scheffer J., Tenbberge K. B., Tudzyski P. (2002). Cpmk2, an SLT2-homologous mitogen activated protein (MAP) kinase is essential for pathogenesis of *Claviceps purpurea* on rye: evidence for a second conserved pathogenesis-related MAP kinase cascade in phytopathogenic fungi. Mol. Microb. 46 (2): 305-318.
- Meyer W., Morawtz R.**, Borner T. Kubicek C.P. (1992). The use of DNA-fingerprint analysis in the classification of some species of the *Trichoderma aggregate*. Current Genetics, 21: 27-30.
- Mio T.**, Yamada-Okabe T., Arisawa M., Yamada-Okabe H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* *GNA1*, an essential gene encoding a novel acetyltransferase involved in UDP-N- acetylglucosamine synthesis. J Biol Chem 274(1): 424-429.

- Mitchell T. K. and Dean R. A.** (1995). The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Plant cell* 7: 1869-1878.
- Miyajima I., Nakafuku M., Nakayama N., Brenner C., Miyajima A., Kaibuchi K., Arai K., Kaziro Y., Matsumoto K.** (1987). GPA1, a haploid-specific essential gene, encodes a yeast homolog of mammalian G protein which may be involved in mating factor signal transduction. *Cell* 50: 1011-1019.
- Mukherjee P. K., Latha J., Hadar R., Horwitz B.A.** (2003). TmkA, a Mitogen Activated Protein Kinase of *Trichoderma virens* is involved in Biocontrol Properties and repression of conidiation in the dark. *Eukaryotic cell* 2(3): 446-455.
- Mukherjee P. K., Latha J., Hadar R., Horwitz B.A.** (2004). Role of two G protein alpha subunits, TgaA and TgaB in the antagonism of plant pathogens by *Trichoderma virens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 542-549.
- Müller P., Aichinger C., Feldbrugger M., Kahman R.** (1999). The MAP kinase *kpp2* regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol. Microb.* 34: 1007-1017.
- Muller P., Weinzierl G., Brachmann A., Feldbrugge M., Kahmann R.** (2003)a. Mating and pathogenic development of The Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen activated protein kinase cascade. *Eukaryot. Cell* 2(6): 1187-99.
- Muller P., Katzenberger D. J., Loubradou G., Kahmann R.** (2003)b. Guanyl nucleotide exchange factor *Sql2* and *Ras2* regulate filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell*, 2(1): 609–617.
- Muslin A. J. and Xing H.** (2000) 14-3-3: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell. Signal.* 12: 703-709.
- Muthukumar G., Suhng S. H., Magee P. T., Jewell R. D., Primerano D. A.** (1993) The *Saccharomyces cerevisiae* *SPR1* gene encodes a sporulation-specific exo-1,3-

- beta-glucanase which contributes to ascospore thermoresistance. *J Bacteriol.*, 175 (2): 386-94.
- Nahar P.**, Ghormade V., Deshpand M.V. (2004). The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: a possible edge to entomopathogenic fungi in the control of insects pests. *J Inverteb Pathol* 85: 80-88.
- Nakayama N.**, Miyajima A., Arai K. (1985). Nucleotide sequence of STE2 e STE3, cell-type specific sterile genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 4: 2643-2648.
- Nakafuku M.**, Obara T., Kaibuchi K., Miyajima A., Itoh H., Nakamura S., Arai K., Matsumoto K., Kaziro Y. (1988). Isolation of a second yeast *Saccharomices cerevisiae* gene (GPA2) coding for guanine nucleotide-binding regulatory protein: studies on its structure function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1374-1378.
- Nanjo F.**, Katsumi R., Sakai K. (1990) Purification and characterization of an exo-beta-D- glucosaminidase, a novel type of enzyme, from *Nocardia orientalis*. *J Biol Chem* 265: 10088-10094.
- NAS** (1987). Report of the research briefing panel on biocontrol in managed ecosystems. Washington: National Academy of Sciences.
- Niimi M.** (1996). Dibutyryl cyclic AMP-enhanced germ tube formation in exponentially growing *Candida albicans* cell. *Fungal Genet. Biol.* 20: 79-83.
- Nordbring-Hertz B. and Chet, I.** (1986). Fungal lectins and agglutinins. In *Microbiol lectins and agglutinins: properties and biological activity.* (Mirelman D. coord), John Wiley & Son, 393-407.
- Obara T.**, Nakafuku M., Yamamoto M., Kaziro Y. (1991). Isolation and characterization of a gene encoding a G protein alpha subunit from

- Schizosaccharomyces pombe*: Involvement in mating and sporulation pathways. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 5877-5881.
- Okon Y.** (1985). Azospirillum as a potential inoculant for agriculture. Trends in Biotechnology, 3: 223-228.
- Omero C., Inbar J., Rocha-Ramirez V., Herrera-Estrella A., Chet I., Horwitz B.,** (1999). G protein activators and cAMP promote mycoparasitic behaviour in *Trichoderma harzianum*. Mycol. Res. 103: 1637-1642.
- Oort A. J.** (1944). Onderzoekingen over stutfbrand. II. Overgevoeligheid voor stuifbrand (*Ustilago tritici*). Tijdschr. Planteziekten 50: 73-106. [with a summary: Hypersensitivity of wheat to loose smut]
- Papavizas G.C.** (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and the potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology, 23: 23-54.
- Peng C.Y., Graves P.R., Thoma R.S., Wu Z., Shaw A.S., Piwnicka-Worms H.:** Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 1997, 277: 1501-1505.
- Peterbauer C. K., Lorito M., Hayes C. K., Harman G. E., Kubicek C. P.** (1996). Molecular cloning and expression of *nagI*, a gene encoding N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Curr. Genet. 30: 325-331.
- Petrone A. and Sap J.** (2000). Emerging issues in receptor protein tyrosine phosphatase function: lifting fog or simply shifting? J Cell Sci 113: 2345-2354.
- Pozo M. J., Baek J., Garcia J. M., Kenerley C. M.** (2004) Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. Fungal Genetics and Biology, 41: 336-348.
- Price L. A., Kajkowski E. M., Hadcock J. R., Ozenberger B. A. Paush M. H.** (1995). Functional coupling of a mammalian somatostatin receptor to the yeast pheromone pathway. Mol. Cell. Biol. 15: 6188-6195.

- Pucci P.** (2004). Advance and perspectives in proteome analysis. Napoli 7 giugno 2004, Istituto Nazionale dei tumori, fondazione Giovanni Pascale.
- Punt P. J.,** Oliver R., Dingemanse M. A., Pouwels P. H. 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.
- Reese E.T.,** Levinson H.S., Downing M. and White W.L. (1950). Quatermaster culture collection. *Farlowia*, 4: 45-86.
- Reese E.T. and Mandels M.** (1989). Rolling with the times; production and applications of *Trichoderma reesei* cellulase. *Annual Reports of Fermentative Processes*, 7: 9-20
- Regenfelder E.,** Spelling T., Hartmann A., Lauenstein S., Bolker M., Kahmann R. (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *EMBO J.* 16: 1934-1942.
- Reichard U.,** Cole G. T., Hill T. W., Ruchel R., Monod M. (2000). Molecular characterization and influence on fungal development of ALP2, a novel serine protease from *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 290: 549-558.
- Reithner B.,** Brunner K., Peissel I., Seidl V., Zeilinger S. (2004) The G protein  $\alpha$  subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and production of antifungal metabolites. *Eukariotic Cell* (in corso di pubblicazione).
- Rey M.,** Delgado-Jarana J., Benitez T. (2001). Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT2413 which produces more extracellular proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:6 04-608.
- Rifai M.A.** (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116: 1-56.
- Rocha-Ramirez V.,** Omero C., Chet I., Horwitz B. A., Herrera-Estrella A. 2002. *Trichoderma atroviride* G protein  $\alpha$ -subunit gene *tga1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukariotic Cell*, 1: 594-605.

- Rohe M.**, Gierlich A., Hermann H., Hahn M., Schmidt B., Rosahl S., Knogge W. (1995). The race-specific elicitor, NIP1, from the barley pathogen, *Rhynchosporium secalis*, determines avirulence on host plants of the Rrs1 resistance genotype. EMBO J. 14 (17): 4168-4177.
- Roncal T and Ugalde U.** (2003). Conidiation induction in *Penicillium*. Res. Microbiol. 154: 539-546.
- Rosen S.**, Yu J.H., Adams T. H. (1999). The *Aspergillus nidulans* *sfaD* gene encodes a Gn protein b subunit that is required for a normal growth and repression of sporulation. ENBO J.18: 5592-5600.
- Salminen A. and Novick P.J.** (1987). A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. Cell 49, 527-538.
- Saloheimo A.**, Henrissat B., Hoffren A. M., Teleman O., Penttila M. (1994). A novel, small endoglucanase gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. Mol Microbiol. 13 (2): 219-28.
- Saloheimo M.**, Nakari-Setälä T., Tenkanen M., Penttilä M. (1997) cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. Eur J. Biochem, 249 (2): 584-591.
- Sambrook J**, Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual (2<sup>nd</sup> edn) Cold Spring Harbor, NY.
- Schaeffer H. J. and Weber M. J.** (1999). Mitogen activated protein kinase specific messages from ubiquitous messengers. Mol. Cell. Biol. 19: 2435-2444.
- Schmoll M.**, Zeilinger S., Mach R. L., Kubicek C. P. (2004). Cloning of gene expressed early during cellulase induction in *Hypocrea jecorina* by a rapid subtraction hybridization approach. Fungal Genet. Biol. 41: 877-887.
- Segev N.**, Mulholland J., Botstein D. (1988). The yeast GTPbinding YPT1 protein and a mammalian.

- Sestak S. and Farkas V.** (1993). Metabolic regulation of endoglucanase synthesis in *Trichoderma reesei*: a participation of cyclic AMP and glucose-6-phosphate. *Can. J. Microbiol.* 39: 342-347.
- Schneider R.W.,** (1984). Effect of non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* on celery root. Infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* and a novel use of the Lineweaver Burk double reciprocal plot technique. *Phytopathology*, 74: 646-653.
- Schwartz M. T., Schaller M. D., Ginsberg M. H.** (1995). Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 549–599.
- Shah J. and Clancy M. J.** (1992). *IME4*, a gene that mediates *MAT* and nutritional control of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, p1078-1086.
- Sivan A. and Chet I.,** (1989). Degradation of fungal cell walls by lytic enzyme of *Trichoderma harzianum*. *Journal General of Microbiology*, 135: 675-682.
- Simon M. I., Strathmann M. P., Gautam N.** (1991). Diversity of G protein in signal transduction. *Science* 252: 802-808.
- Smith K. T.** (1919). Some phases of insect control by the biological methods. *Journal of Economical Entomology*, 12: 288-292.
- Smith T. F., Gaitatzes C., Saxena K., Neer E. J.** (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci.*, 24 (5): 181-5.
- Smolenski A, Schultess J, Danielewski O, Garcia Arguinzonis MI, Thalheimer P, Kneitz S, Walter U, Lohmann SM.** 2004 Genomics. Quantitative analysis of the cardiac fibroblast transcriptome-implications for NO/cGMP signalling, 83(4): 577-87.
- Sohn J.S., Kim E.S., Zhao M. Kim S.J., Kim H., Kim Y-W., Lee Y. J. Hilmer S., Sohn U., Jiang L. Hwang I.** (2003). Rha1, an *Arabidopsis* rab5 homolog plays a critical role in the vacuolar trafficking of soluble cargo proteins. *The Plant Cell* 15: 1057-1070.

- Somiari R. I.,** Sullivan A., Russell S., Somiari S., Hu H., Jordan R., George A., Katenhusen R., Buchowiecka A., Brzeski H., Hooke J., Shriver C. (2003). High-throughput proteomic analysis of human infiltration ductal carcinoma of the breast. *Proteomic*, 3: 1863-1873.
- Sreedhar L.,** Kobayashi D. Y., Bnting T. E., Hilman B. I., Belanger F. C. (1999). Fungal proteinase expression in the interaction of the plant pathogen *Magnaporthe poae* with its host. *Gene*, 235: 121-129.
- Steiner-Lange S,** Fischer A., Boettcher A., Rouhara I., Liedgens H., Schmelzer E., Knogge W. (2003). Differential defense reactions in leaf tissues of barley in response to infection by *Rhynchosporium secalis* and to treatment with a fungal avirulence gene product. *Mol Plant Microbe Interact.*, 16 (10): 893-902.
- Stintzi A.,** Heitz T., Prasad V., Wiedemann-Merdinoglu S., Kauffmann S., Geoffroy P., Legrand M., Fritig B. (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie.*, 75 (8): 687-706.
- Stringer J. R. and Keely S.** (2001) Genetic of surface Antigen Expression in *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.*69 (2): 627-639.
- Szyperski T.,** Fernandez C., Mumenthaler C., Wuthrich K. (1998). Structure comparison of human glioma pathogenesis-related protein GliPR and the plant pathogenesis-related protein P14a indicates a functional link between the human immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 2262-2266.
- Takano Y.,** Kikuchi T., Kubo Y., Hamer J. E., Mise K., Furusawa I. (2000). The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene CMK1 regulates diverse aspect of fungal pathogenesis. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 13: 374-383.
- Takesono A.,** Cismowski M. J., Ribas C., Bernard M., Chung P., Hazard III S., Duzic E., Lanier S. M. (1999). Receptor-independent activators of heterotrimeric G protein signalling pathways. *J. Biol. Chem.* 274: 33202-33205.

- Taylor S.J. and Shalloway D.** (1996) Src and the control of cell division. *BioEssays* 18: 9-11.
- Tertoolen L.G.J., Blanchelot C., Jiang G., Overvoorde J., Gadella Jr. T.W.J., Hunter T. den Hertog J.** (2001). Dimerization of receptor protein-tyrosine phosphatase  $\alpha$  in living cell. *BMC Cell Biol.*, 2 article 8.
- Theus S. A., Andrews R. P., Linke M. J., Walzer P. D.** (1997). Characterization of CD4 T cell clones specific for the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44: 96-100.
- Tracy S., van der Geer P., Hunter T.** (1995). The receptor-like protein-tyrosine phosphatase RTP $\alpha$ , is phosphorylated by protein kinase C on two serines close to the inner face of the plasma membrane *J Biol Chem* 270: 10587-10594.
- Trudel J., Asselin A.** (1990). Detection of chitin deacetylase after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 189: 249-253.
- Truesdell G. M., Yang Z., Dickman M.B.** (2000). A Ga subunit gene from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum trifolii* is required for conidial germination. *Physiol Mol. Plant. Pathol.* 54: 131-140.
- Turner G. E. and Borkovich K. A.** 1993. Identification of a G protein alpha subunit from *Neurospora crassa* that is member of the Gi family. *J. Biol. Chem.* 268: 14805-14811.
- van Casteren WH, Kabel M. A., Dijkema C., Schols H. A., Beldman G., Voragen A. G.** (1999). Endoglucanase V and a phosphatase from *Trichoderma viride* are able to act on modified exopolysaccharide from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B40. *Carbohydr Res.* 317 (1-4): 131-44.
- van Hemert M. J., van Heusden G. P., H. Steensma H.Y.** (2001). Yeast 14-3-3 proteins. *Yeast*, 18: 889-895.
- Van Loon L.C.** (1985). Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 116: 111-116.

- Vasara T.**, Keranen S., Pentilla M., Saloheimo M. (2002). Characterisation of two 14-3-3 genes from *Trichoderma reesei*: interaction with yeast secretory pathway components. *Biochimica and Biophysica Acta* 1590: 27-40.
- Vernoud V.**, Horton A.C., Yang Z., Nielsen E. (2003). Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131:1191-1208.
- Viterbo A.**, Ramot O., Chemin L., Chet I. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 81: 549-556.
- Wang P., and Nuss D. L.** (1995). Induction of a *Cryphonectria parasitica* cellobiohydrolase I gene is suppressed by hypovirus infection and regulate by a GTP-binding-proten-linked signalling pathway involved in fungal pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11529-11533.
- Wang P.**, Perfect J. R., Heitman J., (2000) The G-protein beta subunit GPB1 is required for mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neofarmans*. *Mol. Cell. Biol.*, 20: 352-362.
- Wang T.**, Liu T., Wu Z., Liu S., Lu Y., Qu Y. (2004). Novel cellulase profile of *Trichoderma resei* strain constructed by *cbh1* gene replecement with *eg3* gene expression cassette. *Acta Biochimica and Biophysica Sinica*, 36 (10): 667-672.
- Warmka J.**, Hanneman J., Lee J., Amin D., Otav I. (2001). Ptc1, a Type 2C Ser/Thr Phosphatase, Inactivates the HOG Pathway by Dephosphorylating the Mitogen-Activated Protein Kinase Hog1 *Molecular and Cellular Biology*, 21(1): p. 51-60
- Weindling R.** (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, 22: 1153-1179.
- Wevelpsiep L.**, Ruppig E., Knogge W. (1993). Stimulation of barley plasmalemma H<sup>+</sup>-ATPase by phytotoxic peptides orm fungal pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Plant Physiol*. 101: 297-301.

- Whilhite, S. E.,** Lumsden, R. D. 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: 816-833.
- Whipps, J. M.** (1997). Development in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advance in Botanical Research*, 26: 1-134.
- Whitmarsh A. J. and Davis R. J.** (1998). Structural organization of MAP-kinase signalling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *TIBS* 23: 481-485.
- Widmann, C.,** Gibson S., Jarpe M. B., Johnson G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.*, 79: 143-180
- Wilkins M. R. and Williams W.** (1997). Cross-species protein identification using amino acid composition, peptide mass fingerprinting, isoelectric point and molecular mass: a theoretical evaluation. *J. Theor. Biol.*, 186: 7-15.
- Windham M. T.,** Elad Y., Baker R.(1986). A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 76: 518-521.
- Xia C.,** Ma W., Stafford L. J., Marcus S., Xiong W. C. Liu M. (2001). Regulation of the p21-activated kinase (PAK) by a human G-beta-like WD-repeat protein, Hpip1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6174-6179.
- Ximenes F. de A.,** Silveira F. Q., de P., Ximenes E. (1996). Production of  $\beta$ -xilosidase activity by *Trichoderma harzianum* strains. *Curr Microbiol.*, 33:71-77.
- Xing H.,** Zhang S., Weinheimer C., Kovacks A., Muslin A. J. (2000). 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *EMBO J.* 19: 349-358.
- Xu J. R. and Hamer J. R.** (1996). MAP kinase and cAMP regulate infection structure formation and pathogenic growth in rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev.*, 10: 2696-2706.

- Xu J. R.**, Sweigard J. A., Hamer J. E. (1997). The CPKA gene of *Magnaporthe grisea* is essential for appressorial penetration. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 22: 187-194.
- Xu J. R.**, Staiger C. J., Hamer J. E. (1998). Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cell but allows the activation of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 12713-12718.
- Yager L. N.**, Lee D. L., Nagle D. L. Zimmerman. (1998). Analysis of fluG mutations that affect light-dependent conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 149: 1777-1786.
- Yang J.**, Winkler K., Yoshida M., and Kornbluth S. (1999). Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: A role for 14-3-3- mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *EMBO J.*, 18: 2174–2183.
- Yang O.**, Poole S. I., Borkovich K. A. (2002). A G-protein beta subunit required for sexual and vegetative development and maintenance of normal G alpha protein levels in *Neurospora Crassa*. *Eucaryot. Cell*, 1(3): 378-90.
- Yang Z. and Dickman M. B.** (1999) Molecular cloning and characterization of Ct-PKAR, a gene encoding the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Colletotrichum trifolii*. *Arch. Microbiol.*, 171: 249-256.
- Yanisch-Perron C.**, Vieira J., Messing J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- Yu J. H.**, Wieser J., Adams T. H. (1996). The *Aspergillus Flba* RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J.*, 15: 5184-5190.
- Zeilinger S.**, Galhaup C., Payer K., Woo S. L., Mach R. L., Fekete C., Lorito M., Kubicek C. P. (1999). Chitinase gene expression during mycoparasitic

interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. Fungal Genet. Biol., 26: 131-140

**Zeilinger S.**, Ebner A., Marosit T., Mach R., Kubicek C. P. (2001). The *Hypocrea jecorina* HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within the *cbh2* (cellobiohydrolase II-gene) activating element. Mol Genet Genomics 266: 56-63.

**Zeilinger S.**, Reither B., Scala V. Peissl I., Lorito M., Mach R. L. (2004) Signal transduction involving Tga3, a novel G protein  $\alpha$  subunit of *Trichoderma atroviride*, affects conidiation and mycoparasitism-related chitinase production. (in corso di pubblicazione).

**Zha J.**, Harada H., Yang E., Jockel J., Korsmeyer S. J.: Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 1996, 87: 619-628.

**Zheng L.**, Campbell M., Murphy J., Lam S., Xu J. R. (2000). The *bmp1* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. Mol. Plant Microbe Interact., 13: 724-732.

**Zheng X. H. and Shalloway D.** (2001). Two mechanisms activate PTP  $\alpha$  during mitosis. EMBO J, 20(21): 6037-6049.

**Zhu Y.**, Wang Y., Xia C., Li D., Li Y., Zeng W., Yuan W., Liu H., Zhu C., Wu X., Liu M. (2004) WDR26: a novel G $\beta$ -like protein, suppresses MAPK signalling pathway. J. Cellular Biochem., 93: 579-587.

**Zimmerman P. E.**, Voelker D. R., McCormack F. X., Paulsrud J. R., Martin II W. J. (1992) 120-kD surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* is a ligand for surfactant protein. A. J. Clin. Investig., 89: 143-149.

**Zuber S.**, Haynes M. J., Adrianopoulos A. (2002). G-protein signalling mediates asexual development at 25 °C but has no effect on yeast-like growth at 37 °C in the dimorphic fungus *Penicillium marneffei*. Eukaryotic Cell., 1: 440-447.

**Zuber S.**, Haynes M. J., Adrianopoulos A. (2003) The G-protein  $\alpha$ -subunit GasC plays a major role in germination in the dimorphic fungus *Penicillium marneffei*. Genetics, 164: 487-499.

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

Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia  
vegetale

Sezione Patologia Vegetale

Dottorato di ricerca in

*Agrobiologia e Agrochimica*

XVIII Ciclo

Relazione finale sulle attività svolte durante il dottorato

Relatore: Ch.mo Prof. Matteo Lorito  
Co-relatore: Ch.mo Prof. Felice Scala

Dottoranda: Valeria Scala

## **Trasduzione del segnale nel genere *Trichoderma*.**

Le lectine presenti sulla parete cellulare del fungo fitopatogeno *Sclerotinia rolfii* sono fra i segnali di riconoscimento che inducono sia l'avvolgimento delle ife dell'ospite da parte delle ife di *Trichoderma*, "coiling", sia la secrezione di sostanze di adesione coinvolte nell'interazione tra *Trichoderma* e il suo ospite (Inbar and Chet, 1994). L'evento di riconoscimento mediato dall'interazione lectine-carboidrati, agisce come segnale per innescare cambiamenti morfologici (i.e "coiling" e formazione dell'appressorio), il riarrangiamento del citoscheletro, la divisione nucleare e la secrezione di antibiotici ed enzimi idrolitici tipici di una risposta parassitaria. Contrariamente a quanto è noto sui fattori coinvolti nel micoparassitismo ancora poco è conosciuto riguardo alla trasduzione del segnale in *T. atroviride*. Al momento è stata studiata la proteina di *T. atroviride* Tga1 del gruppo I coinvolta nel "coiling", nella produzione di metaboliti antifungini, nella regolazione dell'espressione di chitinasi e nella produzione dei conidi indotta dalla luce (Reithner et al., 2004). In *T. virens* è stata caratterizzata la proteina TgaA coinvolta nell'antagonismo contro *S. rolfii* ma non contro *R. solani* e la proteina TgaB delle proteine G del II gruppo che sembra non avere un ruolo specifico nello sviluppo e nel micoparassitismo (Mukherjee. et al., 2004). Oltre alle proteine G sono state studiate anche le MAP (Mitogen-Activated Protein) chinasi come la proteina TmkA di *T. virens* che risulta essere coinvolta nell'attività di biocontrollo. Infatti i mutanti difettivi per questa proteina mostrano una ridotta capacità di controllare *S. rolfii* e incapacità di attaccare gli sclerozi (Mukherjee et al., 2003).

L'obbiettivo di questo lavoro è di isolare alcuni dei geni i cui prodotti sono coinvolti nella trasduzione del segnale attivata durante il micoparassitismo, creare e caratterizzare mediante analisi genomica, proteomica e fisiologica, mutanti difettivi di *T. atroviride* per i geni isolati, al fine di studiarne il coinvolgimento nei meccanismi di biocontrollo.

In particolare è stato studiato e caratterizzato il gene codificante per la subunità  $\alpha$  di una proteina G del III gruppo.

## **Materiali e Metodi**

### **Condizioni di crescita**

Il ceppo P1 di *Trichoderma atroviride* (*T. "harzianum"* ATCC 74058) è stato fatto crescere su PDA (potato dextrose agar) a 28 °C e le spore sono state raccolte dopo 7 giorni con acqua distillata e 0.1% Tween-20.

Una sospensione di  $8 \times 10^8$  spore/ml di *T. atroviride* è stata fatta crescere in 200 ml di SM 1X con aggiunta di glicerolo 1%, per 36 ore a 28°C in un agitatore rotante a 120 rpm. Successivamente è

stato effettuato il trasferimento del micelio nei diversi terreni di coltura per le successive analisi (Zeilinger et al., 1999). Le condizioni di crescita utilizzate per indurre gli enzimi litici sono state: SM 1X con aggiunta di chitina colloidale 1% (p/v), N-acetil-glucosamina 1% (p/v), biomassa *R. solani* 1% (p/v) e inoltre il *T. atroviride* è stato allevato nel filtrato colturale di *R. solani*. Per le condizioni di controllo il *T. atroviride* è stato allevato in SM 1X con aggiunta di glicerolo 1% oppure glucosio 1%. Per l'analisi proteomica dell'interazione a tre componenti è stato messo a punto un nuovo sistema in coltura solida. Semi di pomodoro sterilizzati in una soluzione di 1% di ipoclorito di sodio sono stati posti sui margini di piastre petri di WA (water agar, con 1.5% di agar) da 15 cm di diametro e disposte verticalmente, ricoprendo la piastra con fogli di alluminio per simulare una condizione simile a quella *in vivo*. I semi sono stati fatti germinare per 20 giorni nelle piastre di WA, che sono state opportunamente incise per permettere l'uscita delle foglie cotiledonari. Dopo 20 giorni le piantine sono state infettate con *R. solani*.

Contemporaneamente su dischi di cellophane sterilizzati e posti su piastre Petri di 15 cm di PDA sono stati inoculati 30  $\mu$ l di una sospensione di  $8 \times 10^8$  spore/ml di *T. atroviride* spp e lasciati crescere per 48h a 28 °C. Successivamente i dischi di cellophane sono stati posti sulle piastre di WA contenenti le piantine di pomodoro e il patogeno precedentemente inoculati.

### **Manipolazione degli acidi nucleici**

L'estrazione del DNA e dell'RNA e le analisi Southern e Northern sono state effettuate come descritto da Peterbauer e colleghi (1996). La distruzione genica mirata è stata eseguita come descritto da Brunner e colleghi (2003).

### **Saggi di biocontrollo**

I saggi di biocontrollo sono stati realizzati come descritto da Brunner e colleghi (2003).

### **Saggi enzimatici**

E' stata determinata l'attività chitinasica intracellulari, associata al micelio e quella presente nei filtrati colturali. L'attività enzimatica legata al micelio e intracellulare è stata determinata come descritto da Zelinger e colleghi (2004). I saggi enzimatici sono stati eseguiti, come descritto da Brunner e colleghi (2003).

### **Analisi proteomica**

E' stata effettuata l'analisi delle miscele delle proteine intracellulari ed esocellulari di P1 e del mutante difettivo per la proteina Tga3 tramite gel 2D. L'estrazione delle proteine intracellulari e la

separazione proteica per l'analisi proteomica è stata effettuata come descritto da Gorg e collaboratori (2000) con alcune modifiche. Per quanto riguarda l'estrazione delle proteine esocellulari è stato messo a punto un nuovo protocollo, mentre per la separazione con IEF e SDS-PAGE è stato eseguito un procedimento analogo alle proteine intracellulari.

Lo studio dei gel 2D è stato effettuato come descritto dalla casa produttrice del software PDQUEST.

## **Risultati**

### **Clonaggio dei geni *tgb1 tga3 tmk1* e *tmk3***

E' stata effettuata l'amplificazione del genoma di P1 mediante PCR con primer degenerati e sono stati ottenuti un frammento di 1200 bp per *tgb1*, 1000 bp per *tga3*, 1100 bp per *tmk1* e 1000 bp per *tmk3*.

### **Analisi della libreria genomica di *T. atroviride* ceppo P1**

Mediante l'analisi di una libreria genomica di *Trichoderma atroviride* ceppo P1 sono state ottenute le sequenze del promotore, del terminatore e della ORF (Open Reading Frame) dei geni *tmk1*, *tgb1* e *tga3* mentre per *tmk3* è stata ottenuta solo la sequenza parziale del promotore e della ORF.

### **Studio dell'espressione dei geni *tga3*, *tmk1* e *tgb1***

Per analizzare se l'espressione di *tmk1*, *tgb1* e *tga3* è costitutiva o indotta durante il micoparassitismo, è stata eseguita un'analisi Northern su RNA estratto da *T. atroviride* in condizioni di micoparassitismo durante il saggio di confronto, "confrontation assay", contro *R. solani*. Dall'analisi Northern risulta che l'espressione del gene *tga3* è costitutiva e non molto forte durante le diverse fasi dell'interazione con l'ospite. La trascrizione dei geni *tmk1* e *tgb1* è accentuata durante le prime fasi del micoparassitismo mentre il livello d'espressione decresce quando il *Trichoderma* entra in contatto con le ife del fungo *R. solani*.

### **Distruzione genica mirata dei geni *tmk1*, *tgb1* e *tga3* in *Trichoderma atroviride***

La distruzione genica ha generato diversi mutanti analizzati tramite analisi Southern per verificare l'inserimento della cassetta di distruzione e con RT-PCR per verificare l'assenza del trascritto. Sono stati ottenuti mutanti difettivi per le proteine Tmk1 e Tga3.

### **Capacità di micoparassitizzare il fungo ospite da parte di $\Delta tga3$**

Per determinare se la proteina Tga3 è coinvolta nella trasduzione del segnale attivata durante il micoparassitismo, è stato effettuato un saggio di confronto in piastra contro *R. solani* del ceppo P1 e di  $\Delta tga3$  mutante di *T. atroviride* difettivo per il gene *tga3*. Questo saggio ha messo in evidenza la ridotta capacità di biocontrollo del ceppo difettivo per la Tga3 rispetto al P1. Questo risultato è stato confermato dal saggio *in vitro*, che valuta la capacità dei filtrati colturali di P1 e  $\Delta tga3$  di inibire la germinazione dei conidi di *B. cinerea* e dal saggio *in vivo* contro *R. solani* e *B. cinerea*, su piante di *Phaseolus vulgaris* cv cannellino. Nei saggi *in vivo* il mutante mostra una ridotta capacità di controllare la malattia provocata dal patogeno rispetto al ceppo P1 che codifica regolarmente la proteina Tga3.

### **Attività chitinasiche di $\Delta tga3$**

Per saggiare la produzione di enzimi chitinolitici di P1 e  $\Delta tga3$  sono stati effettuati i saggi sui filtrati colturali dei due campioni cresciuti in SM 1X con aggiunta di 1% (p/v) di N-acetil-glucosamina o 1% (p/v) di chitina colloidale come mezzi inducenti e SM 1X con aggiunta di glucosio 1% o di glicerolo 1% come mezzo non inducente. Nel ceppo  $\Delta tga3$  non è stata osservata alcuna produzione di chitinasi in presenza di glucosio e glicerolo come in P1, ma in presenza di N-acetil-glucosamina è stata evidenziata una riduzione della produzione della NAGasi rispetto al ceppo selvatico; il ceppo difettivo cresciuto con chitina colloidale ha l'attività NAG-asi e endochitinasica ridotta rispetto al ceppo P1.

### **Analisi dell'espressione di *nag1* ed *ech42* in $\Delta tga3$**

Un'analisi Northern dei trascritti *nag1* ed *ech42* di P1 e  $\Delta tga3$ , cresciuti in N-acetilglucosamina e chitina colloidale, è stata effettuata per esaminare se la ridotta attività chitinasica esocellulare del ceppo  $\Delta tga3$  sia dovuta ad una riduzione della trascrizione di tali geni. Nel ceppo P1 di *T. atroviride* la trascrizione di *nag1* è massima 5 h dopo il replacement in N-acetilglucosamina, diminuisce dopo 10 h ed è nulla dopo 12 h. Quando invece è utilizzata la chitina colloidale come sorgente di carbonio i geni *nag1* ed *ech42* raggiungono il massimo della trascrizione dopo 36 e 48 ore. L'espressione di questi geni in  $\Delta tga3$  è maggiore rispetto al P1.

### **Attività NAGasica legata al micelio e intracellulare.**

Sebbene il mutante difettivo per il gene *tga3* ha mostrato un'elevata quantità di trascritto dei geni *nag1* e *ech42* la quantità di attività chitinasica esocellulare è ridotta rispetto al ceppo P1. Per analizzare il percorso delle chitinasi nei mutanti  $\Delta tga3$  è stata misurata l'attività NAGasica

intracellulare e associata al micelio del mutante e del ceppo P1 di *T. atroviride* dopo l'induzione in N-acetilglucosamina 1%. Livelli simili di attività NAGasi legata al micelio e intracellulare sono stati riscontrati sia in P1 che in  $\Delta tga3$ .

### **Analisi proteomica del $\Delta tga3$ e P1 di *T. atroviride*.**

E' stata effettuata l'analisi proteomica delle proteine intracellulari ed esocellulari di  $\Delta tga3$  e P1 cresciuti in diverse condizioni colturali: in WA in presenza di piantine di pomodoro e di *R. solani*, SM 1X con aggiunta di 1% di biomassa (BM) di *R. solani* e nel filtrato colturale (FC) di *R. solani*. Le proteine (200  $\mu$ g) sono state separate su gel 2D utilizzando strip da 7 cm pH 3-10 e 4-7, le strip con intervalli di pH ristretti sono state usate per migliorare la separazione delle miscele proteiche. Sui gel 2D sono state eseguite le analisi mediante il software PDQUEST per determinare gli spot differenzialmente espressi.

### **Analisi proteomica delle proteine intracellulari di P1 e $\Delta tga3$**

Nelle tabelle di seguito riportate sono indicati i risultati dell'analisi PDQUEST delle mappe delle proteine intracellulari ed esocellulari di  $\Delta tga3$  e P1 cresciuti nelle diverse condizioni di crescita, separate con strip da 7 cm con intervallo di pH 3-10 e 4-7. I risultati dell'analisi delle immagini sono indicati con la nomenclatura di seguito riportata: con il termine "on" sono stati indicati tutti gli spot che sono presenti in  $\Delta tga3$  e assenti nel P1; con "off" sono riportati gli spot assenti nel  $\Delta tga3$  e presenti nel P1. Con la dicitura "incrementati" sono indicati tutti gli spot presenti in entrambi i campioni e la cui quantità (intesa come densità ottica, OD) è almeno il doppio nel  $\Delta tga3$  rispetto al P1, mentre con "decrementati" sono indicati tutti gli spot presenti sia nel mutante difettivo che nel P1, la cui quantità intesa come intensità ottica, nel  $\Delta tga3$  è almeno la metà rispetto al P1. Con il termine "erratici" sono indicati gli spot che variano tra i due campioni ovvero è la somma degli spot on, off, incrementati e decrementati; con la dicitura "conservati" sono indicati tutti gli spot presenti in entrambi e la cui intensità ottica nei due campioni è invariata e infine con il termine "totali" è riportato il numero totale di tutti gli spot presenti nella mappa.

**Tabella 1:** risultato dell'analisi effettuata con il software PDQUEST delle mappe delle proteine intracellulari di *Atga3* e P1 cresciuti in WA+Pomodoro+ *R. solani* in due diversi intervalli di pH 3-10 e 4-7.

	<i>ON</i>	<i>OFF</i>	<i>Incrementati</i>	<i>Decrementati</i>	<i>Erratici</i>	<i>Conservati</i>	<i>Totali</i>
<b>pH 3-10</b>	26	46	88	94	254	150	404
<b>pH 4-7</b>	13	29	38	52	132	82	214

**Tabella 2:** risultato dell'analisi effettuata con il software PDQUEST delle mappe delle proteine intracellulari di *Atga3* e P1 cresciuti in SM 1X+1% BM *R. solani* in due diversi intervalli di pH 3-10 e 4-7.

	<i>ON</i>	<i>OFF</i>	<i>Incrementati</i>	<i>Decrementati</i>	<i>Erratici</i>	<i>Conservati</i>	<i>Totali</i>
<b>pH 3-10</b>	20	61	99	138	318	105	423
<b>pH 4-7</b>	15	40	54	60	169	43	212

**Tabella 3:** risultato dell'analisi effettuata con il software PDQUEST delle mappe delle proteine intracellulari di *Atga3* e P1 cresciuti in FC di *R. solani* in due diversi intervalli di pH 3-10 e 4-7.

	<i>ON</i>	<i>OFF</i>	<i>Incrementati</i>	<i>Decrementati</i>	<i>Erratici</i>	<i>Conservati</i>	<i>Totali</i>
<b>pH 3-10</b>	23	28	140	179	370	120	490
<b>pH 4-7</b>	16	15	83	89	203	73	276

**Tabella 4:** risultato dell'analisi effettuata con il software PDQUEST delle mappe delle proteine esocellulari di *Δtga3* e P1 cresciuti in SM 1X+1% (p/v) BM *R. solani* in due diversi intervalli di pH 3-10 e 4-7.

	<i>ON</i>	<i>OFF</i>	<i>Incrementati</i>	<i>Decrementati</i>	<i>Erratici</i>	<i>Conservati</i>	<i>Totali</i>
<b>pH 3-10</b>	17	23	40	59	139	30	169
<b>pH 4-7</b>	9	15	14	25	63	22	85

**Tabella 5:** risultato dell'analisi effettuata con il software PDQUEST delle mappe delle proteine esocellulari di *Δtga3* e P1 cresciuti in FC *R. solani* in due diversi intervalli di pH 3-10 e 4-7.

	<i>ON</i>	<i>OFF</i>	<i>Incrementati</i>	<i>Decrementati</i>	<i>Erratici</i>	<i>Conservati</i>	<i>Totali</i>
<b>pH 3-10</b>	13	19	35	79	146	25	171
<b>pH 4-7</b>	8	10	18	55	91	13	104

Tra le proteine intracellulari ed esocellulari differenzialmente espresse in P1 e *Δtga3* cresciuti nelle diverse condizioni, sono state analizzate tramite MALDI-TOF diverse proteine. Di queste proteine solo alcune sono state identificate con la ricerca in banca dati effettuata con il programma Mascot, appaiando i PMF (Peptide Mass Fingerprinting) delle proteine analizzate tramite MALDI-TOF e i PMF delle proteine disponibili in banca dati. Nelle tabelle 6 e 7 sono riportati i risultati della ricerca in banca dati.

**Tabella 10.** tabella riassuntiva dell'identificazione delle proteine endocellulari del micelio di *T. atroviride* ceppo selvatico P1 e ceppo mutante *Atga3* cresciuti in diverse condizioni: WA (sistema a "tre" *Trichoderma*+ pomodoro+*R. solani*), BM (Salt Medium 1 X + 1% (p/v) di biomassa di *R. solani*) e FC (filtrato culturale di *R. solani*). In grassetto è stato evidenziato il ceppo in cui lo spot ha un OD maggiore. (coverage: percentuale di appaiamento tra i PMF della proteina analizzata e quella presente in banca dati)

	N spot	Funzione	specie	N. accesso (GI)	MW Teorico (KDa)	MW osservato (KDa)	pI teorico	pI osservato	coverage (%)
<b>WA</b>									
P1	<b>3208</b>	IME4 fattore di trascrizione	<i>Neurospora crassa</i>	32417112	35.8	30	6.5	5.8	18
P1	<b>7054</b>	PTP, protein tyrosine phosphatase	<i>Candida albicans</i>	46436787	36.9	36	8.7	8.6	22
<b>P1-<i>Atga3</i></b>	<b>6203</b>	WD40 Regolatore della trascrizione	<i>Aspergillus fumigatus</i>	41581315	36	33	6.3	6.8	30
<i>Atga3</i>	<b>1414</b>	WD40 Proteina ipotetica	<i>Cryptococcus neoformans</i>	50260567	40.6	40	5.3	5	18
P1- <b><i>Atga3</i></b>	<b>7303</b>	Glucosammina fosfato N-acetil transferase	<i>Magnaporthe grisea</i>	38100467	20	33	5.0	5.8	26
<i>Atga3</i>	<b>2101</b>	proteina GKAP	<i>Giberella zeae</i>	42549616	14	28	5.9	4.8	36
<b>BM</b>									
P1	<b>7005</b>	14-3-3	<i>Trichoderma reesei</i>	CAC20378	30	36	4.9	8.0	15
P1- <b><i>Atga3</i></b>	<b>7407</b>	$\beta$ -1,3-glucosidasi	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	19113016	53.5	55	5.7	7.0	17
<b>FC</b>									
<b>P1</b>	<b>6501</b>	WD40 Proteina ipotetica	<i>Ustilago maydis</i>	46098287	66.7	43	6.1	6.5	15
<i>Atga3</i>	<b>8304</b>	Endoglucanasi di classe V	<i>Humicola insolens</i>	1ENG2	11	34	6.5	8.7	27

**Tabella 11.** Tabella riassuntiva dell'identificazione delle proteine esocellulari di *T. atroviride* ceppo P1 e *Δtga3* cresciuti in diverse condizioni: BM (Salt Medium + 1%(p/v) di biomassa di *R. solani*) e FC (filtrato colturale di *R. solani*). In grassetto è stato evidenziato il ceppo in cui lo spot ha un OD maggiore. (coverage: percentuale di appaiamento tra i PMF della proteina analizzata e quella presente in banca dati)

	N° spot	Funzione	specie	N° accesso (GI)	MW Teorico (KDa)	MW osservato (KDa)	pI teorico	pI osservato	<i>coverage</i> (%)
<b>BM</b>									
P1- <i>Δtga3</i>	<b>7009</b>	Elicitore NIP1	<i>Rhincosporium secalis</i>	2147813	8.8	17	8.0	4.5	81
P1	<b>3502</b>	β-1,4-glucanasi	<i>Neocallimastix frontalis</i>	3712668	54.6	35	4.8	5.4	19
P1	<b>7401</b>	Proteasi acida	<i>Candida boidinii</i>	30024582	45	35	4.7	4.5	13
P1	<b>4001</b>	Serina proteasi	<i>Bionectria ochroleuca</i>	38327027	24.8	27	10.0	4.0	28
P1	<b>8056</b>	Antigen, MSG-major surface protein	<i>Pneumocystis carinii</i>	309820	44	43	6.2	5.8	34
P1- <i>Δtga3</i>	<b>4006</b>	Pathogenesis Related protein	<i>Ustilago maydis</i>	46096755	30	28	9.6	5.0	25
P1	<b>5503</b>	β-xylanasi	<i>Bacillus</i> spp	46096755	60	33	5.8	5.7	15
P1	<b>1836</b>	chitinasi	<i>Rhizopus microsporus</i>	1565203	45.7	47	6.0	4.8	18
<b>FC</b>									
P1- <i>Δtga3</i>	<b>6201</b>	chitosanasi	<i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>robiniae</i>	22474525	31	30	5.5	5.5	19
P1- <i>Δtga3</i>	<b>2105</b>	Chitina deacetilasi	<i>Haemophilus somnus</i>	46156356	41	25	5.2	4.8	30

## **Bibliografia**

**Brunner K.**, Peterbauer C. K., Mach R. L., Lorito M., Zeilinger S., Kubicek C. P. (2003). The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr. Genet.* 43:289-295.

**Gorg A.**, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Sheibe B, Wildgruber R, Weiss W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilize pH gradients. *Electrophoresis* April; 21 (6): 1037-53.

**Inbar J. and Chet I.** 1994. A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus mycoparasitism by *Trichoderma harzianum* . *Microbiology* 140: 651-657.

**Mukherjee P. K.**, Latha J., Hadar R., Horwitz B.A. (2003). TmkA, a Mitogen Activated Protein Kinase of *Trichoderma virens* is involved in Biocontrol Properties and repression of conidiation in the dark. *Eukariotic cell* 2(3): 446-455.

**Mukherjee P. K.**, Latha J., Hadar R., Horwitz B.A. (2004). Role of two G protein alpha subunits, TgaA and TgaB in the antagonism of plant pathogens by *Trichoderma virens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 542-549.

**Reithner B.** Brunner K. Peissel I. Seidl V. Zeilinger S. (2004) The G protein  $\alpha$  subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and production of antifungal metabolites . *Eukariotic Cell* (submitted).

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

**Zeilinger S.**, Reither B., Scala V. Peissl I., Lorito M., Mach R. L. (2004) Signal transduction involving Tga3, a novel G protein  $\alpha$  subunit of *Trichoderma atroviride*, affects conidiation and mycoparasitism-related chitinase production. (submitted AEM).