UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE
FACOLTÀ DI AGRARIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ANIMALI, VEGETALI E DELL'AMBIENTE (S.A.V.A.)

Dottorato di Ricerca in Difesa e

Qualità delle produzioni Agroalimentari e Forestali

XXIII ciclo

S.S.D.MUR: AGR/12

Approcci molecolari per la comprensione dei meccanismi genetici della degradazione della patulina da parte dell'agente di biocontrollo Rhodosporidium kratochvilovae *ceppo LS11 e da parte del ceppo IAM 13481 di* Sporobolomyces *sp.*

Coordinatore:

Chiar.mo prof. Pasquale Trematerra

Relatore

Chiar.mo Prof. Raffaello Castoria

Correlatore

Prof.ssa Sandra A. I. Wright

Dottorando

Giuseppe Ianiri

Matr. n°: 141266

a Papà, Mamma e Paola

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che hanno contribuito, direttamente o indirettamente, alla realizzazione di questo lavoro di tesi.

Il Prof. Raffaello Castoria per i preziosi suggerimenti e la costante presenza durante lo svolgimento delle attività sperimentali.

I Prof. De Cicco Vincenzo, Sandra Wright, Giuseppe Lima e Filippo de Curtis per l'esperienza messa a disposizione.

Il Prof. Alexander Idnurm (University of Missouri-Kansas City, UMKC) per avermi ospitato nel suo laboratorio facendomi sentire a mio agio e per aver dispensato consigli utilissimi per la realizzazione di questo lavoro; con lui desidero ringraziare anche Erika, Denise, Silvia, Suman, Surbhi e Viplendra.

Ringrazio, infine, tutti i ragazzi del laboratorio di Patologia Vegetale del Dip. SAVA, in particolare i dott. Dario De Felice, Domenico Vitullo, Paolo D'Apruzzo e Sara D'Alonges per essere stati sempre presenti durante lo svolgimento del dottorato

INTRODUZIONE 6
1 – Cenni introduttivi 7
2 – Lotta biologica 8
2.1 – Meccanismi coinvolti nelle interazioni tra Patogeno e Antagonista 9
3 – Micotossine 13
3.1 – Micotossicosi 15
3.2 - Interventi contro le micotossine 17
4 – Patulina 19
4.1 – Tossicità della patulina 20
4.2 - Limiti di tolleranza della patulina 23
4.3 – Prevenzione e contenimento pre/post-raccolta 24
5 – Tecniche molecolari per lo studio della funzione genica nei funghi 28
5.1 – Reverse genetics 28
5.1.1 – Tecniche molecolari per la generazione dei costrutti da utilizzare per la mutagenesi mirata 29
5.2 – Forward genetics 34
5.3 – Metodi di trasformazione genetica impiegati per i lieviti basidiomiceti 34
5.3.1 – Trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* 34
5.3.2 – Trasformazione biolistica 41
5.3.3 – Trasformazione mediante elettroporazione 42
SCOPO E RIASSUNTO DELLA TESI 45
MATERIALI E METODI 51
7.1 – Microrganismi 52
7.2 - Reagenti chimici 53
7.3 - Trasformazione di *R. kratochvilovae* LS11 mediata da *Agrobacterium tumefaciens* 54
7.3.1 - Determinazione della CMI per *R. kratochvilovae* LS11 degli antibiotici usati nella selezione post-trasformazione 54
7.3.2 - Determinazione della CMI del cefotaxime per *A. tumefaciens* EHA105 54
7.3.3 - Vettori utilizzati per la trasformazione 55
7.3.4 - Trasformazione mediata da *A. tumefaciens* 55
7.3.5 - Test di stabilità dei putativi trasformanti di *R. kratochvilovae* LS11 ottenuti 56
7.3.6 - Analisi genetico-molecolare dei putativi trasformanti ottenuti 57
7.3.6.1 - Estrazione del DNA genomico 57
7.3.6.2 - Analisi PCR 58

7.3.6.3 - Analisi *Southern blot* 60
7.3.6.4 - Analisi *inverse* PCR dei putativi trasformanti selezionati 63
7.3.6.5 - Analisi microscopica dell'espressione della GFP *(Green Fluorescent Protein)* 65
7.4 - Saggi di degradazione della patulina da parte di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 65
7.5 - Trasformazione mediata da *A. tumefaciens* degli auxotrofi *ura* di *Sporobolomyces* sp IAM 13481 e *R. kratochvilovae* LS11 68
7.5.1 – Cenni introduttivi sull'auxotrofia per l'uracile 68
7.5.2 - Generazione e caratterizzazione di auxotrofi *ura* di *Sporobolomyces* sp IAM 13481 69
7.5.3 - Costruzione del vettore binario pPZP-URA5 70
7.5.4 - Trasformazione mediata da *A. tumefaciens* 71
7.5.5 - Analisi genetico-molecolare dei trasformanti ottenuti 72
7.5.6 - Saggi di degradazione della patulina da parte dei trasformanti prototrofi 73
7.5.7 - Caratterizzazione genetico-molecolare dei mutanti *slower patulin degraders* 74
7.6 - Mutagenesi mirata 76
7.6.1 - Generazione del costrutto per la mutagenesi mirata del gene *VPS8* mediante *overlap* PCR 76
7.6.2 – Gene replacement del gene *VPS8* utilizzando la *Double Joint PCR con URA5-split marker* 77
7.6.3 - Generazione del costrutto per la mutagenesi mirata del gene *VPS8* mediante ricominazione *in vivo* in *Saccharomyces cerevisiae* 80
7.6.4 - Analisi genetico-molecolare dei putativi mutanti *vps8*Δ 84
7.6.5 - Mutagenesi mirata a carico dei geni *DHL* e *rDHL* 84
7.6.6 - Analisi genetico-molecolare dei putativi mutanti *dlh*Δ e *rdlh*Δ 86
7.7 - Analisi fenotipica dei mutanti *slower patulin degraders, vps8*Δ e dei putativi mutanti *dlh*Δ *e rdlh*Δ 87
RISULTATI 89
8.1 – Trasformazione di *R. kratochvilovae* mediata da *Agrobacterium tumefaciens* 90
8.1.1 - Sensibilità di *R. kratochvilovae* LS11 agli antibiotici 90
8.1.2 - Sensibilità di *Agrobacterium tumefaciens* al cefotaxime 90
8.1.3 - Trasformazione mediata da *A. tumefaciens* 90
8.1.4 - Analisi genetico-molecolare dei putativi trasformanti di *R. kratochvilovae* LS11 91

8.1.4.1 – Analisi mediante PCR e *Southern blot* 91
8.1.4.2 – Analisi mediante *inverse* PCR 94
8.2 - Degradazione della patulina da parte di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 96
8.3 - Selezione di auxotrofi spontanei per l'uracile per *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 .. 99
8.4 – AMT dell'auxotrofo AIS2 derivato da *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 e del putativo auxotrofo Rgpo1 di *R. kratochvilovae* LS11 100
8.4.1 - Degradazione della patulina da parte dei trasformanti prototrofi derivati dall'auxotrofo *Sporobolomyces* sp. AIS2 102
8.4.2 - Caratterizzazione genetico-molecolare dei mutanti *slower patulin degraders* 104
8.5 - Mutagenesi mirata (*gene replacement*) 111
8.5.1 - Generazione dei costrutti per la mutagenesi mirata del gene *VPS8* 111
8.5.2 - Analisi genetico-molecolare dei putativi mutanti *vps8*Δ ottenuti 112
8.5.3 - Analisi fenotipica del mutante *vps8*Δ(9) ottenuto 115
8.5.4 - Generazione dei costrutti e trasformazione per la mutagenesi mirata dei geni *DLH* e *rDLH* 117
8.5.5 - Analisi genetico-molecolare dei putativi mutanti *dlh*Δ 118
8.5.6 - Analisi genetico-molecolare dei putativi mutanti *rdlh*Δ 119
8.5.7 - Analisi fenotipica dei putativi mutanti *dlh*Δ e *rdlh*Δ 120
DISCUSSIONE 121
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE 141
TABELLE 145
FIGURE 154
BIBLIOGRAFIA 179

INTRODUZIONE

1 – Cenni introduttivi

Lo sviluppo di nuove strategie di lotta contro malattie di origine fungina a carico di piante di interesse agrario rappresenta, sia in campo che in post-raccolta, l'alternativa scientifica e sociale alla riduzione dell'utilizzo di prodotti chimici di sintesi in agricoltura (Janisiewicz e Korsten, 2002). Nonostante i notevoli cambiamenti che di recente hanno caratterizzato la produzione agricola in genere e ortofrutticola in particolare, le perdite quantitative e qualitative che si registrano sono ancora un problema attuale, soprattutto a causa del potenziamento della produzione e del contemporaneo allontanamento nello spazio dei mercati di consumo rispetto alle zone di coltivazione (Janisiewicz e Korsten, 2002). Per quanto riguarda il settore del post-raccolta, sebbene negli ultimi anni lo sviluppo di moderni fungicidi e le innovative tecniche di conservazione hanno permesso di prolungare la *shelf life* dei prodotti conservati, le perdite che si registrano dopo la raccolta a causa di alterazioni di natura parassitaria, ammontano a circa il 20-25% della produzione agricola mondiale (El-Ghaouth *et al.,* 2004; Droby, 2006; Zhu, 2006; Singh e Sharma, 2007).

Nonostante i fungicidi sintetici siano ancora il principale mezzo di lotta contro gli agenti di marciumi in post-raccolta (Janisiewicz e Korsten, 2002, El-Ghaouth *et al.,* 2004; Korsten, 2006; Singh e Sharma, 2007; Zhu, 2006; Sharma *et al.,* 2009), la maggior sensibilità dell'opinione pubblica ai potenziali rischi ambientali legati all'uso di fitofarmaci di sintesi, la progressiva perdita di efficacia di altri per l'insorgenza di ceppi resistenti di alcuni patogeni fungini, i problemi legati al ritiro dal mercato di alcuni prodotti, la revoca dell'autorizzazione all'impiego di alcuni composti chimici, soprattutto per quanto riguarda i trattamenti in prossimità della raccolta e/o in post-raccolta, e non ultimo la sempre più crescente attenzione da parte di produttori e consumatori alla salubrità dei prodotti alimentari a causa del rischio associato alla presenza di residui negli alimenti, hanno dato impulso ad un crescente sviluppo di strategie di difesa alternative e/o integrabili all'uso di fungicidi ma più sicure per la salute dei consumatori e al tempo stesso efficaci ed economicamente accettabili (Gullino, 1994; Gullino e Kuijpers, 1994; Mari *et al.,* 2007).
Una valida alternativa alla lotta chimica è rappresentata dalla lotta biologica; essa prevede l'impiego di microrganismi naturali, isolati da superfici vegetali (carposfera) o dal suolo, in grado di contenere lo sviluppo di funghi fitopatogeni (Wilson e Wisniewski, 1989; Droby *et al.,* 1991; Wisniewski e Wilson, 1992; Droby, 2006; Korsten, 2006; Castoria *et al.,* 2008; Sharma *et al.,* 2009).

2 – Lotta biologica

Sono molte le definizioni di lotta biologica date nel corso degli anni, la più esauriente delle quali è la quella di Cook e Baker (1983): il controllo biologico è la riduzione del potenziale di inoculo o di una malattia prodotta dall'attività di un patogeno ottenuta da o attraverso l'uso di uno o più organismi diversi dall'uomo. Questa definizione di controllo biologico è basata sull'utilizzo di organismi e procedure che includono: A) l'applicazione di ceppi avirulenti, ipovirulenti o popolazioni non patogene, B) microrganismi antagonisti e C) manipolazione genetica della pianta ospite in modo da renderla resistente agli attacchi del patogeno. Questo tipo di lotta esclude dunque l'uso di mezzi chimici, come previsto dal regolamento CE 834/2007 del 28/06/2007 che abroga il precedente Regolamento CEE 2092/91.

La lotta contro le malattie delle piante mediante agenti di biocontrollo deve esplicarsi mediante una costante interazione tra pianta ospite, patogeno, agente di biocontrollo e ambiente (caratteristiche metereologiche e microbiologiche intese come microbiocenosi presente su fillosfera, carposfera e rizosfera).

Dopo quaranta anni dalla sua prima applicazione, la lotta biologica per il controllo delle malattie delle piante, si basa comunque ancora su pochi agenti di biocontrollo (antagonisti) disponibili nei mercati europei (Alabouvette *et al.*, 2006). Infatti, non per tutti i fitopatogeni sono stati individuati antagonisti efficaci in grado di contenerli. Ciò è riconducibile anche al fatto che il processo di produzione del prodotto non è semplice, ed implica due fasi essenziali: la selezione di microrganismi antagonisti e lo studio delle modalità di azione di questi agenti. Inoltre, per una corretta strategia di applicazione sono necessari anche considerevoli studi in merito alla formulazione (Sharma *et al.,* 2009).

Diversi formulati commerciali a base di microrganismi agenti di lotta biologica (BCA = **B**io**C**ontrol**A**gent) sono stati registrati e vengono effettivamente impiegati per il controllo di alterazioni fungine sia in campo che in post-raccolta. A questo riguardo sono da ricordare prodotti come Aspire® e Yield plus®, polveri bagnabili rispettivamente a base dei lieviti *Candida oleophila* I-182 e *Cryptococcus albidus*, che hanno come bersagli i patogeni *Botrytis* spp. e *Penicillium* spp. su agrumi, pomacee e drupacee (Droby *et al*., 1998; Paulitz e Bélanger, 2001); oppure Bio-Save 100® e Bio-Save 110® a base di *Pseudomonas syringae* ESC-10 il primo e *Pseudomonas syringae* ESC-11 il secondo, attivi entrambi nei confronti di *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp., *Mucor piriformis*, *Geotrichum candidum* su pomacee (Janisiewicz, 1988; Janisiewicz e Marchi, 1992). Inoltre, oggi sono disponibili diversi prodotti a base di *B. Subtilis,* dei quali Rhio-plus® ha come bersaglio

patogeni tipicamente terricoli come *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Sclerotinia* spp., *Verticillium* spp. e *Streptomyces scabies*, mentre Serenade® ha come bersaglio alcune fitopatie che colpiscono l'apparato aereo quali cercospora della barbabietola, moniliosi, oidio, peronospore e colpo di fuoco batterico (Roberti e Selmi, 1999). Alcuni funghi iperparassiti sono ampiamente utilizzati per la lotta biologica: AQ 10® (*Ampelomyces quisqualis*) è un biofungicida che, impiegato in opportune strategie di difesa, consente buoni livelli di contenimento degli oidi di molte colture agrarie (Benuzzi e Baldoni, 2000). Bioformulati a base dell'ormai noto *Trichoderma harzianum* (Tricodex®) e di *Coniothyrium minitans* (Koni®) sono impiegati con successo nei diversi disciplinari di agricoltura ecocompatibile. Più recentemente, per il contenimento di infezioni che si instaurano in campo e si manifestano nella successiva fase di stoccaggio (infezioni latenti), sono stati sviluppati altri prodotti, quali Biocure e Biocoat, entrambi a base del BCA *Candida saitoana* in combinazione, rispettivamente, con derivati del chitosano (El Ghaout *et al.,* 2000) e lisozima. Allo stesso scopo, è stato recentemente sviluppato un prodotto (Shermer®) a base del BCA *Metschnikowia fructicola;* l'applicazione di questo biofungicida durante la fase di crescita della pianta ha permesso di contenere efficacemente in post-raccolta i marciumi causati da *Botrytis*, *Penicillium, Rhizopus* e *Aspergillus* (Kurtzman e Droby, 2001; Karabulut *et al.,* 2003, 2004). Numerosi altri progetti su scala mondiale puntano ad ulteriori sviluppi nella lotta biologica alle malattie post-raccolta (Sharma *et al.,* 2009).

2.1 – Meccanismi coinvolti nelle interazioni tra Patogeno e Antagonista

Le interazioni tra microrganismi antagonisti (batteri, lieviti, funghi lievitiformi e funghi filamentosi) e patogeni sono stati studiati e descritti da diversi Autori (Backer, 1987; Droby *et al.,* 1989; Wisniewski *et al.,* 1991; Di Pietro *et al.,* 1993; Lorito *et al*., 1994; Arras, 1996; Arras e Arru, 1997; Arras *et al*., 1998; Jijali *et al.,* 1998; Castoria *et al.,* 1997, 2001, 2003; Yehuda *et al.,* 2003; Bar-Shimon *et al.,* 2004; Friel *et al.,* 2007). Ciononostante, la comprensione dei meccanismi mediante i quali i BCA esplicano la loro azione antagonistica contro i patogeni fungini non è stata ancora completamente compresa (Sharma *et al.,* 2009). Soffermando l'attenzione sul settore del post-raccolta, diversi meccanismi di azione sono stati proposti per spiegare l'attività di biocontrollo esplicata dai BCA. La competizione per lo spazio e i nutrienti tra il patogeno e l'antagonista è considerato il principale meccanismo di azione mediante il quale gli agenti bi biocontrollo sopprimono o mitigano l'attività dei patogeni sui frutti conservati (Droby *et al.,* 1992;

Wilson *et al.,* 1993; Filonow, 1998; Ippolito *et al.,* 2000; Jijakli *et al.,* 2001; Castoria *et al.,* 2008). Anche altri meccanismi come l'antibiosi, il parassitismo (o iperparassitismo), la produzione di enzimi litici e l'induzione di resistenza nell'ospite sembrano svolgere un ruolo nel controllo biologico in post-raccolta (Janisiewicz *et al.,* 2000; Barkai-Golan, 2001; El-Ghaouth *et al.,* 2004; Sharma *et al.,* 2009).

Competizione per lo spazio e i nutrienti – fenomeno generale che si crea tra diverse popolazioni di individui che convivono nella stessa nicchia ecologica, che hanno le stesse esigenze fisiologiche e dispongono di limitate risorse trofiche. Consiste in una concorrenza vera e propria nell'utilizzazione delle sostanze nutritive essenziali quali carboidrati, aminoacidi, ossigeno, ecc., presenti sulla superficie degli ospiti e disciolte o sospese nel velo di acqua libera presente sulla carposfera. La riduzione quali-quantitativa del substrato nutritivo, diminuisce le possibilità di successo dell'infezione da parte del patogeno; per questo è molto importante, da parte dell'antagonista, la precoce colonizzazione delle ferite, principale via d'accesso per la penetrazione dei patogeni nel tessuto vegetale. A tal proposito è stato dimostrato che la precoce colonizzazione delle ferite (i.e. *wound competence*) è favorita dalla capacità del BCA di resistere allo stress ossidativo che si verifica in seguito al ferimento del tessuto della pianta (Castoria *et al.,* 2003). Molti studi riguardanti le interazioni tra microrganismi hanno dimostrato che i lieviti sono capaci di assumere i nutrienti in soluzione più rapidamente e in maggiore quantità rispetto ai conidi in germinazione dei funghi patogeni (Droby e Chalutz, 1994); ne segue il dominio di un gruppo microbico e la scomparsa, tuttavia quasi sempre temporanea, dell'altro. Diversi lieviti sembrano agire attraverso il meccanismo della competizione per lo spazio e i nutrienti contro i funghi patogeni del post-raccolta; tra questi vi sono: *P. gulliermondii* (Droby *et al.,* 1989; Arras *et al.,* 1998), *C. laurentii* e *R. glutinis* (Chand-Goyal e Spotts, 1996; Castoria *et al.,* 1997; Filonow, 1998; Lima *et al.,* 1998), *C. oleophila* e *A. pullulans* (Lima *et al.,* 1997a; 1997b; Castoria *et al.,* 2001).

Antibiosi – l'antagonismo risulta dalla produzione, da parte dell'antagonista, di uno o più metaboliti secondari tossici per un altro microrganismo. L'antibiosi è il più comune fenomeno responsabile dell'attività antagonistica di molti agenti di biocontrollo (BCAs) come in molti Pseudomonadi fluorescenti, in *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. e *Trichoderma* spp.

La quasi totalità dei lieviti BCA sottoposti a screening non mostra tale capacità (Wisniewski e Wilson, 1992). Tuttavia, per un ceppo di *A. pullulans* (ceppo R106) utilizzato nell'industria farmaceutica è stata rilevata la produzione di sostanze antifungine

dette Aureobasidine, attive contro *Candida* spp e *Cryptococcus* spp (Ikai *et al.,* 1991; Yoshikawa *et al.,* 1993). Pur mostrando un'elevata attività antagonistica, i microrganismi produttori di antibiotici e/o metabolici fungitossici non sono particolarmente adatti alla lotta biologica in post-raccolta. Infatti l'eventuale persistenza delle sostanze da essi prodotte nelle derrate agroalimentari può portare, oltre che implicazioni di ordine igienico-sanitario, conseguenze non prevedibili per i consumatori e l'ambiente. Inoltre, analogamente a quanto avviene per i fungicidi, la produzione di antibiotici da parte degli antagonisti potrebbe portare all'insorgenza di ceppi resistenti di organismi fitopatogeni.

Iperparassitismo – si verifica quando l'antagonista parassita il patogeno. Si instaura una specifica interazione, durante la quale l'intima associazione permette all'organismo antagonista di prelevare parte o tutti i nutrienti dal patogeno. Il fenomeno si esplica attraverso una prima fase di riconoscimento dell'ospite a distanza, seguita da una crescita chemiotattica verso lo stesso e si conclude con un'interazione fisica che porta alla formazione di strutture specializzate che consentono la penetrazione dell'ospite (Chet *et al.*, 1987). È già stato mostrato che alla base del fenomeno c'è lo sviluppo del patogeno, poiché questo rappresenta il substrato nutrizionale per l'antagonista; da ciò appare anche evidente la necessaria e costante presenza di un certo livello di attacco dell'agente infettivo. Questo tipo di antagonismo, che causa la morte dell'organismo *target*, comporta una riduzione della densità d'inoculo. Il meccanismo d'azione è regolato dalla costante secrezione, da parte dell'antagonista, di enzimi litici, quali proteasi, chitinasi e glucanasi, che degradano la parete cellulare del patogeno. Molto studiata è l'azione svolta da alcuni agenti di biocontrollo quali *Trichoderma harzianum* (Lorito *et al.*, 1993, 1998) efficace soprattutto nei confronti di *Rhizoctonia solani*, *Sporidesmium sclerotivorum* (Adam e Fravel., 1993) e *Coniothyrium minitans* (Jones *et al*., 2004) che sono efficaci nel controllo di malattie causate da *Sclerotinia* spp. tanto da comportare lo sviluppo su alcuni mercati Europei di due ceppi di *C. minitans* come biofungicidi commerciali.

Produzione di enzimi litici – β-glucanasi e chitinasi extracellulari sono enzimi litici che attaccano i polimeri della parete cellulare fungina. Studi a livello molecolare e biochimico suggeriscono un potenziale ruolo di questi enzimi litici nell'attività antagonistica dei lieviti BCA nel settore del post-raccolta (Janisiewicz e Korsten, 2002).
L'attività ß-1,3-glucanasica è stata correlata all'attività antagonistica del ceppo K di *P. Anomala* (Jijakli e Lepoivre, 1998; Friel *et al.* 2007) e di un isolato di *P. guillermondii* contro *B. cinerea*; questo ceppo ha mostrato in coltura, la capacità di aderire alle ife del patogeno, suggerendo una relazione tra la produzione di glucanasi e un micoparassitismo

diretto (Wisniewski *et al.,* 1991). La produzione di glucanasi, quindi, può anche intensificare la capacità di un lievito di aderire alle ife fungine, come avviene in *Candida albicans* (Notario, 1982). Ciò, tuttavia, non costituisce una regola, in quanto studiando i meccanismi d'azione di altri due isolati di lieviti antagonisti (*R. glutinis* LS11 e di *C. laurentii* LS28), si è osservato che l'interazione diretta delle cellule di lievito con le ife del patogeno non è associata ad una più elevata attività glucanasica e antagonistica (Castoria *et al.,* 1997).

Induzione di resistenza nell'ospite – alcuni microrganismi antagonisti possono indurre risposte di resistenza nei tessuti dell'ospite oppure sono in grado di attivare meccanismi di cicatrizzazione delle ferite. Su frutti in post-raccolta, infatti, è stato osservato che in seguito ad applicazioni su ferite di sospensioni cellulari di microrganismi antagonisti, si verifica una più rapida cicatrizzazione delle ferite stesse (Goidànich *et al*., 1990; Manners, 1993; Matta *et al*., 1996). Ad esempio, il lievito *Candida famata* riduce il marciume verde sulle arance (agente eziologico *Penicillium digitatum*) e induce la sintesi di fitoalessine, come scoparone e scopoletina, quando inoculato nelle ferite del frutto (Arras, 1996). Il Ceppo LS30 di *A. pullulans,* efficace antagonista di diversi patogeni su diversi frutti, inoculato in ferita di mela ha fatto registrare una maggior attività ß-1,3-glucanasica e chitinasica probabilmente imputabili al tessuto vegetale (Ippolito e Nigro, 2000; Castoria *et al.,* 2001)

3 – Micotossine

A livello mondiale milioni di persone si ammalano e muoiono per patologie derivate dal consumo di alimenti contaminati. I rischi per la salute pubblica sono dovuti a rischi di tipo microbiologico, come l'infezione di microrganismi patogeni (ad esempio *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, ecc.) e a rischi di tipo chimico, come la contaminazione da micotossine, da metalli pesanti, da residui di antiparassitari, ecc.. Dai risultati del *Rapid alert system*, che ha indagato sulla distribuzione percentuale dei contaminanti nelle derrate alimentari, è emerso che ben il 44% di questi è rappresentato dalle micotossine (Pasini, 2006).

Le micotossine sono metaboliti secondari che possono essere accumulati in concentrazioni tali da indurre intossicazioni, note come micotossicosi, quando gli alimenti e i mangimi derivati dai prodotti contaminati sono ingeriti dall'uomo e dagli animali. Alcune specie fungine sono in grado di produrre una o più micotossine e la loro produzione è influenzata da fattori endogeni come il diverso potenziale tossigeno dei funghi, e da fattori esogeni, come temperatura, umidità, l'acqua libera (aw), il pH e la natura del substrato (Dragoni *et al*., 2000; Naceur Haouet e Altissimi, 2003). Il ruolo che molte micotossine svolgono nella vita dei funghi produttori non è stato ancora ben definito. Secondo alcune ipotesi le micotossine potrebbero prendere parte attiva nei processi di competizione microbica, visto il loro potenziale antibiotico contro microrganismi competitori, e/o agire direttamente sull'ospite come fitotossine nell'attacco ai tessuti vegetali (Manners, 1993; Matta *et al*., 1996, Castoria *et al.*, 2008).

Attualmente sono note più di 300 micotossine, ma le più importanti dal punto di vista tossicologico sono le aflatossine, i tricoteceni, lo zearalenone, le fumonisine, le ocratossine e la patulina. Le micotossine sono sintetizzate da numerosi funghi ma i generi che per la tossicità delle micotossine prodotte e per la loro maggiore diffusione rivestono una considerevole importanza micotossicologica sono *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria* (Tab. 1). Tra questi parassiti fungini l'attività tossigena dei generi *Fusarium* e *Alternaria* è più temuta in pre-raccolta, mentre i generi *Aspergillus* e *Penicillium* sollevano preoccupazioni di natura micotossicologica principalmente, ma non esclusivamente, per i prodotti in post-raccolta e per le diverse fasi delle preparazioni alimentari (Matta *et al.,* 1996; Dragoni *et al.,* 2000; Bottalico, 2002).

Tabella 1. Principali funghi responsabili della produzione di micotossine negli alimenti (da Visconti e Logrieco, 2002)

FUNGHI	MICOTOSSINE PRODOTTE
Aspergillus	
A. flavus	Aflatossine B_1, B_2
A. parasiticus	Aflatossine B_1, B_2, G_1, G_2
A. ochraceus	Ocratossina A, Acido penicillico
A. carbonarius	Ocratossine
A. fumigatus	Verruculogeno
A. versicolor	Sterigmatocistina
A. clavatus	Patulina, altre neurotossine
Penicillium	
P. verrucosum	Ocratossine, Citrinina
P. expansum	Patulina, Acido penicillico
P. aurantiogriseum	Acido penicillio, Penitreme, Viomelleina
P. citreonigrum	Citroeviridina
P. citrinum	Citrinina
P. griseofulvum	Acido ciclopiazonico, Patulina, Roquefortina
P. islandicum	Ciclocorotina, Luteoschirina
P. ochrosalomoneum	Citreoviridina
P. viridicatum	Acido penicillio, Viomelleina, Xanthomegnina
Fusarium	
F. graminearum	DON, Nivalenolo, Diacetossiscirpenolo, Tossina T-2, Zearalenone, Fusarine
F. verticillioides	Fumonisine, Fusarine
F. culmorum	DON, Zearalenone, Fusarine
F. poae	Tossina T-2, Diacetossiscirpenolo, Fusarine
F. sporotrichioides	Tossina T-2, Diacetossiscirpenolo
F. proliferatum	Fumonisine, Moniliformina, Beauvericina, Fusaproliferina
F. verticillioides	Fumonisine, Fusarine
F. avenaceum	Moniliformina, Fusarine
F. equiseti	Zearalenone
F. subglutinans	Moniliformina, Beauvericina, Fusaproliferina
Claviceps	
C. purpurea	Alcaloidi (Ergotammine, Clavine)
Alternaria	
A. alternata	Acido Tenuazonico, Alternarioli, Altertossine

3.1 – Micotossicosi

Gli effetti tossici osservati consentono di classificare le patologie in micotossicosi acute dovute all'assunzione in brevi periodi di quantità elevate di tossine, e micotossicosi croniche dovute ad assunzioni di dosi molto piccole in un arco di tempo prolungato. Le micotossine mostrano una notevole gamma di effetti biologici dovuti alla loro capacità di interagire con DNA, RNA, proteine, cofattori enzimatici, costituenti di membrana di diversi organi e/o sistemi bersaglio (Hussein e Brasel, 2001; Naceur Haouet e Altissimi, 2003). Quindi, possono essere classificate in immunotossine, dermatossine, epatossine, nefrotossine e neurotossine, oppure sulla base del loro effetto cronico in mutagene, cancerogene, teratogene (Tab. 2) (WHO, 2002).

Il rischio maggiore connesso all'ingestione delle micotossine consiste nel loro accumulo che origina sintomatologie di tipo cronico (Smith *et al.,* 1994; Miraglia e Brera, 2000; Bottalico, 2002). Infatti, per la conoscenze acquisite in materia, è raro trovare derrate altamente contaminate in grado di causare micotossicosi mortali; tuttavia, non è da escludere la possibilità di rinvenire in alcuni alimenti concentrazioni tanto elevate da indurre micotossicosi acute (IARC, 1993).

Tabella 2: Micotossine nelle derrate ed effetti tossici

MICOTOSSINA	EFFETTO	PRINCIPALI PRODOTTI CONTAMINATI
Aflatossina B_1, B_2, G_1, G_2	Genotossico, cancerogeno, epatotossico, immunosoppressore	Arachidi e altri legumi Mais, altri cereali e derivati (mangimi) Noci e mandorle diverse Semi oleosi Frutta secca
M_1, M_2		Latte e derivati
Ocratossina A, B	Nefrotossico, epatotossico teratogeno, immunosoppressore, cancerogeno	Orzo, mais, altri cereali e derivati (mangimi) Pane, paste e altri prodotti da forno Cacao, caffè, carni suine ed avicole, vino, birra
Fumonisina B_1	Neurotossico, cancerogeno, citotossico	Mais, altri cereali e derivati (mangimi)
Tricoteceni	Immunosoppressore, dermatotossico, emorragico	Mais, frumento, altri cereali e derivati (mangimi)
Zearalenone	Estrogenosimile	Mais, altri cereali e derivati (mangimi)
Patulina	Citotossico, embriotossico, teratogeno, mutageno, immunosoppressore	Frutta e derivati Mangimi
Ergoline	Neurotossico (ergotismo)	Cereali
Sterigmatocistina	Cancerogeno, Epatotossico	Cereali, Caffè crudo
Acido ciclopiazonico	Neurotossico	Arachidi, Cereali, Formaggi

3.2 - Interventi contro le micotossine

Attualmente, la crescente attenzione alla qualità igienico-sanitaria delle derrate alimentari e le più avanzate tecniche di produzione e stoccaggio degli alimenti, fanno si che le contaminazioni da micotossine siano generalmente abbastanza contenute. Ciò nonostante, l'impatto economico delle micotossine è assai rilevante, sia in termini di perdite dirette, intese come produzioni non idonee al commercio in quanto eccedenti i limiti di legge relativi ai contenuti massimi, sia in termini di perdite indirette, ovvero costi sostenuti per ridurre la contaminazione o la *mitigation costs* (Battilani, 2005). A questi costi vanno aggiunti quelli relativi alla perdita di efficienza produttiva e all'aumento della morbilità nel caso di alimenti destinati all'alimentazione animale e i costi sanitari e sociali a carico delle popolazioni esposte alla utilizzazione di alimenti con maggiore o minore presenza di queste tossine (Battilani, 2005).

Al fine di limitare i danni causati dalle contaminazioni da micotossine delle derrate possono essere messe in atto diverse strategie di prevenzione e contenimento.

Prevenzione: Una delle prime misure di prevenzione è quella di astenersi dall'utilizzare derrate agrarie e alimenti in generale visibilmente ammuffiti e di impiegarli con le opportune cautele solo dopo averne determinato il grado di tossicità.

Prevenire la formazione di micotossine nei prodotti alimentari significa innanzitutto prevenire in essi l'accrescimento dei funghi, creando quindi condizioni non idonee allo sviluppo della flora fungina. Per un adeguato approccio preventivo bisogna, quindi, focalizzare l'attenzione sia sulle colture in campo, sia sui prodotti in post-raccolta e sia sugli alimenti nel corso delle tecnologie di preparazione e di trasformazione mediante l'applicazione dei principi generali del *Good Agricultural Practise* (GAP) e del *Good Manufacturing Practise* (GMP) e lo sviluppo di un sistema integrato del tipo HACCP (Bottalico, 2002; Avantaggiato *et al.,* 2002).

Decontaminazione e/o detossificazione: Nonostante gli interventi più efficaci contro la formazione e diffusione delle micotossine sono essenzialmente basati sulla prevenzione, la natura imprevedibile ed ineluttabile della contaminazione fungina, per alcuni prodotti alimentari possono risultare più vantaggiosi gli interventi di decontaminazione e/o detossificazione i quali hanno come obiettivo l'allontanamento delle parti contaminate (decontaminazione) e la distruzione o inattivazione *in situ* delle micotossine (detossificazione) (Smith *et al*., 1994; Bottalico, 2000, 2002; Avantaggiato *et al*., 2002).

Un cenno particolare merita la detossificazione biologica, cioè la degradazione enzimatica o trasformazione di micotossine ad opera di BCA (Castoria et al., 2005; De Felice *et al*,. 2008) o microrganismi di varia natura (Karlovsky, 1999; Varga *et al.*, 2005; Moake *et al.*, 2005).

Molti lieviti e batteri utilizzati, tra cui anche agenti di lotta biologica, presentano la capacità di degradare le micotossine prodotte dai funghi patogeni. Diversi organismi, enzimi e geni capaci di detossificazione sono stati scoperti e studiati (Karlovsky, 1999; Castoria *et al.,* 2005; Ricelli *et al.,* 2007; De Felice *et al*,. 2008;). Tra le reali applicazioni vi è la degradazione della patulina ad opera di lieviti coinvolti nei processi fermentativi per la produzione di birra, vino e sidro (Bottalico, 2000; Moss e Long, 2002) e l'impiego, tuttora in fase di sperimentazione, di microrganismi, tra cui un ceppo di *Flavobacterium*, per la detossificazione di prodotti contaminati con aflatossine (Bottalico, 2000).

Nel laboratorio di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi del Molise sono stati identificati agenti di lotta biologica che oltre ad avere attività di controllo di patogeni micotossigeni in campo ed in post-raccolta, sono anche in grado di degradare, *in vitro*, le micotossine prodotte. I BCA di maggiore interesse si sono rivelati *R. kratochvilovae* (ceppo LS11), *C. laurentii* (ceppo LS28) e *A. pullulans* (ceppo LS30) in quanto sono in grado di controllare lo sviluppo di *B. cinerea* e *P. expansum,* principali responsabili delle perdite su frutta in post-raccolta (Lima *et al*., 1997a, 1997b, 1998, 2003; Castoria *et al.*, 1997, 2001, 2003). In particolare, alcuni ceppi di *A. pullulans* sono in grado di controllare lo sviluppo del fungo *A. carbonarius* su uva e sono in grado anche di degradare l'ocratossina A ad ocratossina α, composto molto meno tossico (De Felice *et al*., 2008). Interessante, molti lieviti rosa appartenenti al sub-phylum dei Puccinomycotina mostrano la capacità di degradare la micotossina patulina (dati non pubblicati); a tal proposito, i dati emersi dalle ultime ricerche verranno discussi nel paragrafo 4.3.

4 – Patulina

In questa tesi la micotossina di interesse è la patulina. La patulina (Fig. 1) è un metabolita secondario prodotto principalmente da funghi anamorfi appartenenti ai generi *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*; tra questi *Penicillium expansum* è il microrganismo più importante sia in termini di diffusione che in termini di quantità di micotossina prodotta (Moake *et al.,* 2005). In uno screening effettuato su 850 ceppi di funghi, 58 sono risultati produttori di patulina. Si tratta di funghi appartenenti all'ordine dei *Mucorales* (sottodivisione *zygomycotina*) e ai funghi imperfetti (sottodivisione *deuteromycotina*) (McKinley e Carlton, 1991). Tra questi ultimi, i funghi appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium* sono considerati i principali produttori. In particolare *A. clavatus* è responsabile della produzione di patulina in prodotti destinati all'alimentazione animale, mentre *P. expansum* è il più pericoloso contaminante di derrate usate per l'alimentazione umana (Moake *et al*, 2005).

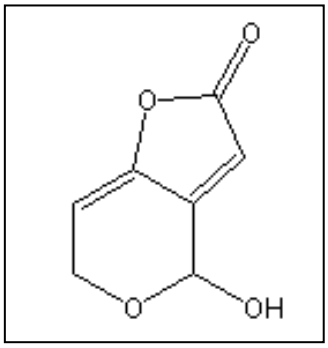


Figura 1. Struttura chimica della Patulina.

La patulina (4-idrossi-4H-furo[3,2c]piran-2(6H)-one) è un lattone insaturo (tetrachetide) solubile in acqua isolato per la prima volta come antibiotico nel 1943 da *P. patulum*. Alcuni studi effettuati sulla patulina (Medical Research Council, 1944), per i quali solo in seguito fu dimostrato che non erano sostenuti da dati clinici, suggerirono l'applicazione della patulina in medicina nel trattamento delle congestioni nasali e delle sindromi da raffreddamento. Non molto tempo dopo fu dimostrato che la patulina non era soltanto tossica per funghi e batteri, ma anche per gli animali e le piante superiori. La patulina è un composto incolore e cristallino non volatile, con un punto di fusione di circa 110°C ed un peso molecolare di 154 dalton. Essa sublima sotto vuoto spinto a circa 70-100°C, è una sostanza neutra ed è solubile in acqua, alcoli, acetone, acetato di etile e cloroformio, è invece meno solubile in eteri e benzene, ed è insolubile in etere di petrolio. La patulina è instabile e si degrada velocemente in ambiente basico mentre tollera piuttosto bene l'acidità: le sue proprietà antibiotiche e tossiche non sono alterate da pH molto acidi, fino a valori prossimi a 2 unità di pH.

,I più importanti fattori che incidono sulla produzione di patulina sono temperatura e contenuto di acqua libera (McKinley e Carlton, 1991; Naceur Haouet e Altissimi, 2003; Moake *et al.,* 2005). Anche se la sua formazione è legata alla crescita del fungo, le temperature ottimali per la sintesi, se confrontate con quelle della crescita, risultano

leggermente più basse. In particolare, è stato osservato che *P. expansum* produce patulina a tutte le temperature che permettono la crescita del fungo (da 0°C a 30°C), ma in corrispondenza della temperatura massima si ha una minor produzione di micotossina (McKinley e Carlton, 1991; Paster *et al*., 1995). I valori di contenuto di acqua libera ottimali, invece, sono più elevati rispetto a quelli che permettono la crescita e raggiungono valori compresi tra 0,90 e 0,99 (McKinley e Carlton, 1991).

Data la vasta gamma di funghi produttori, la contaminazione con patulina può interessare prodotti di varia natura: carne, formaggio, uova (Lieu e Bullerman, 1977; Paterson e Kozakiewic, 1997), orzo, frumento (Lopez-Diaz e Flannigan, 1997), ma soprattutto frutti (Mortimer *et al*., 1985; Larsen *et al*., 1998; Beretta *et al*., 2000). Infatti è stata riscontrata in uva (Altmayer *et al*., 1982), ciliegie, pesche, prugne, albicocche, nettarine, cachi, banane, fragole, meloni, ribes, gelsi, mirtilli, lamponi, pomodori, mandorle, noci, nocciole, in marmellata di fragola, ribes e mirtillo, ma principalmente in mele, pere e nei loro succhi non fermentati (Prieta *et al* 1994; Larsen *et al*. 1998; Beretta *et al*., 2000; Moss e Long, 2002; Moake *et al.,* 2005). La maggior contaminazione di pomacee e prodotti derivati si spiega col fatto che il 66% dei funghi trovati su di essi, costituiti essenzialmente da isolati di *P. expansum*, è in grado di produrre patulina (Harwing *et al*., 1973), capacità posseduta solo da una bassa percentuale dei funghi isolati dagli altri alimenti contaminati (McKinley e Carlton, 1991).

4.1 – Tossicità della patulina

La patulina è un potente antibiotico ad ampio spettro d'azione; molti batteri patogeni per l'uomo e funghi fitopatogeni come *Pythium* spp, *Claviceps purpurea*, *Alternaria solani*, sono inibiti a dosi molto basse; al di sopra di 50 µg/ml rallenta la crescita di *Saccharomyces cerevisiae* anche se viene degradata dallo stesso nei processi fermentativi (Harwing *et al.,* 1973; Moss e Long, 2002; Logrieco *et al*., 2002, Iwahashi *et al*., 2006). Come per le altre micotossine, i disturbi legati alla ingestione di patulina dipendono dalle dosi ingerite e dal tempo di esposizione (Logrieco *et al.,* 2002). Oggi è riconosciuta come una tra le più importanti micotossine a causa della sua tossicità (IARC, 1986).

Negli ultimi 50 anni sono stati effettuati numerosi studi riguardanti la tossicità della patulina. In animali da laboratorio, i sintomi osservabili in seguito ad intossicazione acuta sono agitazione, convulsioni, dispnea, congestioni polmonari, edema, ulcerazioni, iperemia, emorragie intestinali, degenerazione delle cellule epiteliali, infiammazioni dell'intestino,

vomito, danni al tratto gastrointestinale e ai reni (McKinley e Carlton, 1991; Moake *et al.,* 2005; Puel *et al.,* 2010).

Per quanto concerne gli effetti cronici, invece, la patulina ha proprietà neurotossiche, immunotossiche e immunosoppressive, genotossiche, embriotossiche e teratogeniche (Ciegler *et al.,* 1976; Bourdiol e Escoula, 1990; Pfeiffer *et al.,* 1998; Liu *et al.,* 2003; Keblis *et al.,* 2004; Moake *et al.,* 2005; Puel *et al.,* 2010). Anche se ci sono evidenze bibliografiche che riportano le possibili proprietà carcinogene della micotossina (Dickens e Jones, 1961; Osswald *et al.,* 1978; Becci *et al.,* 1981), l'IARC (1986) ha giudicato questi dati insufficienti per poterle attribuire attività cancerogena per l'uomo e pertanto è stata classificata (IARC, 1993) nel gruppo 3, comprendente appunto sostanze non classificabili per la cancerogenicità per l'uomo (Tab. 3).

Tabella 3. Classificazione di alcune micotossine in base al rischio di cancerogenicità per l'uomo (IARC, 1993)

(da Visconti A., 1997)

Denominazione del gruppo		**Micotossine**
Gruppo 1	Accertati cancerogeni per l'uomo	Aflatossine B1, B2, G1, G2; (normalmente presenti in natura)
Gruppo 2*	Gruppo 2A: accertati cancerogeni per gli animali	Aflatossina M_1; Ocratossina A, Sterigmatocistina
	Gruppo 2B: possibili cancerogeni per l'uomo	Fumonisine B_1 e B_2, Fusarina C, Zearalenone.
Gruppo 3**	Non classificabili per la cancerogenicità per l'uomo	**Patulina**, Nivalenolo, Deossinivalenolo, Fusarenone X, Tossina T2 .

* al Gruppo 2 appartengono anche altre micotossine meno comuni quali la griseofulvina e la sterigmatocistina.

** le micotossine che appartengono al Gruppo 3 sono qui collocate soprattutto per la scarsità dei dati di natura epidemiologica a disposizione, piuttosto che per la documentata assenza di un loro effetto.

Diversi studi sono stati mirati a determinare i danni che la patulina causa a livello cellulare e molecolare; in particolare, provoca l'inibizione della sintesi proteica,

l'interruzione della trascrizione e della traduzione e l'inibizione della sintesi del DNA (Moake *et al.,* 2005); inoltre, altera la struttura e funzionalità delle proteine della membrana plasmatica (Horváth *et al.,* 2010) i cui lipidi vanno incontro a fenomeni di perossidazione come conseguenza della capacità della patulina di generare ROS (Ferrer *et al.,* 2009).
Gli effetti citotossici della patulina sono dovuti principalmente alla formazione di complessi covalenti con i tioli cellulari essenziali, compreso il glutatione (GSH), antiossidante molto importante nel neutralizzare i radicali liberi (Fliege e Metzler, 2000). É riportato che la formazione di questo legame covalente con il GSH provoca i danni ossidativi causati dalla patulina a carico del DNA, osservati sia su cellule HEK (*Human embryonic kidney*) che HepG2 (*human hepatoma G2*) (Liu *et al.,* 2003; Zhou *et al.,* 2009).
É stato osservato, inoltre, che la patulina ha effetti mutageni (Umeda *et al.,* 1977; Schumacher *et al.,* 2005a, 2005b); l'induzione di micronuclei in linfociti umani e in cellule V79 HepG2 ne suggeriscono potenziali proprietà clastogeniche (Pfeiffer *et al.,* 1998; Alves *et al.,* 2000; Liu *et al.,* 2003; Zhou *et al.,* 2009). Induce *cross links* sia di DNA che di proteine compromettendone la struttura e la funzionalità (Fliege e Metzler, 1999; Schumacker *et al.,* 2006). A causa della forte affinità della patulina con i gruppi sulfidrilici, l'attività di molti enzimi, tra cui l'ATPasi, l'RNA polimerasi e l'aminoacil-T-RNA sintetasi, è fortemente inibita (Moake *et al.,* 2005; Puel *et al.,* 2010).

Inoltre, la patulina può avere effetti sulla tiroide e sui testicoli di ratti in accrescimento; in particolare, Selmanoglu e Kockaya, (2004) riportano che la patulina determina un aumento del testosterone e del livello di LH e provoca cambiamenti istopatologici come edema e fibrosi nei tessuti interstiziali, disorganizzazione dei tubuli seminiferi dell'epitelio e dei testicoli; in lavori successivi, Selmanoglu (2006) ipotizza un possibile effetto negativo della patulina sulla fertilità maschile, avendo osservato che la somministrazione di patulina in ratti in accrescimento influenza la morfologia, la motilità e il numero degli spermatozoi.

Sono pochi i dati riguardanti gli effetti sull'uomo; secondo le conoscenze attuali, la tossicosi acuta provoca vomito, nausea e disturbi gastrointestinali (Betina, 1984; McKinley e Carlton, 1991; Bottalico, 2002; Logrieco *et al*., 2002) ed esposizioni prolungate anche mal di testa, stanchezza e perdita dei sensi. Inoltre si possono rilevare eritemi di varia entità ed edema cutaneo (Material Safety Data Sheet, 2004).

E' comprensibile quindi, la preoccupazione che suscita la contaminazione da patulina dei prodotti alimentari in genere e in particolare dei succhi e dei prodotti a base di mela, destinati prevalentemente all'alimentazione per l'infanzia. E' questa una categoria

altamente a rischio: per una data concentrazione di micotossina nell'alimento, i bambini sono sottoposti ad una esposizione maggiore in termini di mg/Kg di peso corporeo rispetto agli adulti che ne assumono la stessa quantità (Beretta *et al*., 2000). Altrettanto comprensibile è l'interesse crescente che viene posto alla prevenzione e al contenimento della contaminazione da patulina delle derrate alimentari.

4.2 - Limiti di tolleranza della patulina

La fissazione di limiti massimi ammissibili di micotossine rappresenta uno strumento per la gestione del rischio e per salvaguardare la salute dell'uomo e degli animali.

Dal 1997 il limite massimo ammissibile della patulina negli alimenti stabilito dalla FAO (1997) è pari a 50 µg/Kg. Da allora l'UE e molti governi nazionali hanno emanato proprie direttive per adeguarsi. In Italia, il Ministero della Salute, contestualmente al Regolamento della Commissione Europea riguardante alcune micotossine (1998), ha posto il livello massimo ammissibile di Patulina nei succhi di frutta a 50 ppb (Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 135, 11 giugno 1999).

L'aumentato consumo di frutta e derivati soprattutto da parte della fascia giovanile della popolazione impone una revisione di questi limiti. Un recente rapporto dello USDA (*United States Department of Agriculture*) riporta un altissimo consumo di mele e derivati nel primo anno di vita (6,4 g/Kg di peso corporeo per giorno contro un valore di 0,4 g/Kg per giorno di un adulto). La situazione è probabilmente molto simile a quella italiana. Ciò significa che, con la normativa vigente, un bambino è più esposto di un adulto ai rischi legati all'eccessiva ingestione di patulina. Perciò l'UE ne ha stabilito i livelli massimi tollerabili in alimenti per l'infanzia e succhi (Regolamento (CE) No 1425/2003 riconfermato dal Regolamento 455/2004) (Tab. 4).

Tabella 4. Allegato I del Regolamento (CE) n. 1425/2003, riconfermato dal regolamento 455/2004, che stabilisce i livelli massimi di Patulina.

Prodotti	Patulina: tenori massimi (µg/kg o ppb)	Metodo di prelievo dei campioni	Metodo d'analisi di riferimento
2.3.1. — Succhi di frutta, in particolare succo di mela, e ingredienti di succo di frutta presenti in altre bevande, compreso il nettare di frutta. — Succo di frutta concentrato dopo ricostituzione secondo le istruzioni del produttore.	50,0	Direttiva 2003/78/CE	Direttiva 2003/78/CE
2.3.2. Bevande spiritose, sidro e altre bevande fermentate derivate dalle mele o contenenti succo di mela.	50,0	Direttiva 2003/78/CE	Direttiva 2003/78/CE
2.3.3. Prodotti contenenti mele allo stato solido, compresi la composta di mele e il passato di mele destinati al consumo diretto.	25,0	Direttiva 2003/78/CE	Direttiva 2003/78/CE
2.3.4. — Succo di mela pronto per essere bevuto e prodotti contenenti mele allo stato solido, compresi la composta e il passato di mele per lattanti e bambini nella prima infanzia etichettati e venduti come tali. — Alimenti per la prima infanzia diversi dai preparati a base di cereali.	10,0	Direttiva 2003/78/CE	Direttiva 2003/78/CE

4.3 – Prevenzione e contenimento pre/post-raccolta

Come per le altre micotossine, anche per la patulina gli interventi per mitigare le contaminazioni consistono essenzialmente nella prevenzione e nel contenimento. Studi epidemiologici recenti documentano gli elevati livelli di patulina rilevati su pomacee conservate e prodotti da esse derivati negli Stati Uniti ed Europa, compresi l'Italia, la Spagna e il Portogallo (Martins *et al.,* 2002; Andersen *et al.,* 2004; Amiri and Bompeix 2005; Piemontese *et al.,* 2005; Murillo-Arbizu *et al.,* 2009; Barreira *et al.,* 2009).

Al fine di prevenire le infezioni da *P. expansum* la FAO (2002) ha raccomandato di attenersi alle regole della Corretta Pratica Agricola (*Good Agricoltural Practice* – GAP) e della Corretta Pratica di Trasformazione (*Good Manufacturing Practice* – GMP); le prime riguardano la coltivazione, la raccolta, il trasporto, la conservazione per il mercato dei frutti freschi e per i frutti soggetti a trasformazione mentre le seconde riguardano la corretta

gestione del trasporto, della selezione e della lavorazione della frutta destinata alla produzioni di succhi, concentrati, puree o semilavorati.

Le principali misure adottate nella pratica per estendere la *shelf life* dei prodotti al fine preservare le loro caratteristiche organolettiche, l'aspetto e lo stato sanitario sono sostanzialmente basate sul contenimento delle infezioni causate da *P. expansum* abbinando la frigoconservazione e/o l'utilizzo di atmosfera controllata all'utilizzo di fungicidi autorizzati in post-raccolta e al mantenimento dei locali di stoccaggio e trasformazione in buone condizioni igienico-sanitarie (Morales *et al.,* 2010).

Questi sistemi, seppur indiretti, allo stato attuale sono i metodi più efficaci per cercare di ridurre la presenza di patulina nei prodotti alimentari a base di pomacee in quanto per questa micotossina, a differenza di altre, non esiste ancora un valido metodo di detossificazione (Avvantaggiato *et al.,* 2002). Di conseguenza è indispensabile lo studio di nuove strategie in grado di eliminare o quanto meno di ridurre i quantitativi di patulina negli alimenti. Negli ultimi anni è emerso che la detossificazione biologica mediante l'impiego di microrganismi potrebbe rappresentare una valida strategia per ridurre i livelli di patulina al di sotto dei limiti ammessi dalla legislazione vigente. È noto da tempo che la patulina viene degradata dai lieviti durante i processi fermentativi (Harwing *et al.,* 1973).

Moss e Long (2002) riportano che i metaboliti che si formano in seguito a degradazione fermentativa sono E-Ascladiolo, immediato precursore della biosintesi della patulina (Moake *et al.,* 2005), e il suo isomero, Z-Ascladiolo (Fig. 2). Nel 2007, Ricelli *et al.* hanno riscontrato che gli stessi metaboliti, E-Ascladiolo e Z-Ascladiolo, vengono prodotti in seguito alla degradazione aerobica della patulina ad opera del batterio *Gluconobacter oxydans*. Dati bibliografici riportano che l'E-Ascladiolo anche è una micotossina (Suzuki *et al.,* 1971), sebbene con una tossicità quattro volte inferiore a quella della patulina.

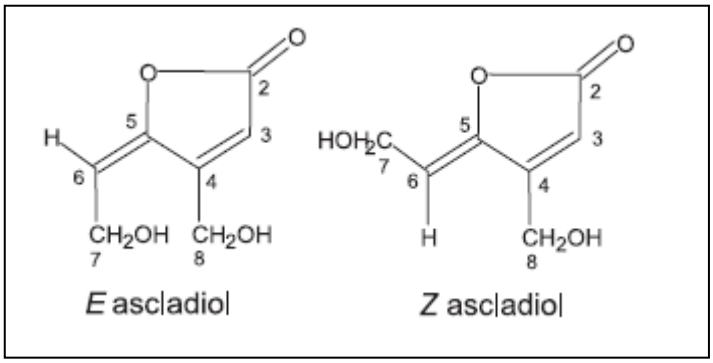


Figura 2: Struttura dei metaboliti prodotti dalla degradazione della patulina da parte di *S. cerevisae* e *G. oxidans*

Infine, un approccio innovativo nella detossificazione della patulina durante crescita aerobica è fornito dall'impiego di lieviti BCA. Dagli studi condotti finora (*review* di Morales *et al.,* 2010) è emerso che alcuni BCA in grado di ostacolare le infezioni di *P. expansum,* come *Pichia ohmeri* (Coelho *et al.,* 2007), *Candida sake, Pantoea agglomerans*

(Morales *et al.,* 2008a) e alcuni ceppi batterici (Florianowicz, 2001), sono in grado di ridurre i livelli di patulina apparentemente interferendo con il metabolismo primario e/o secondario del fungo e non per una diretta degradazione della micotossina come inizialmente ipotizzato.

L'unico caso di degradazione attiva della patulina da parte di BCA è quello riportato da Castoria *et al.* (2005). In particolare, il BCA *R. kratochvilovae* LS11, oltre a prevenire i marciumi da *P. expansum* su mele conservate, è in grado di crescere in presenza di alte concentrazioni di patulina e di metabolizzarla, sia *in vitro* che in un sistema modello che simula il marciume del tessuto di mela, in due composti differenti, il più stabile dei quali corrisponde all'acido desossipatulinico (DPA) (Fig. 3). Il DPA, sulla base delle informazioni disponibili, non è tossico per una serie di microrganismi verso i quali è invece tossica, nelle stesse condizioni di saggio, la patulina, e molto meno tossico della micotossina nei confronti di cellule umane in coltura (Scott *et al.,* 1972; Wright *et al.,* 2008; Castoria *et al.,* in preparazione).

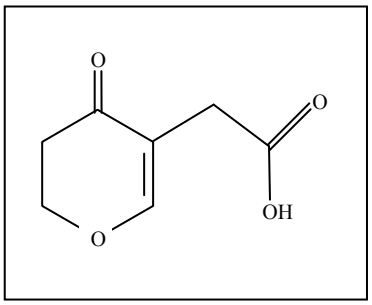


Figura 3: struttura del DPA

Il gruppo della prof.ssa Rosa Duran Patron dell'Università di Cadice (Spagna), in collaborazione col nostro gruppo, ha caratterizzato il *pathway* degradativo (Fig 38) della patulina ipotizzato in precedenza dalla Dott.ssa Rebecca Goss dell'Università di East Anglia (UK) (dati non pubblicati). La comprensione dei vari *step* degradativi è essenziale per lo studio a genetico-molecolare e biochimico mirante all'identificazione dei geni e delle proteine enzimatiche nella metabolizzazione della micotossina da parte di LS11

Per quanto riguarda la degradazione *in vivo*, l'osservazione al S.E.M. di mele trattate con LS11 e infettate da *P. expansum* mostra che le cellule del lievito sopravvivono nel tessuto marcescente ma non seguono le ife fungine nella loro penetrazione profonda nel tessuto del frutto. L'assenza di penetrazione del lievito all'interno della mela marcescente, dove presumibilmente avviene la maggior sintesi di patulina, suggerisce che LS11 non metabolizzi, in queste condizioni, la micotossina; tuttavia questo meccanismo non può ancora essere escluso, poiché è noto che la patulina diffonde dal tessuto di mela infettato nel tessuto sano (Beretta *et al.,* 2000) e quindi, almeno parte di essa, potrebbe giungere a contatto con il BCA localizzato sulla superficie del tessuto infettato dal fungo (Castoria *et al.,* 2007).

Sorprendentemente, recenti ricerche condotte dal nostro gruppo di ricerca hanno mostrato che la capacità di degradare la patulina è una caratteristica abbastanza diffusa tra i

lieviti rosa appartenenti ai generi *Rhodosporidium* e *Sporobolomyces*. Questa capacità, inoltre, non sembra essere legata all'aerea di origine dei microrganismi ma bensì alla pianta ospite dalla quale sono stati isolati, in quanto solo i ceppi isolati da alberi di melo, fico e pesco presentano questa caratteristica. Indagini preliminari mostrano che anche per questi nuovi isolati il prodotto finale della degradazione è, come per LS11, il DPA (dati non pubblicati).

Tra i ceppi in grado di degradare la patulina c'è anche il ceppo rappresentativo del genere *Sporobolomyces*, l'isolato IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. (precedentemente classificato come *Sporobolomyces roseus*). Questo ceppo è stato utilizzato in questa tesi per lo studio dei meccanismi molecolari che si trovano alla base della degradazione della patulina da parte dei lieviti rosa appartenenti al sub-phylum dei Puccinomycotina.

5 – Tecniche molecolari per lo studio della funzione genica nei funghi

Nel corso degli ultimi decenni sono stati messi a punto diversi metodi di trasformazione e selezione per lo studio della funzione genica nei più svariati organismi. Soffermando l'attenzione sul regno dei funghi, il sequenziamento dell'intero genoma di specie rappresentative dei diversi generi, come ad esempio *Saccharomyces cerevisiae* (SGD, http://www.yeastgenome.org/) e *Candida albicans* (CGD, http://www.candidagenome.org/) per gli ascomiceti e *Cryptococcus neoformans* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.html) e *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (http://genome.jgi-psf.org/Sporo1/Sporo1.home.html) per i basidiomiceti, in combinazione con le applicazioni di genetica inversa e/o diretta (*forward* e *reverse genetics*), ha creato essenziali presupposti per lo studio e la comprensione della funzione genica in questi gruppi (Idnurm e Williamson, 2010).

5.1 – Reverse genetics

La genetica inversa (*reverse genetics*) è un approccio che permette di assegnare la funzione ad un determinato gene mediante l'analisi fenotipica del mutante delezionale (Δ) generato per quello stesso gene; ciò richiede però, che un omologo del gene di interesse sia stato precedentemente identificato e caratterizzato. Con la disponibilità della sequenza dell'intero genoma, è relativamente facile trovare omologhi attraverso approcci bioinformatici e di conseguenza generare costrutti per la loro mutagenesi mirata mediante *gene replacement* (oppure *gene disruption*) per la generazione del mutante delezionale.

Alla base della mutagenesi mirata ci sono gli eventi di ricombinazione omologa (HR = *homologous recombination*) che si hanno quando un tratto di DNA esogeno può ricombinarsi precisamente con una sequenza complementare presente sul DNA genomico. Il *gene replacement* (oppure *gene disruption*) è condotto trasformando con diverse tecniche (par. 5.2.1) i microrganismi oggetto di studio utilizzando un costrutto contenente le sequenze fiancheggianti del gene *target* e un gene *marker* per la selezione dei trasformanti/mutanti. I trasformanti ottenuti conterranno DNA esogeno integrato mediante HR e/o DNA esogeno inserito in posizioni *random* come conseguenza di fenomeni di integrazione non omologa (come avviene nella mutagenesi inserzionale discussa più avanti).

Il successo del *gene replacement* nei funghi dipende da diversi fattori, come la posizione del gene *target* nel genoma, il metodo di trasformazione utilizzato e la lunghezza delle regioni fiancheggianti il gene *target* alla base degli eventi di HR. A tal proposito è riportato che, mentre per *S. cerevisiae* sequenze fiancheggianti di circa 100 bp assicurano un'alta percentuale di eventi di HR, negli altri funghi le sequenze fiancheggianti devono essere di almeno 1 kb, ed è essenziale, inoltre, che il loro livello di omologia con le sequenze del gene *target* sia prossimo al 100% (Weld *et al.,* 2006; Meyer, 2008). Oltre a questi due fattori, spesso l'efficienza di HR può essere fortemente influenzata anche da altri fattori come per esempio i *pathway* dominanti attivi nell'organismo ospite per riparare la rottura della doppia elica del DNA (Michielse *et al.,* 2005; Weld *et al.,* 2006).

Per aumentare il successo degli esperimenti di *gene replacement*, negli ultimi anni sono stati sviluppati dei metodi innovativi per generare costrutti per la mutagenesi mirata; i più utilizzati per i lieviti basidiomiceti sono l'*overlap* PCR o (*fusion* PCR), la *Double Joint PCR with split marker* e la ricombinazione *in vivo* in *S. cerevisiae*. Per applicazioni pratiche sui lieviti basidiomiceti, essenzialmente *C. neoformans* e *Sporobolomyces* sp. IAM 13481, si rimanda ai paragrafi 7.6 e 8.5 di questa tesi e a pubblicazioni scientifiche sull'argomento (Davidson *et al.,* 2002; Kim *et al.,* 2009; Ianiri *et al.,* inviato per la pubblicazione).

I metodi descritti in seguito riguardano le diverse tecniche impiegate per la generazione dei costrutti da utilizzare per la mutagenesi mirata. Questi possono poi essere introdotti nella cellule ospite con diverse tecniche di trasformazione (par. 5.2.1).

5.1.1 – Tecniche molecolari per la generazione dei costrutti da utilizzare per la mutagenesi mirata

Overlap PCR – Questa tecnica è stata applicata per la prima volta nel lievito basidiomicete *C. neoformans* da Davidson *et al.* (2002); è stata messa a punto come rapida alternativa all'utilizzo di tecniche di mutagenesi mirata *time consuming* basate sull'utilizzo di plasmidi ricombinanti.

La procedura consiste nel generare, attraverso due differenti cicli di PCR, costrutti per la mutagenesi mirata aventi dimensione fino a 5 Kb. Come mostrato dalla figura 4 A, durante il primo ciclo PCR vengono generati frammenti di dimensioni comprese tra 1.0 a 1.5 kb corrispondenti alle regioni 5' (primer 1 e 2) e 3' (primer 3 e 4) del gene da disattivare (*YFG1* in figura 4) e al gene *marker* (primer 5 e 6) scelto per la selezione dei trasformanti. I primer hanno una lunghezza di circa 20 bp, ad eccezione dei primer 2 e 3, di circa 40 bp,

che presentano sia regioni per l'amplificazione dei frammenti 5' e 3' del gene *target* , che regioni chimeriche, solitamente di 18 bp, corrispondenti a regioni del gene *marker* e complementari ai primer 5 e 6, rispettivamente.

I tre prodotti derivati dal primo ciclo PCR, vengono miscelati in proporzioni equimolari e amplificati utilizzando i primer 1 e 4 (Fig. 4 B).

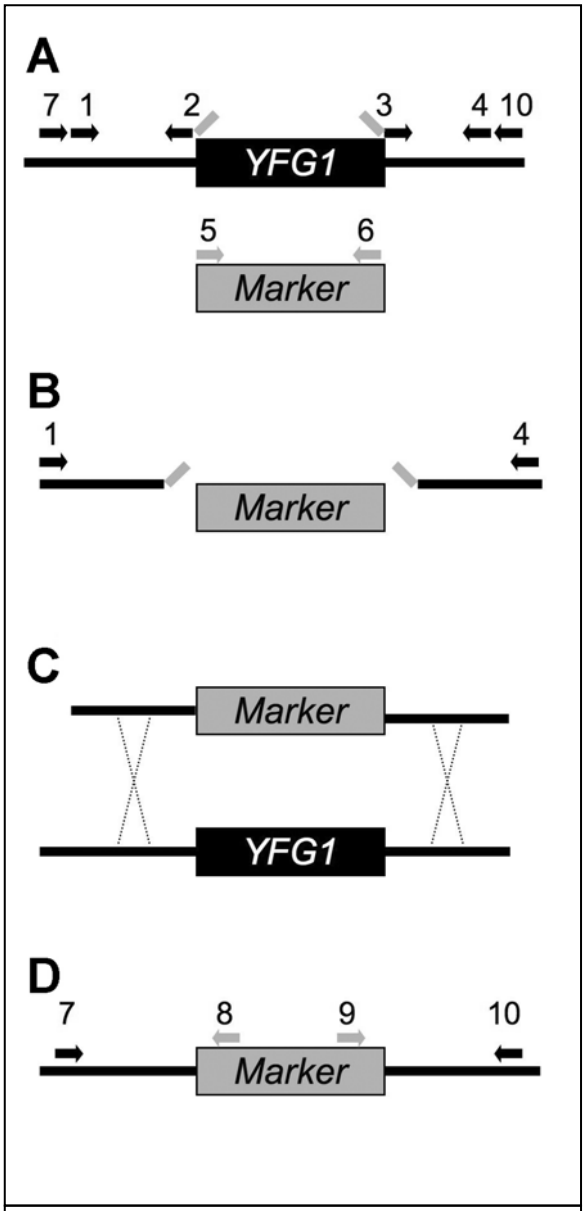


Figura 4: Schema dell'*overlap* PCR per la generazione di costrutti per la mutagenesi mirata. Da Idnurm e Williamson (2011).

Il costrutto generato, è introdotto nelle cellule mediante trasformazione (par. 5.2.1); l'omologia tra le sequenze 5' e 3' del costrutto e le sequenze del gene *target YFG1* permette un doppio evento di HR con conseguente integrazione del costrutto nel locus *YFG1* (Fig. 4 C). Il successo del *gene replacement* può essere confermato utilizzando le combinazioni di primer 7 - 8 e 9 - 10 che daranno un prodotto di amplificazione solo quando il *marker* si è inserito nel locus *target;* infatti i primer 7 e 10 sono disegnati fuori dalle sequenze 5' e 3' del costrutto generato per la mutagenesi mirata (Fig. 4 A e D). La presenza di una sola copia di costrutto integrato nel locus *target* dovrà essere accertata mediante analisi *Southern blot*. Questa tecnica è stata applicata con successo in *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 per la delezione del gene *LEU1* che codifica per l'enzima *α-isopropylmalate* sintasi coinvolto nel primo step del *pathway* biosintetico della leucina (Ianiri *et al.,* inviato per la pubblicazione). Al contrario, negli esperimenti di mutagenesi mirata a carico del gene *VPS8* riportati in questa tesi, utilizzando l'overlap PCR non è stato possibile generare il costrutto atteso *vps8::URA5* (par. 7.6.1 e 8.5.1) e di conseguenza sono stati impiegati gli altri due metodi descritti nei paragrafi successivi.

Double Joint PCR – Questa tecnica, indicata anche come *Double Joint PCR with split marker*, rappresenta sostanzialmente una variante della precedente ed è stata messa a punto come alternativa alla *overlap* PCR; inizialmente descritta per *A. nidulans, A. fumigatus e F. graminearum* (Yu *et al.,* 2004), è stata applicata per il *gene replacement* di diversi geni nel patogeno umano *C. neoformans* utilizzando come *marker* sia il gene *URA5* (Fu *et al.,* 2006) che il gene *NAT* (Kim *et al.,* 2009).

Per illustrare questa tecnica è stata presa in considerazione la *double-joint PCR with NAT-split marker* riportata da Kim *et al.* (2009). Come mostrato in figura 5, nel primo *round* PCR, le porzioni 5' e 3' del gene da disattivare vengono amplificate rispettivamente con i primer 1-2 e 7-8, mentre le regioni 5' e 3' del *NAT-split marker* sono amplificate utilizzando i primer 3-4 e 5-6, rispettivamente. Come riportato per l'*overlap* PCR, i primer 2 e 7, di circa 40 bp, presentano sia regioni per l'amplificazione dei frammenti 5' e 3' del gene *target* che regioni chimeriche, solitamente di 18 bp, corrispondenti a regioni del gene *marker* e complementari ai primer 3 e 6, rispettivamente; c'è da notare inoltre, che i prodotti di amplificazione dei primer 3-4 e 5-6 comprendono una regione identica del gene *NAT* di circa 200 bp.

Nel secondo *round* PCR le regioni 5' del gene *target* e del *marker split-NAT* vengono combinate in proporzioni equimolari e amplificate utilizzando i primer 1-4; allo stesso modo, le regioni 3' del gene *target* e del marker *split-NAT* vengono combinate in proporzioni equimolari e amplificate utilizzando i primer 5-8 (Double Joint PCR). I due frammenti *double joint* sono quindi combinati e introdotti nelle cellule dove un evento di tripla ricombinazione omologa tra regioni 5‘ e 3‘ dei frammenti Double Joint con le regioni 5‘ e 3‘ del gene *target* e tra la regione omologa di circa 200 bp dei due frammenti *split-NAT* permette l'integrazione dei due frammenti *double joint* nel *locus target.*

Come descritto in questa tesi, questo metodo è stato testato anche nell'auxotrofo *ura5* AIS2 utilizzando come *marker* il gene *URA5* del ceppo WT *Sporobolomyces* sp. IAM 13481. Apparentemente però, nessuno dei trasformanti ottenuti presentava il gene *target* (*VPS8*) disattivato (par. 7.6.2; par. 8.5.2; Fig. 24 E-I, *lanes* 2-5).

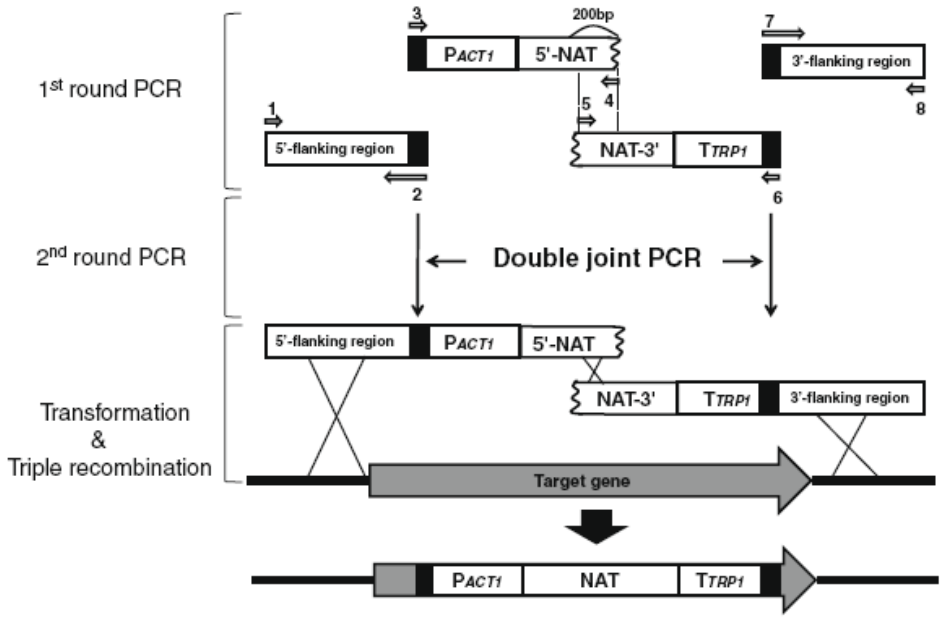


Figura 5: Procedura per la *Double Joint* PCR utilizzando il gene *marker NAT*. Le varie fasi sperimentali sono descritte dettagliatamente nel testo. *PACT1*: promotore *ACT1* del gene dell'actina; *TTRP1*: terminatore *TRP1* del gene del triptofano; *NAT*: gene *marker* che conferisce ai trasformanti la resistenza alla nurseotricina.

Ricombinazione in vivo in Saccharomyces cerevisiae – a differenza dei metodi precedenti basati essenzialmente sull'utilizzo della PCR, questo sistema sfrutta i meccanismi endogeni di ricombinazione omologa del lievito *S. cerevisiae.* I singoli componenti del costrutto finale vengono generati singolarmente e utilizzati per cotrasformare *S. cerevisiae* in cui avviene il loro assemblaggio.

La prima fase per la generazione dei tre frammenti corrispondenti alle porzioni 5' e 3' del gene *target* e al gene *marker* è sostanzialmente uguale a quella descritta in precedenza per l'*overlap* PCR; l'unica differenza riguarda la natura dei primer 1 e 4 i quali, in questo caso, presentano sia regioni per l'amplificazione dei frammenti 5' e 3' del gene *target* che regioni chimeriche (linee tratteggiate in figura 6) complementari a porzioni del plasmide generate mediante digestione con opportuni enzimi di restrizione e sulle quali avverrà la ricombinazione omologa.

I tre frammenti PCR ottenuti e il plasmide digerito, recante un *marker* selettivo per *S. cerevisiae* (*URA3* in figura 6), in presenza di DNA *carrier* vengono cotrasformati in *S. cerevisiae* dove, grazie alla presenza di regioni complementari, avvengono quattro fenomeni di ricombinazione omologa tra il gene *marker* e le regioni fiancheggianti 5' e 3' del gene *target*, e tra queste e il plasmide di *S. cerevisiae*. Si genera cosi un plasmide

ricombinante recante il costrutto da isolare per la successiva fase di trasformazione. A tal scopo, il DNA estratto dai trasformanti di *S. cerevisiae* è utilizzato come templato per una PCR condotta utilizzando i primer 1-4 e il prodotto di amplificazione ottenuto, corrispondente al costrutto da utilizzare per la mutagenesi mirata, è utilizzato come già descritto per l'*overlap* PCR (Fig. 4, C e D). In figura 6 è riportata una rappresentazione schematica delle varie fasi della ricombinazione *in vivo* in *S. cerevisiae*.

Lo svantaggio di questo metodo rispetto ai precedenti è che presenta dei costi più elevati e la procedura sperimentale è più laboriosa e *time-consuming*; di contro però, presenta un vasto campo di applicazione in quanto la cassetta per il *gene replacement*, una volta amplificata dal plasmide sul quale è avvenuta la ricombinazione omologa, può essere inserita con diversi sistemi di trasformazione (par. 5.3) in tutti gli organismi eucariotici potenzialmente trasformabili. Inoltre, a differenza degli altri metodi, lo stesso costrutto può essere amplificato mediante una normale PCR dal DNA genomico precedentemente estratto dai trasformanti di *S. cerevisiae* una volta ottenuti.

Le sue applicazioni pratiche riguardano soprattutto studi di mutagenesi mirata su larga scala, come quello riportato da Colot *et al.* (2006) per il fungo filamentoso *Neurospora crassa.* In questa tesi questa tecnica è stata applicata con successo per la generazione di costrutti per la mutagenesi mirata dei geni *VPS8*, *DLH* e *rDLH* di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (par. 7.6.3; par. 8.5; Fig. 35 C; Fig 39 A, B).

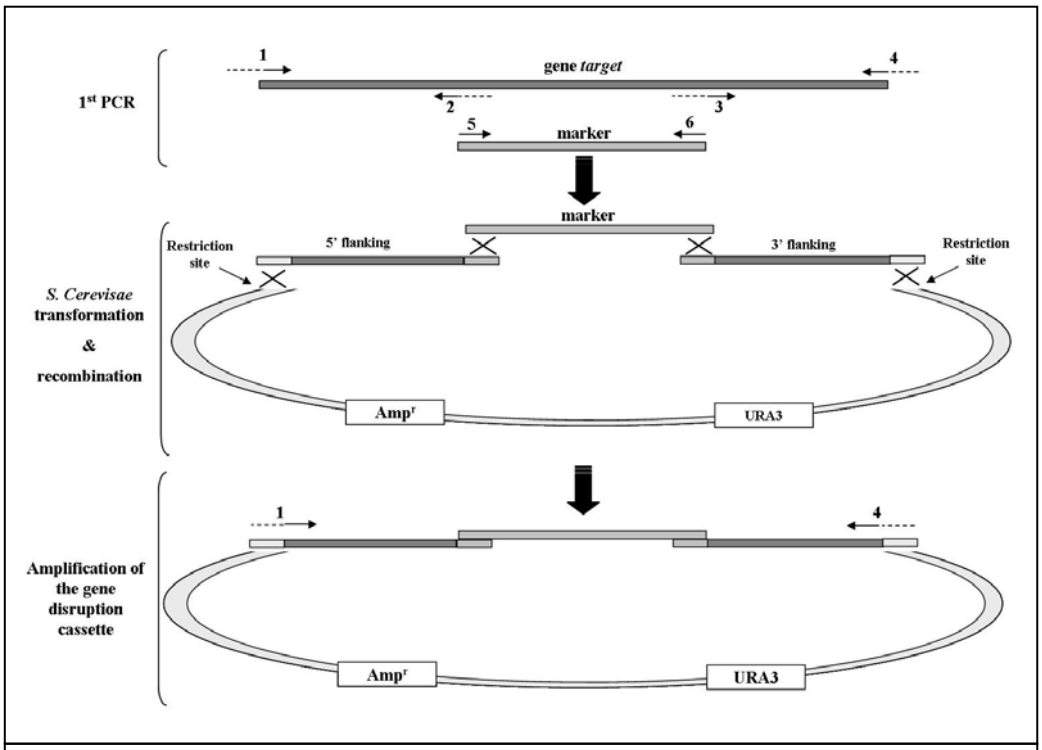


Figura 6: Schema della generazione di costrutti per la mutagenesi mirata mediante ricombinazione *in vivo* in *S. cerevisiae*. Modificato da Colot *et al.* (2006).

5.2 – Forward genetics

La genetica diretta (*forward genetics*) è un approccio mediante il quale, utilizzando diverse tecniche di trasformazione discusse in seguito (par. 5.3), vengono generate delle mutazioni inserzionali *random* nel genoma degli organismi da analizzare. I ceppi che presentano un fenotipo di interesse vengono isolati e la sequenza del gene responsabile del fenotipo mutante osservato è ottenuta con l'utilizzo di varie tecniche molecolari quali la *inverse* PCR e il *plasmid rescue* (par. 5.3.1; Fig. 8), le più utilizzate, o la TAIL (*thermal asymmetric interlaced*) PCR anch'essa utilizzata con successo (Michielse *et al.,* 2005).
Idealmente, un sistema di mutagenesi inserzionale dovrebbe presentare un'alta efficienza di trasformazione, singole inserzioni di DNA esogeno in posizioni *random* del genoma, in un singolo *locus* e senza riarrangiamenti o delezioni nè a carico del DNA trasferito nè a carico del DNA genomico; inoltre, per i mutanti di interesse, dovrebbe essere applicabile l'incrocio sessuale per correlare con certezza il fenotipo ottenuto con la presenza del DNA esogeno. In mancanza di un sistema di segregazione genetica, la succitata correlazione potrebbe essere verificata generando per il ceppo WT dei mutanti delezionali dello stesso gene recante l'inserzione di DNA; test di complementazione e test fenotipici confermeranno o meno il legame tra fenotipo e gene disattivato (Weld *et al.,* 2006).
Per uno *screening* su larga scala di mutanti inserzionali di lieviti basidiomiceti, oggetto di studio in questa tesi, utilizzando la formula di Clarke e Carbon (1976) è stato stimato che si ha il 95% di probabilità di "colpire" tutti i geni presenti nel genoma generando circa 30000 trasformanti (Idnurm e Williamson, 2010).

5.3 – Metodi di trasformazione genetica impiegati per i lieviti basidiomiceti

I più comuni metodi di trasformazione per i lieviti basidiomiceti sono la trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* (AMT), la trasformazione biolistica e l'elettroporazione. Nei paragrafi seguenti vengono discussi i principi generali di funzionamento e le loro applicazioni pratiche sia per studi di mutagenesi inserzionale che per studi di mutagenesi mirata.

5.3.1 – Trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens*

La trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* (AMT = *Agrobacterium-mediated transformation*) è basata sulla capacità di questo batterio fitopatogeno di trasformare geneticamente le piante dicotiledoni con un processo che rientra normalmente

nel processo patogenetico; tale trasformazione genetica porta alla formazione di un tumore al colletto che interferisce con la normale crescita della pianta infettata.

La formazione del tumore al colletto discende dal trasferimento, dall'integrazione e dall'espressione dei geni presenti in un particolare segmento del plasmide Ti (induttore di tumori), il T-DNA (DNA trasferito), all'interno del genoma della cellula vegetale. La regione del T-DNA è compresa tra il *left border* (bordo sinistro) e il *right border* (bordo destro) necessari per l'escissione del frammento di T-DNA e comprende, fra gli altri, i geni che codificano per ormoni vegetali che inducono la proliferazione cellulare (auxine e citochinine) tumorale e i geni per la sintesi di opine, composti utilizzati da *A. tumefaciens* come fonte di carbonio e azoto. Al di fuori della regione del T-DNA sono presenti i geni *vir*, fondamentali per il trasferimento del T-DNA, l'origine di replicazione *(ori)* che permette al plasmide di replicarsi stabilmente in *A. tumefaciens* e i geni per il catabolismo delle opine.

Il processo di infezione inizia con la colonizzazione del batterio di una ferita generatasi al colletto della pianta; il trasferimento genico è indotto dalla presenza di composti fenolici sintetizzati dalla pianta stessa (siringone e acetossisiringone) i quali attivano l'espressione dei geni *vir*. Ognuno di essi ha un ruolo importante nel processo di trasferimento del T-DNA nel genoma delle cellule vegetali. Il gene *virA* codifica per la proteina chinasi recettore dei composti fenolici sopra descritti; questa chinasi attiva il fattore di trascrizione codificato dal gene *virG,* il quale a sua volta attiva gli altri geni *vir*. I geni *virB1-B11* codificano per elementi strutturali di membrana che consentono il trasferimento del T-DNA. Il T-DNA è legato a proteine, con cui forma un complesso di trasferimento detto complesso T, che è composto dalle proteine sintetizzate dai geni *virD1*, *virD2, virD4,* e *virE1*. Il gene *virC1* codifica per la proteina che lega il complesso DNA/proteine, aumentando l'efficienza di trasferimento. Il gene *virJ* esprime la proteina responsabile dell'esportazione del complesso sopra descritto. Infine il complesso del T-DNA, una volta giunto nella cellula ospite, è protetto dall'attacco di nucleasi prodotte dalla cellula ospite dalla proteina codificata dal gene *virE2,* ed è indirizzato verso il complesso del poro nucleare (NPC). Il gene *virF* agisce da regolatore del ciclo cellulare della cellula ospite, mantenendola nella fase S (Gelvin, 2003).

Questa capacità di trasferire naturalmente il T-DNA in cellule eucariotiche, è stata sfruttata dai laboratori di biologia molecolare di tutto il mondo per trasferire porzioni di T-DNA modificate in diverse classi di organismi, compresi procarioti, alghe, lieviti, funghi e cellule di mammifero (Bundock *et al.,* 1995, 1996, 2002; Zupan *et al.,* 2000; Kunik *et al.,*

2001; Vijn e Govers, 2003; Idnurm *et al.,* 2004; review di Hooykaas *et al.,* 2005, di Michielse *et al.,* 2005). L'elenco delle specie trasformabili mediante l'utilizzo di *A. tumefaciens* è in continua fase di aggiornamento (Bett *et al.,* 2007; Abello *et al.,* 2008; Ji *et al.,* 2010; Ianiri *et al.,* inviato per la pubblicazione).

Teoricamente, la maniera più semplice per sfruttare tale capacità consisterebbe nell'inserire all'interno della regione del T-DNA la sequenza di DNA desiderata e servirsi poi del plasmide Ti e di *A. tumefaciens* per il trasferimento e l'integrazione nel DNA di una cellula ospite. Praticamente però, la situazione è più complessa e quindi per la trasformazione mediata da *A. tumefaciens* sono stati messi a punto due diversi metodi, uno detto sistema del vettore cointegrato e l'altro, invece, sistema del vettore binario.

Nella pratica il sistema più utilizzato è quello del vettore binario (Hooykaas *et al.,* 2005; Michielse *et al.,* 2005). Questo sistema prevede l'utilizzo di due plasmidi diversi; uno, detto vettore di clonazione binario, è quello comunemente manipolato dai ricercatori e include la regione del T-DNA modificata contenente il DNA di interesse e un gene *marker*, mentre l'altro è un plasmide Ti "disarmato" che contiene l'intera serie dei geni *vir* ma manca della regione del T-DNA. Una volta effettuate tutte le modificazioni desiderate sul vettore di clonazione binario, questo è inserito (solitamente mediante elettroporazione) in un ceppo di *A. tumefaciens* contenente il plasmide Ti difettivo; questo agisce da *helper* in quanto contiene e fa esprimere i geni *vir* necessari per la mobilizzazione del T-DNA e l'inserimento dal vettore di clonazione binario nel DNA cromosomiale dell'ospite.

In figura 7 si riporta uno schema generale del trasferimento del T-DNA a una cellula fungina con il sistema vettore binario.

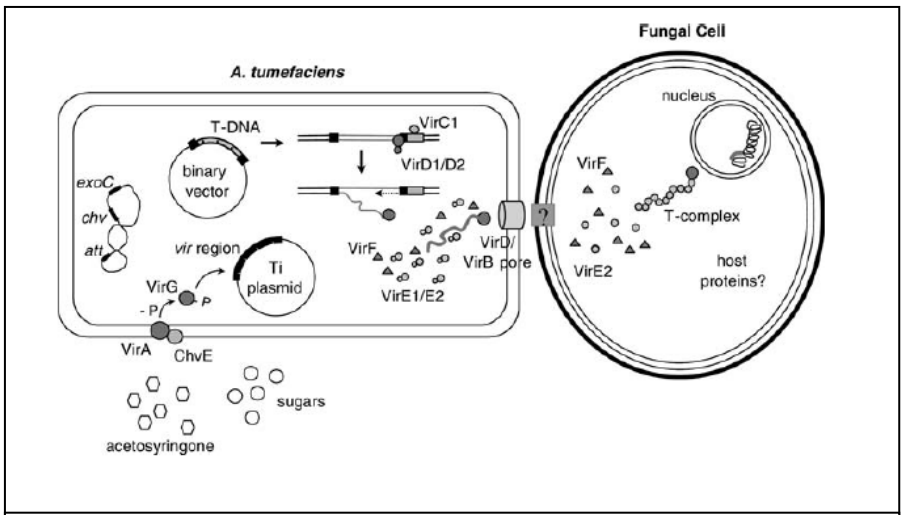


Figura 7: Schema generale del trasferimento del T-DNA con il sistema vettore binario in una cellula fungina (da Michielse *et al.,* 2005).

I vantaggi della AMT rispetto agli altri metodi convenzionali di trasformazione è quello di poter utilizzare come materiale di partenza conidi, spore o micelio senza il bisogno di generare protoplasti, come invece richiesto nell'elettroporazione e nella trasformazione mediata da *polyethylene glycol* (PEG) e acetato di litio. Mediante l'utilizzo del T-DNA di *A. tumefaciens* è possibile trasferire frammenti di relativamente grandi (fino a 150 kb) con efficienza di trasformazione molto più elevata rispetto ai metodi tradizionali (de Groot *et al.,* 1998; Bundock *et al.,* 1999; Amey *et al.,* 2002; Campoy *et al.,* 2003; Fitzgerald *et al.,* 2003; Meyer *et al.,* 2003; Idnurm *et al.,* 2004; Michielse *et al.,* 2004a; Rodriguez-Tovar *et al.,* 2005).

Inoltre, la capacità di *A. tumefaciens* nel generare trasformanti recanti principalmente singole inserzioni di T-DNA, è stata dimostrata non solo nelle piante ma anche in lieviti, funghi e cellule di mammifero (de Groot *et al.,* 1998; Bundock *et al.,* 1999; Kunik *et al.,* 2001; Bundock *et al.,* 2002). Queste caratteristiche fanno del T-DNA di *A. tumefaciens* uno dei più potenti strumenti di mutagenesi inserzionale disponibili allo stato attuale per lo studio della funzione genica in lieviti e funghi ascomiceti e basidiomiceti, come *S. cerevisiae* (Bundock *et al.,* 2002), il fungo simbionte *Hebeloma cylindrosporum* (Combier *et al.,* 2003), gli agenti di controllo biologico *Beauveria bassiana* (Leclerque *et al.,* 2004) e *Coniothyrium minitans* (Rogers *et al.,* 2004), i fitopatogeni *Ascochyta rabiei* (Mogensen *et al.,* 2006) e *Magnaprthe grisea* (Li *et al.,* 2003), i patogeni umani *A. fumigatus* (Sugui *et al.,* 2005) e *C. neoformans* (Idnurm *et al.,* 2004) e il potenziale detossificatore biologico di patulina *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (dati presentati in questo studio).

Prima di riportare in dettaglio un esempio pratico relativo all'applicazione di *A. tumefaciens,* meritano un cenno le principali tecniche molecolari più utilizzate per risalire alla natura dei geni recanti le inserzioni di T-DNA; queste sono, come già accennato, la *inverse* PCR e il *plasmid rescue* (Fig. 8).

Per la *inverse* PCR, il DNA genomico del mutante inserzionale di interesse è digerito con un endonucleasi che non presenta siti di restrizione all'interno del gene *marker* utilizzato per la trasformazione e, successivamente, i frammenti ottenuti vengono autoligati creando dei DNA circolari. Il DNA circolare può essere sia digerito con un enzima di restrizione che taglia al centro della sequenza nota (*marker*) dando origine ad un prodotto lineare che essere utilizzato come templato per una normale PCR (come rappresentato in figura 8), oppure il passaggio di digestione può essere omesso e il DNA circolare può essere utilizzato direttamente come templato per la PCR (metodica utilizzata in questa tesi). In entrambi i casi la PCR è condotta utilizzando dei primer disegnati in direzione opposta ai

bordi della sequenza del gene *marker*. L'eventuale prodotto di amplificazione ottenuto, corrispondente al gene disattivato dall'inserzione di T-DNA, è sequenziato e confrontato con le sequenze presenti in banca dati.

Il *plasmid rescue* rappresenta una variante dell'*inverse* PCR; consiste nell'utilizzo di un enzima di restrizione in grado di effettuare un taglio nel T-DNA e uno nella sequenza fiancheggiante l'inserto; tuttavia, come nella *inverse* PCR, può essere utilizzato anche un enzima che non presenta siti di riconoscimento nel gene *marker*. In entrambi i casi, il frammento generato è in grado di autoligarsi a basse concentrazioni di DNA; i DNA circolari ("plasmidi") generati vengono clonati in *E. coli* e i trasformanti generati sono selezionati su terreno selettivo contenenti antibiotici attivi su procarioti (i.e. kanamicina o ampicillina). Il gene recante l'inserzione di T-DNA è ottenuto mediante PCR utilizzando come templato i "plasmidi" estratti dai trasformanti di *E. coli*. Anche in questo caso l'eventuale prodotto di amplificazione ottenuto è sequenziato e successivamente confrontato con le sequenze presenti in banca dati.

Entrambe le tecniche sono state utilizzate in questa tesi, anche se il *plasmid rescue,* essendo caratterizzato da una procedura più laboriosa e costosa, è stato utilizzato solo in un caso seguendo una variante della metodica descritta (par. 7.5.6).

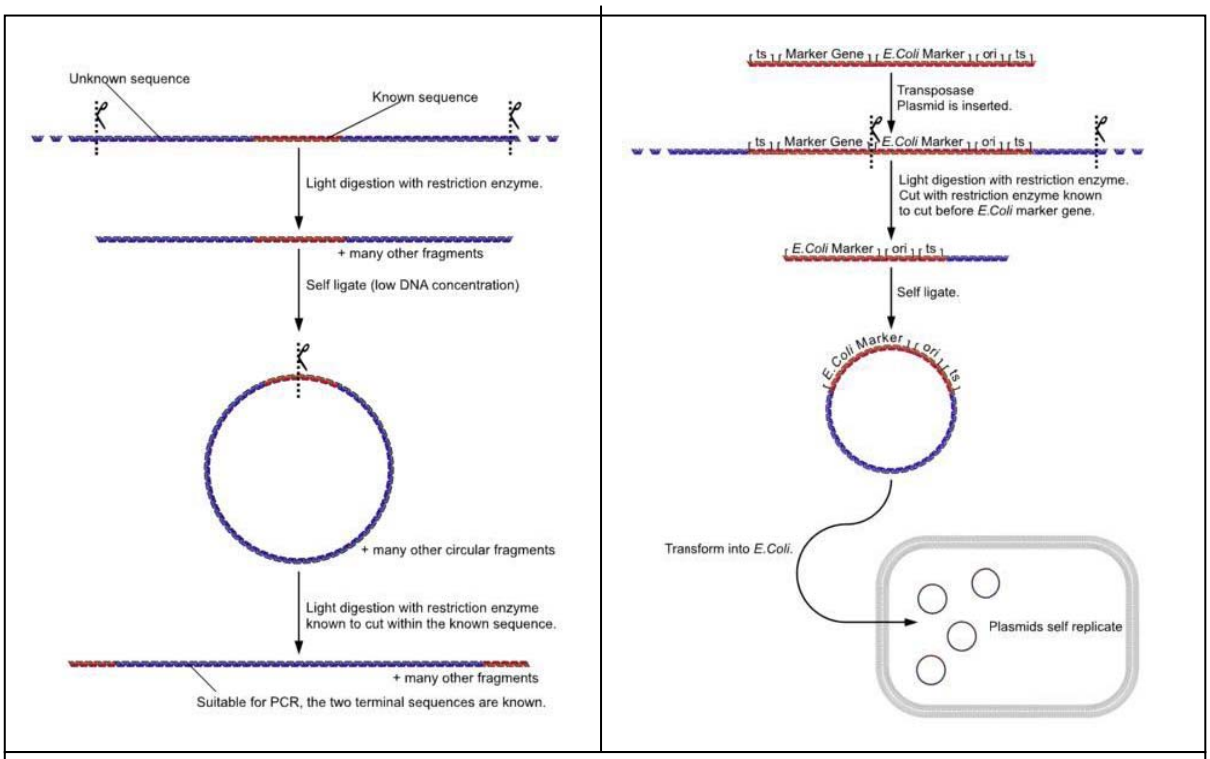


Figura 8: Rappresentazione schematica delle tecniche *inverse* PCR (a sinistra) e *plasmid rescue* (a destra) (www.wikipedia.org).

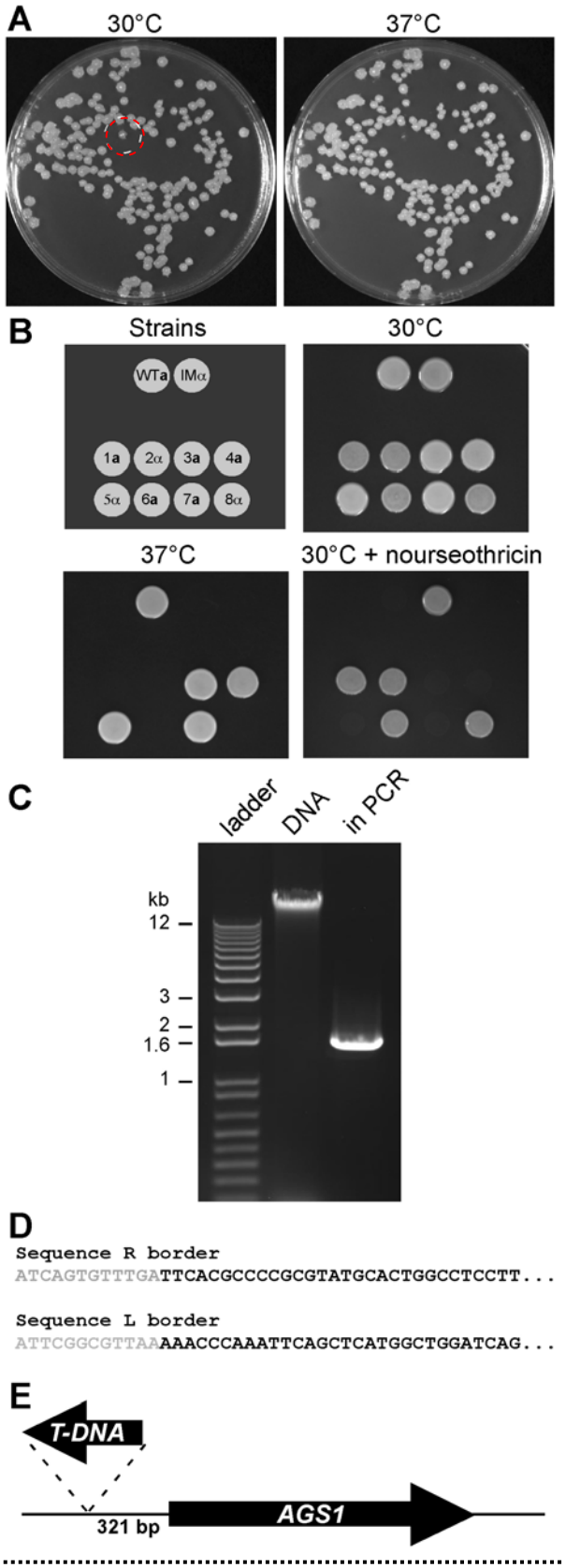


Figura 9: Esempio di genetica diretta (*forward genetics*) utilizzando il T-DNA di *A. tumefaciens*; sono riportate tutte le fasi per la caratterizzazione di un mutante inserzionale *temperature-sensitive;* i dettagli sono riportati nel testo. Da Idnurm e Williamson (2010).

Si riporta di seguito un esempio esplicativo delle varie fasi di mutagenesi inserzionale mediante l'utilizzo del T-DNA di *A. tumefaciens* per il patogeno umano *C. neoformans;* i dati sono stati utilizzati come esempio da Idnurm e Williamson (2010) per dimostrare le varie fasi che sono alla base della caratterizzazione genetica di un mutante *temperature-sensitive* generato mediante AMT (Fig. 9).

In A, trasformanti generati mediante AMT utilizzando un vettore binario recante come *marker* selettivo il gene che conferisce la resistenza alla nurseotricina, dopo la prima fase di selezione, sono stati trasferiti su YPD e incubati ON a 30° e 37°C; un ceppo (cerchiato) ha mostrato crescita differente nelle due condizioni

In B, questo mutante inserzionale (IMα) è stato incrociato con il ceppo WT di sesso opposto [*mating type* a (WTa)] e la progenie è stata isolata. Di otto ceppi selezionati dopo incrocio, i quattro che mostrano capacità di crescere a 30°C sono anche resistenti alla nurseotricina (compreso il mutante inserzionale IMα), mentre i quattro in grado di crescere a 37°C, WT compreso, mostrano sensibilità alla nurseotricina. Queste osservazioni mostrano chiaramente il legame tra il gene disattivato dall'inserzione di T-DNA e il fenotipo *temperature-sensitive.* Il *mating type* (a o α

vicino al numero della progenie) può essere utilizzato come un *marker* indipendente per dimostrare la ricombinazione genetica nella progenie ottenuta.
Successivamente, il DNA genomico del IMα è stato sottoposto a *inverse* PCR (C). Il sequenziamento del prodotto PCR mostra le giunzioni tra i bordi del T-DNA (in grigio) e il DNA genomico di *C. neoformans* (D). Il confronto della sequenza ottenuta con quelle presenti sui *database* rivela la natura del gene reso inattivo dall'inserzione di T-DNA. Nel caso riportato, l'inserzione del T-DNA si trova 321 bp prima del codone di inizio del gene *AGS1* (E), codificante per una α (1-3) glucan sintasi e già noto (Reese e Doering, 2003) per il suo ruolo per la crescita a 37°C (E).

Oltre che per la mutagenesi inserzionale, la AMT può essere utilizzata efficacemente anche per la mutagenesi mirata in diverse specie di funghi (Michielse *et al.,* 2005; Weld *et al.,* 2006). In questo caso, affinché avvenga HR è necessario che le sequenze di DNA omologhe a quelle del DNA *target* vengano inserite tra i *border* destro e sinistro del T-DNA insieme ad un gene *marker* per la selezione dei trasformanti-mutanti.

Un aspetto molto interessante è che la AMT favorisce la HR. Bundock *et al*. (1999) riportano che nel lievito *Kluyveromyces lactis*, la frequenza di *gene replacement* ottenuta in seguito ad AMT era 71 volte maggiore rispetto a quella ottenuta mediante elettroporazione. Mediante l'utilizzo della AMT è stato condotto con alta efficienza (dal 14 al 75%) il *gene replacement* di geni coinvolti in vari processi, quali la biosintesi della parete cellulare, la sintesi di melanina e la patogenicità in *Coccidioides posadasii, F. oxysporum, Glarea lozoyensis, Mycosphaerella graminicola, Trichoderma atroviride, Verticillium dahliae* e *V. fungicola* (review da Michielse *et al.,* 2005). L'alta efficienza di *gene replacement* osservata può essere dovuta al fatto che il T-DNA risulta un substrato ottimale per la HR (Bundock *et al.,* 1996; de Groot *et al.,* 1998) perchè trasferito sotto forma di singolo filamento lineare; inoltre le proteine di *A. tumefaciens* ad esso associate sembrano interagire specificamente con delle proteine associate ad DNA nella cellula ospite (Bako *et al.,* 2003).

Tuttavia, evidenze bibliografiche riportano che il *gene replacement* mediante AMT non è applicabile in studi di mutagenesi inserzionale *random* per tutte le specie fungine che sono trasformate con alta efficienza. Nel caso del patogeno umano *C. neoformans* infatti, come discusso in seguito, il metodo più utilizzato per il *gene replacement* è la trasformazione biolistica (Toffaletti *et al*., 1993; McClelland *et al.,* 2005).

Nonostante il vastissimo campo di applicazione della AMT, è stato riscontrato che per alcune specie fungine questa tecnica di trasformazione si è dimostrata di scarsa o nulla

efficacia, come nel caso di *Sclerotinia sclerotiorum* (Rolland *et al.,* 2003) e di *A. niger* (Michielse *et al.,* 2005). Difficoltà nell'applicazione della AMT, con prove evidenti dell'insuccesso della trasformazione, sono ampiamente riportate in questo lavoro di tesi (par.7.3, 8.1.3 e 8.4; Fig. 21-25 e 29 B, F) dove si è cercato di applicare la AMT per il lievito basidiomicete *R. kratochvilovae* LS11 al fine di identificare i geni coinvolti nel processo di degradazione della micotossina patulina.

5.3.2 – Trasformazione biolistica

La trasformazione biolistica è una tecnica che consente di inserire il DNA direttamente nel nucleo della cellula ospite. E' una tecnica diretta per la quale è necessaria una strumentazione molto costosa. Lo strumento utilizzato per la trasformazione è la *gene gun* che serve per inviare ad alta velocità nella cellula il DNA esogeno. La tecnica può essere impiegata per trasformare sia funghi lievitiformi (Toffaletti *et al*., 1993) sia funghi filamentosi (Hazell *et al*., 2000) e generalmente gli organismi non devono subire trattamenti prima della trasformazione. Inoltre, il materiale genetico da inserire nelle cellule non deve essere necessariamente veicolato da un vettore plasmidico; con questo metodo, infatti, è possibile inserire la sola cassetta di espressione, costituita dal gene di interesse da esprimere nell'ospite e dalle sequenze regolatrici (Alpeter *et al*., 2005). Per la trasformazione, il DNA viene fatto precipitare sulla superficie di microsfere di oro o tungsteno (*microcarrier*), quindi adagiato su un supporto inerte posizionato nel *macrocarrier.* Questo va posto alla base della camera della *gene gun* sotto il canale di accelerazione; la camera interna della *gene gun* è sottoposta a pressione negativa. In questa è aspirato un gas inerte, generalmente elio, il cui flusso "spara" ad alta velocità il *microcarrier* sulle cellule da trasformare .

Per la trasformazione dei funghi, le cellule devono essere molto concentrate, cioè essere in tarda fase esponenziale di crescita o nella precoce fase stazionaria. Le cellule sono disperse in un *medium* contenente uno stabilizzatore osmotico, solitamente il sorbitolo. A seconda del *marker* utilizzato, dopo la trasformazione vengono seguite procedure leggermente differenti; nel caso di *marker* codificanti per la resistenza ad antibiotici, dopo la trasformazione le cellule trasformate sono lasciate per 4-6 ore su substrato non selettivo e successivamente trasferite su substrato selettivo contenete l'antibiotico appropriato per la selezione dei trasformanti (Idnurm *et al*, 2004). Nel caso di *marker* codificanti per geni coinvolti in *pathway* metabolici, quali per esempio i geni *URA3* e *URA5* (Ianiri *et al.*, inviato per la pubblicazione), la trasformazione può essere condotta direttamente su terreno

selettivo (*Yeast Nitrogen Base* in questo caso) contenete sorbitolo sul quale erano state previamente disperse le cellule.

Sono poche le evidenze bibliografiche recenti che riportano l'utilizzo di questa tecnica di trasformazione per creare *pool* di mutanti inserzionali in funghi (Idnurm *et al.,* 2004; Webb *et al.,* 2005). Questo è dovuto principalmente alla maggiore efficacia della AMT sia in termini di numero di trasformanti ottenuti sia in termini di stabilità dei trasformanti selezionati (Weld *et al.,* 2006). A tal proposito, Idnurm *et al.* (2004) riportano che trasformanti di *C. neoformans* generati mediante biolistica e AMT mostravano, rispettivamente, una stabilità del 14% e del 99,5%; questa grande differenza era dovuta essenzialmente a meccanismi intrinseci relativi alle diverse modalità di trasferimento e integrazione del DNA esogeno nel genoma dell'ospite.

La trasformazione biolistica è attualmente il metodo più utilizzato per la mutagenesi mirata nei lieviti basidiomiceti *C. neoformans* e *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (Toffalletti *et al* 1993; Davidson *et al.,* 2002; Kim *et al.,* 2009; Ianiri *et al.,* inviato per la pubblicazione); altre applicazioni in esperimenti di mutagenesi mirata sono riportate anche per *S. cerevisiae* (Bonnefoy e Fox, 2007) e per il nematode *Caenorhabditis elegans* (Berezikov *et al.,* 2004).

5.3.3 – Trasformazione mediante elettroporazione

L'elettroporazione è un metodo di trasformazione basato su un processo fisico che consente di introdurre molecole di DNA in procarioti e in eucarioti. L'ingresso delle molecole avviene per la permeabilità transiente delle membrane cellulari indotta da pulsazioni elettriche. L'apparato per la trasmissione di pulsazioni elettriche alle cellule è denominato elettroporatore. Le pulsazioni trasmesse possono essere di due tipi: a voltaggio costante (ad onda quadra) e a voltaggio con decadimento esponenziale. Il metodo di elettroporazione con pulsazioni ad onda quadra è poco usato nei funghi mentre i sistemi che impiegano pulsazioni con voltaggio a decadimento esponenziale sono largamente diffusi. Le pulsazioni elettriche sono regolate da due parametri: iniziale intensità del campo e la costante tempo. L'intensità di campo e il voltaggio variano in base al tipo di cellule da trasformare: per i batteri sono impiegati valori di intensità di campo elevati (16-19 kV/cm), mentre per gli eucarioti si impiegano valori più bassi (0,5-1 kV/cm).

L'elettroporazione è una tecnica attualmente molto impiegata nei laboratori di biologia molecolare per la propagazione di vettori plasmidici in *E. coli* e per la

trasformazione di ceppi batterici da utilizzare per altri tipi di esperimenti, come avviene per esempio per la trasformazione mediata da *A. tumefaciens.*

Per quanto riguarda l'applicabilità su cellule eucariotiche, l'elettroporazione è stata la tecnica di trasformazione più utilizzata fino a qualche anno fa come documentato da (Ruiz-Dìez, 2002). Tuttavia, la laboriosa preparazione dei protoplasti a partire dalle cellule da trasformare, ha fatto sì che questa tecnica venisse sostituita per gli studi di mutagenesi inserzionale dalla trasformazione mediata da *A. tumefaciens* (Michielse *et al.,* 2005; Weld *et al.,* 2006).

Come descritto per la biolistica, l'elettroporazione può essere utilizzata con successo per esperimenti di mutagenesi mirata a carico di diversi lieviti e funghi filamentosi, come *S. cerevisiae, C. neoformans e N. crassa* (Bundock *et al.,* 1996; Davidson *et al.,* 2000; Colot *et al.,* 2006).

Nel patogeno umano *C. neoformans,* l'elettroporazione trova un interessante impiego per l'introduzione in cellule ospiti del vettore episomico pPM8 che, grazie ad alcune peculiarità (sequenze *STAB* e *Tel* di *C. neoformans* che stabilizzano il vettore nel nucleo della cellula), si comporta come un minicromosoma e può essere utilizzato efficacemente per l'espressione di proteine eterologhe (Mondon *et al*., 2000) e per la costruzione di librerie genomiche (Hull e Heitman 2002). A tal proposito, è attualmente in fase di sperimentazione presso il laboratorio di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi del Molise la generazione di una *library* per l'individuazione dei geni responsabili della degradazione della patulina da parte del BCA *R. kratochvilovae* LS11; questo approccio, complementare agli approcci di mutagenesi riportati in questa tesi, prevede l'utilizzo del vettore pPM8 e l'espressione dei cloni da generare nell'auxotrofo *ura5* JEC43 di *C. neoformans*.

Nella figura 10 si riporta uno schema illustrativo dei tre più comuni metodi di trasformazione per creare mutanti inserzionali e delezionali nei lieviti basidiomiceti.

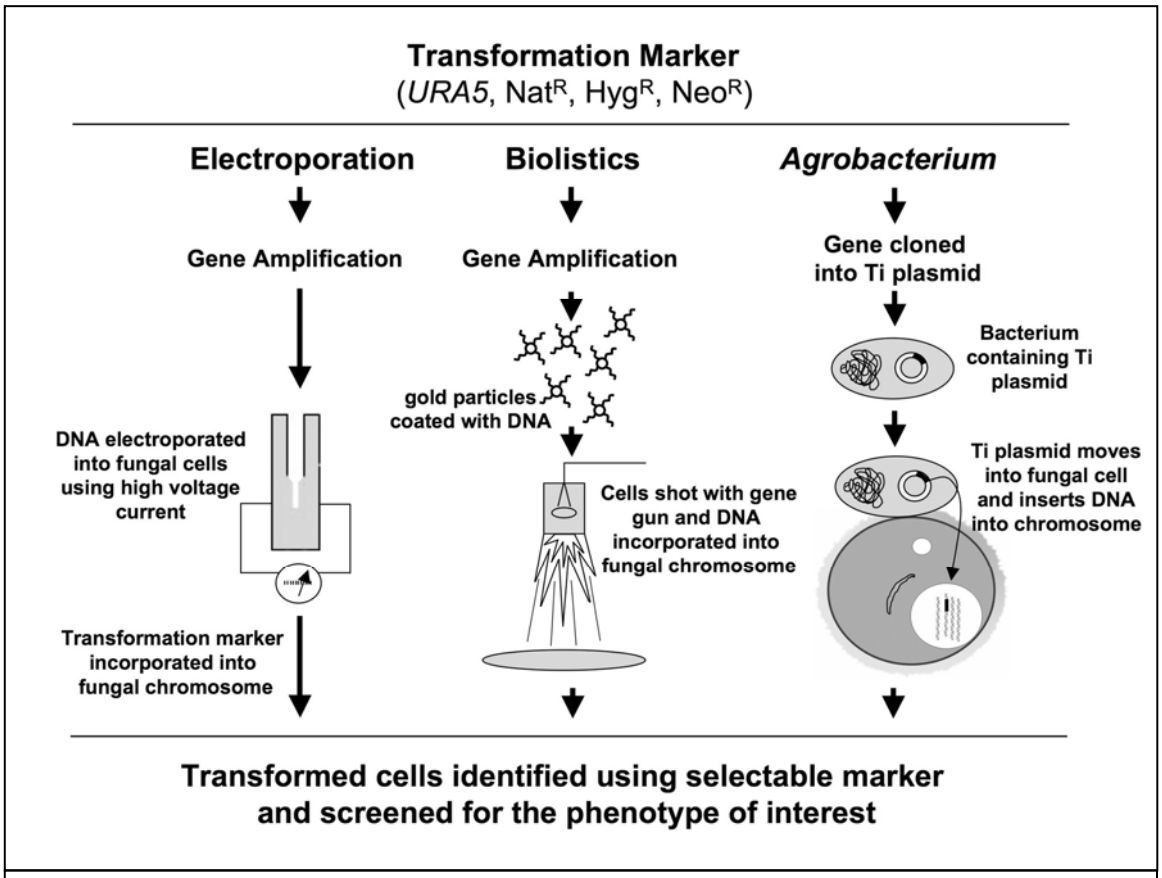


Figura 10: ***Overview*** **dei tre differenti metodi utilizzati per creare mutanti inserzionali e delezionali nei lieviti basidiomiceti. Costrutti contenenti il gene marker** ***URA5*** **o le cassette codificanti per la resistenza agli antibiotici igromicina, neomicina e nurseotricina sono inserite nel genoma dei lieviti basidiomiceti mediante elettroporazione, trasformazione biolistica o mediata da** ***A. tumefaciens.*** **I trasformanti vengono isolati su terreni selettivi appropriati per i geni** ***marker*** **utilizzati per la trasformazione. (Da Idnurm e Williamson, 2010)**

SCOPO E RIASSUNTO DELLA TESI

Negli ultimi anni, l'esigenza di ridurre i residui di fitofarmaci negli alimenti e il loro impatto ambientale ha determinato un crescente interesse del mondo scientifico verso la ricerca di alternative biologiche all'uso dei fungicidi di sintesi. L'attività scientifica del gruppo di Patologia Vegetale dell'Università degli Studi del Molise è indirizzata già da molti anni alla messa a punto di metodi eco-compatibili di difesa delle colture agrarie, con particolare attenzione ad aspetti riguardanti le interazioni tra ospite, patogeno e agenti di lotta biologica (BCA). Negli anni passati, le ricerche hanno riguardato soprattutto lo studio dei meccanismi d'azione di alcuni BCA, quali i lieviti basidiomiceti *Rhodotorula glutinis* ceppo LS11 e *Cryptococcus laurentii* ceppo LS28 e il fungo lievitiforme *Aureobasidium pullulans* ceppo LS30, e la loro efficacia nel contenimento dei principali patogeni degli ortofrutticoli conservati (Castoria *et al.*, 1997, 2001, 2003; De Curtis *et al*., 1996, 2004; Lima *et al*., 1997, 1998, 2005, 2006). Negli ultimi anni è stata rivolta l'attenzione anche all'effetto di alcuni di questi BCA sulla produzione e sull'accumulo di alcune micotossine [patulina (PAT) e ocratossina A (OTA)] nei frutti in campo ed in conservazione (Castoria *et al*., 2005; De Felice *et al.,* 2008).

Nel 2005 Castoria *et al.* hanno dimostrato la capacità del BCA *R. kratochvilovae* LS11 (precedentemente classificato come *Rhodotorula glutinis*) nel degradare la patulina in due composti differenti, uno più stabile, successivamente identificato come DPA (Castoria *et al.* in preparazione) ed uno meno stabile che è attualmente in fase di isolamento e caratterizzazione, e che dati preliminari suggeriscono sia probabilmente un composto intermedio del *pathway* degradativo. Sulla base delle informazioni disponibili in letteratura, il DPA non è tossico per una serie di microrganismi (incluso *Escherichia coli* DH5α) verso i quali è invece tossica, nelle stesse condizioni di saggio, la patulina (Scott *et al.,* 1972; Wright *et al.,* 2008; Castoria *et al.,* in preparazione). Questa differente tossicità della patulina e/o dei metaboliti prodotti dalla sua degradazione nei confronti del batterio *E. coli* DH5α è stata sfruttata per mettere a punto un biosaggio che ci ha permesso di valutare in modo rapido la degradazione della tossina da parte di *R. kratochvilovae* LS11 (Wright *et al.,* 2008) (Fig. 11).

L'obiettivo originario del mio lavoro è stata la creazione di un *pool* di mutanti inserzionali di *R. kratochvilovae* LS11 mediante l'impiego del T-DNA di *A. tumefaciens* (Idnurm *et al.,* 2004) e l'individuazione dei trasformanti/mutanti che avessero perso la capacità di degradare la patulina a causa del *knockout* genico dovuto all'inserzione di T-DNA esogeno nel putativo gene (o geni) responsabile della degradazione della micotossina, al fine di comprendere le basi genetiche della sua degradazione da parte del BCA. La scelta

del T-DNA di *A. tumefaciens* come mutageno inserzionale, è stata dovuta ai vantaggi di questo metodo rispetto ad altri metodi usati tradizionalmente [i.e. impiego di trasposoni, REMI (*restriction enzyme-mediated integration*) ecc..] (Michielse *et al.,* 2005; Weld *et al.,* 2006). Ho perciò inizialmente condotto uno studio sull'applicabilità della trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* (AMT = *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation) per creare un *pool* di mutanti inserzionali (Idnurm *et al.,* 2004) di *R. kratochvilovae*.

Sono stati testati cinque diversi vettori impiegati con successo per creare mutanti inserzionali nel patogeno umano *C. neoformans* (Idnurm *et al.,* 2004, 2007; Walton *et al.,* 2005) che, poiché anch'esso basidiomicete, è filogeneticamente correlato a LS11. I vettori utilizzati, denominati pPZP-HYG2 (Fig. 16), pPZP-NEO1 (Fig. 17) e pPZP-NATcc (Fig. 18) (Tab. 12), conferiscono ai trasformanti ottenuti la resistenza agli antibiotici igromicina B, neomicina G418 e nurseotricina, rispettivamente. Inoltre, sono stati testati anche i vettori binari pPZP-GFP-NATcc (Fig. 19) e pPZP-Hxk2.GFP-NATcc, entrambi generati a partire dal pPZP-NATcc, clonando nel T-DNA anche il gene che codifica per la produzione della proteina fluorescente GFP (*green fluorescence protein*) (Tab. 12).

Dal punto di vista fenotipico, i risultati ottenuti non differivano tra loro in quanto, a prescindere dal tipo di vettore utilizzato, tutti i putativi trasformanti di LS11 generati mostravano un'elevata capacità di svilupparsi su terreno contenente l'antibiotico usato per la selezione. L'analisi molecolare di putativi trasformanti selezionati a *random*, tuttavia, non ha confermato i dati fenotipici poiché nelle analisi *Southern blot* effettuate per confermare l'integrazione del T-DNA nel genoma di LS11, non è stata ottenuta alcuna ibridazione per tutti i campioni analizzati (Fig. 22 C, 23 D, 24 B). Questi dati molecolari sono stati anche supportati da osservazioni al microscopio a fluorescenza effettuate per valutare l'espressione della GFP; in dettaglio, per i putativi trasformanti di LS11 si osservava una fluorescenza molto debole o assente, mentre per i trasformanti di *C. neoformans* (utilizzato come controllo positivo della trasformazione) ottenuti con lo stesso vettore, si osservava l'atteso forte segnale fluorescente (Fig. 24 C - L).

Le difficoltà incontrate nella trasformazione del BCA *R. kratochvilovae* LS11 e, di conseguenza, l'impossibilità di generare un *pool* di mutanti inserzionali, mi hanno spinto ad individuare microrganismi alternativi filogeneticamente correlati al BCA di interesse, che fossero in grado di metabolizzare la patulina secondo lo stesso *pathway* degradativo ipotizzato per *R. kratochvilovae* LS11, e che ora è stato confermato grazie ad un progetto bilaterale del gruppo del Prof. Castoria con il gruppo della prof.ssa Rosa Duran Patron

dell'Università di Cadige (dati non pubblicati) (Fig. 38). A tale scopo sono stati saggiati diversi ceppi di lieviti rosa appartenenti alla nuova collezione del laboratorio di patologia vegetale che analisi RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) delle regioni ITS (*Internal Transcribed Spacer*) hanno permesso di identificare come appartenenti al genere *Sporobolomyces*.

Tra i ceppi di *Sporobolomyces* in grado metabolizzare la patulina è stato deciso di utilizzare il ceppo di riferimento *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 [erroneamente classificato come *S. roseus* e ricollocato da Valerio *et al.* (2008) nel gruppo dei Pararoseus] in quanto è disponibile presso il sito web del *Joint Genome Institute* la bozza della sequenza completa del genoma (http://genome.jgi-psf.org/Sporo1/Sporo1.home.html).

Per la generazione di mutanti inserzionali di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481, è stato isolato, caratterizzato e utilizzato un auxotrofo *ura5* (AIS2) recante una delezione di 129 bp tra il promotore e la ORF (*Open Reading Frame*) del gene *URA5* (Fig 28 A, mutazione B1a). Il vettore utilizzato per la trasformazione con *A. tumefaciens* è stato generato clonando il gene *URA5*, ottenuto mediante amplificazione PCR dal genoma di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481, nel T-DNA del vettore pPZP-201BK (Covert *et al.,* 2001). L'efficacia del metodo di trasformazione nel generare mutanti inserzionali prototrofi a partire dall'auxotrofo AIS2 è stata accertata mediante analisi PCR, *Southern blot* e *inverse* PCR (Fig 28 B -C, 29 D e F).

In questo lavoro, circa 3200 trasformanti così generati sono stati sottoposti a saggi di degradazione della patulina. I filtrati colturali ottenuti sono stati analizzati mediante il biosaggio con *E. coli* DH5α citato in precedenza per individuare mutanti che, come conseguenza della disattivazione genica verificatasi a causa dell'inserzione del T-DNA, non fossero più in grado di degradare la patulina o comunque mostrassero una alterata cinetica della degradazione rispetto al ceppo *wild type* IAM 13481. I risultati preliminari ottenuti coi biosaggi di *E. coli* DH5α, sono stati confermati mediante cromatografia su strato sottile (TLC). Da 3200 trasformanti sottoposti a screening, 15 hanno mostrato un andamento di degradazione della patulina più lento rispetto al ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. e sono perciò stati denominati *slower patulin degraders*.

L'avvenuta integrazione del T-DNA e il numero di inserzioni in questi trasformanti sono state accertati mediante *Southern blot* (Fig. 31), mentre mediante *inverse PCR* e *plasmid rescue* si è risaliti alle sequenze dei geni disattivati dall'inserzione del T-DNA (Fig. 32). Le sequenze identificate sono state comparate mediante analisi Blastx con le sequenze presenti nelle banche dati per conoscere gli omologhi/ortologhi dei geni di

Sporobolomyces sp. IAM 13481 disattivati dall'inserzione del T-DNA. Per molti dei geni identificati, la relativa funzione è stata confermata mediante analisi fenotipica dei trasformanti *slower patulin degraders* selezionati. Dalla correlazione tra i meccanismi di tossicità della patulina sui sistemi cellulari e la funzione dei geni recanti l'inserzione di T-DNA, è emerso chiaramente che il fenotipo *slower patulin degrader* è dovuto alla disattivazione di geni coinvolti in diverso modo nella resistenza alla patulina, come nel caso di geni implicati direttamente o indirettamente nella resistenza allo stress ossidativo (*YCK2, PAC2, ECM38, CDC24, VPS8 e probabilmente MCM1*) e nel mantenimento dell'integrità della membrana plasmatica e/o della parete cellulare (*CYB5, YCK2, PAC2, ECM38,* gene che codifica per la proteina con ID 28891, *CDC24, GYP7, VPS8, SSO1 e probabilmente MCM1*), di geni richiesti per la normale funzione dei microtubuli (*PAC2*) e di geni attivi nel *turnover* del peptide antiossidante glutatione (*ECM38*) (Fig. 33, 34; Tab. 14).

Questi risultati hanno permesso di formulare nuove ipotesi riguardo alla degradazione della patulina da parte dei lieviti del *sub-phylum* Pucciniomicotina, in particolare *Sporobolomyces* sp. IAM 13481. La disattivazione nei mutanti *slower patulin degraders* di differenti classi di geni coinvolti in diverso modo nella resistenza alla micotossina suggerisce che, oltre alla ipotizzata azione diretta di geni codificanti per enzimi che intervengono direttamente nel processo degradativo, esiste un ruolo indiretto esplicato dai geni identificati, che permette inizialmente alle cellule di resistere all'azione tossica della patulina, presumibilmente propedeutico alla degradazione della micotossina.

Oltre all'approccio di mutagenesi inserzionale *random,* sono stati anche condotti esperimenti di mutagenesi mirata (*gene replacement*) a carico del gene *VPS8* per confermare il fenotipo ottenuto in seguito all'inserzione del T-DNA nel medesimo gene. Infatti, un limite legato all'interpretazione del fenotipo dei mutanti inserzionali è rappresentato dall'assenza di un sistema di segregazione genetica che permetterebbe di assegnare in modo inequivocabile, mediante analisi fenotipica della progenie ottenuta in seguito ad incrocio, la funzione del gene disattivato dall'inserzione di T-DNA.

Dagli esperimenti effettuati sono stati ottenuti dei dati discordanti dal punto di vista fenotipico per i due mutanti *vps8* (*vps8::T-DNA* e *vps8*Δ) generati con le due differenti strategie di mutagenesi; infatti, anche se entrambi hanno mostrato un andamento della degradazione più lenta rispetto a quella del ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. (Fig. 37 A), i risultati dei test di sensibilità effettuati, diversamente da quanto atteso, mostrano

che i mutanti *vps8::T-DNA* e *vps8*Δ sono caratterizzati da una risposta fenotipica differente tra loro (Fig. 37 B).

La mutagenesi mirata è stata anche applicata a carico dei geni *DLH* e *rDLH* codificanti per due diversi enzimi (*protein* ID 34178 e 6066, rispettivamente) dotati di attività idrolasica di lattoni, quale è la stessa patulina. Sulla base di risultati ottenuti in collaborazione il gruppo della prof.ssa Rosa Duran Patron dell'Università di Cadige (Spagna) il primo step del *pathway* degradativo della patulina consiste nell'idrolisi dell'anello lattonico della micotossina che potrebbe essere operata da un enzima con attività diene lattone idrolasica (Fig. 38).

Dai dati preliminari ottenuti emerge che diversamente dagli altri geni identificati, non c'è stretta correlazione tra i dati ottenuti dai test di sensibilità (i.e. mancata sensibilità al perossido di idrogeno e bassa sensibilità all'SDS) e i dati ottenuti dagli esperimenti di degradazione della patulina (Fig. 41 A, B). Di conseguenza è possibile che il rallentamento nella degradazione della micotossina osservato per i putativi mutanti *dhl*Δ e *rdlh*Δ possa essere dovuto ad un diretto coinvolgimento dei geni codificanti per le diene lattone idrolasi nel processo di degradazione della patulina. Tuttavia i risultati ottenuti sono preliminari ed è necessario confermarli mediante analisi più approfondite.

MATERIALI E METODI

7.1 – Microrganismi

I ceppi di lievito usati in questo lavoro di tesi sono:

✓ *Rhodotorula glutinis*, isolato LS11, appartenente alla collezione del dipartimento S.A.V.A. precedentemente selezionato per l'elevata attività antagonistica contro i più comuni patogeni fungini in post-raccolta (Castoria *et al.,* 1997; 2001; 2003; Lima *et al.,* 1998; 1999) e per l'elevata capacità nel degradare la patulina *in vitro* (Castoria *et al.,* 2005). Questo ceppo è stato recentemente riclassificato come *Rhodosporidium kratochvilovae,* forma sessuata di diverse *Rhodotorula* spp. (Barnett *et al.,* 2000; Sampaio *et al.,* 2001), confrontando la regione ITS *(internal transcribed spacer)* del DNA ribosomiale del lievito LS11 con quelle presenti in banca dati (dati non pubblicati). La denominazione *Rhodosporidium kratochvilovae* è quella usata in questo lavoro di tesi.

✓ Il ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces roseus* (anche conosciuto come YK 419 e JCM 8242), originariamente isolato in Giappone da foglie di salice (Yamazaki e Komagata, 1983). Per questo ceppo in questa tesi è stata adoperata la nuova denominazione di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 utilizzata da Ianiri *et al.* (inviato per la pubblicazione), poiché Valerio *et al.* (2008) lo hanno ricollocato, a seguito a analisi tassonomiche molecolari, nel gruppo dei Pararoseus di *Sporidiobolus* (teleomorfo di *Sporobolomyces*) (vedi figura 2 in Valerio *et al.,* 2008). Per questo ceppo inoltre, è disponibile *on line* presso il sito del Joint Genome Institute (US Department of Energy) una bozza della sequenza dell'intero genoma (~21.2 Mb) (http://genome.jgi-psf.org/Sporo1/Sporo1.home.html).

✓ *Sporobolomyces* sp AIS2, auxotrofo spontaneo per l'uracile derivante da *Sporobolomyces* sp IAM 13481, che presenta una delezione di 129 bp tra il promotore e la ORF (*Open Reading Frame*) del gene *URA5* (Fig 28 A, mutazione B1a).

✓ *Saccharomyces cerevisiae* FY834 (*MATα his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63*) auxotrofo per gli amino acidi istidina, leucina, lisina e triptofano e per uracile (Winston *et al.,* 1995); questo ceppo è stato utilizzato per la generazione dei costrutti utilizzati per la mutagenesi mirata come descritto in Colot *et al.* (2006).

Tutti i lieviti sono stati allevati su terreno agarizzato YPD (20 g/L di bacto peptone, 10 g/L di yeast extract, 20 g/L di glucosio, 20g/L di agar); per gli auxotrofi invece, quando necessario sono stati utilizzati terreni minimi contenenti gli appropriati aminoacidi alle concentrazioni indicate negli appositi paragrafi. In tabella 11 sono riportati tutti i ceppi di lievito utilizzati in questo studio, compresi i mutanti inserzionali derivati dall'auxotrofo

AIS2 di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 generati nei successivi esperimenti di trasformazione.

I ceppi batterici sono:

✓ *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 contenente un plasmide Ti con i geni *vir* e i vettori binari descritti successivamente in questa tesi;

✓ *Escherichia coli* DH5α utilizzato nei saggi biologici effettuati per valutare la persistenza della patulina nei terreni colturali in cui sono stati allevati i lieviti, trasformanti e non. Questo batterio, infatti, è sensibile anche a basse concentrazioni di patulina, ed è perciò il microrganismo ideale da poter essere impiegato come indicatore della presenza della micotossina (Wright *et al.,* 2008) (Fig. 11).

✓ *E. coli* DH5α e Top10 di (Invitrogen) utilizzati per propagare, come descritto da Sambrook *et al.* (1989), i costrutti plasmidici ottenuti in questo lavoro.

I ceppi di *Sporobolomyces* sp IAM 13481. e *A. tumefaciens* EHA105 con e senza i vettori binari per la trasformazione delle cellule di lievito sono stati gentilmente messi a disposizione dal Prof. Alexander Idnurm, University of Missouri-Kansas City (UMKC) - Division of Cell Biology and Biophysics - School of Biological Sciences.

7.2 - Reagenti chimici

- Patulina: La patulina è reperibile in commercio sotto forma di composto cristallino incolore (A.G. Scientific). Le *stock solutions* di patulina sono state preparate dissolvendo la micotossina in acetato di etile e conservandola in aliquote da 1 ml a –20°C alla concentrazione di 2000 μg/ml. Al momento dell'utilizzo sono state preparate *working solution* portando a secco, sotto corrente di azoto a 45°C, appropriate quantità di *stock solution*. Le *working solutions* alle concentrazioni desiderate sono state preparate aggiungendo alla patulina un'adeguata quantità di terreno Lilly Barnett (10 g di D-glucosio, 2 g di L-asparagina, 1 g di KH2PO4, 0.5 g di MgSO4 •7 H2O, 0,01 mg di FeSO4 • 7 H2O, 8.7 di mg ZnSO4 • 7 H2O, 3 mg di MnSO4 • H2O, 0,1 mg di biotina, 0,1 di mg tiamina - LiBa - Lilly e Barnett, 1951).

- Antibiotici: gli antibiotici Igromicina B (Invitrogen e Roche), Neomicina G418 (Invitrogen), Nurseotricina (WernerBioAgents) per la selezione di putativi lieviti trasformanti, Kanamicina (Sigma-Aldrich) per la selezione dei ceppi batterici di *E. coli* e *A. tumefaciens* portanti le relativa cassetta di resistenza per le procedure propedeutiche agli esperimenti di trasformazione e Cefotaxime (Sigma-Aldrich) per sopprimere la crescita delle cellule di *A. tumefaciens* al termine degli esperimenti di trasformazione.

Tutti gli antibiotici sono stati conservati in *stock solutions* (100 mg/ml) preparate sciogliendo l'intero contenuto delle confezioni in acqua ultra pura (MQ) sterile e mediante filtrosterilizzazione con filtri da 0.22 µm. Al momento dell'utilizzo, adeguate aliquote di *stock solution* sono state aggiunte ai substrati per ottenere la concentrazione di antibiotico desiderata.

7.3 - Trasformazione di *R. kratochvilovae* LS11 mediata da *Agrobacterium tumefaciens*

7.3.1 - Determinazione della CMI per *R. kratochvilovae* LS11 degli antibiotici usati nella selezione post-trasformazione

Al fine di selezionare, dopo trasformazione mediante *Agrobacterium tumefaciens*, i soli trasformanti recanti come *marker* selettivi la resistenza ad antibiotici, sono stati condotti degli esperimenti per determinare la Concentrazione Minima Inibitoria (CMI) degli antibiotici igromicina B, neomicina G418 e nurseotricina per il lievito *R. kratochvilovae* LS11 WT. Per l'igromicina B è stata inoltre valutata la tossicità dello stesso antibiotico acquistato da diverse ditte produttrici (Sigma, Invitrogen, Roche)

Gli esperimenti sono stati eseguiti in terreno agarizzato YPD contenente 50, 100, 200, 300 e 400 µg/ml di ognuno dei tre antibiotici testati. Al fine di ottenere una valutazione accurata della CMI, le cellule sono state trattate secondo la stessa procedura utilizzata per la trasformazione con *Agrobacterium*: una coltura di LS11 mantenuta *overnight* (ON) su agitatore rotante a 25°C, è stata diluita fino a un valore di densità ottica di 0.2 e successivamente dispersa (200 µl) su YPD agarizzato contenente le diverse concentrazioni dei tre antibiotici testati. Come controllo positivo, la stessa sospensione cellulare è stata piastrata su YPD privo di antibiotico. La CMI dei tre antibiotici è stata determinata rilevando giornalmente e per sette giorni la crescita di colonie a 25°C.

7.3.2 - Determinazione della CMI del cefotaxime per *A. tumefaciens* EHA105

Il protocollo di trasformazione con *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 prevede, dopo incubazione duale del batterio e del microrganismo da trasformare, la selezione delle sole colonie trasformanti su piastre di YPD contenenti l'antibiotico appropriato a concentrazione in grado di impedire la crescita di LS11 WT, e cefotaxime, quest'ultimo necessario per eliminare le cellule batteriche al termine della trasformazione.

La CMI del cefotaxime nei confronti del ceppo EHA105 di *A. tumefaciens* usato per la trasformazione di LS11 è stata determinata utilizzando tre differenti concentrazioni di

antibiotico (100, 200 e 300 µg/ml) su YPD agar e Luria Bertani agar. Le cellule di *A. tumefaciens* sono state strisciate su piastra mediante ansa ad anello e sono state incubate per sette giorni a 23°C.

7.3.3 - Vettori utilizzati per la trasformazione

Per la AMT (*Agrobacterium*-mediated transformation) del ceppo *Wild type* (WT) del BCA *R. kratochvilovae* LS11 sono stati inizialmente testati i vettori binari pPZP-HYG2, pPZP-NEO1, pPZP-NATcc e pPZP-GFP-NATcc (Tab. 12), le cui mappe sono riportate nelle figure 16, 17, 18 e 19, rispettivamente. Questi vettori conferiscono alle cellule trasformate la resistenza all'igromicina B (pPZP-HYG2), alla neomicina G418 (pPZP-NEO1) e alla nurseotricina (pPZP-NATcc e pPZP-GFP-NATcc). In tutti e quattro i vettori, i geni *marker* sono sotto il controllo del promotore costitutivo del gene dell'actina *ACT1* e del terminatore del gene del triptofano *TRP1* di *C. neoformans* (Walton *et al.,* 2005). Per il vettore pPZP-GFP-NATcc, oltre al gene NAT che conferisce la resistenza all'antibiotico nurseotricina, nel T-DNA è presente anche il gene che codifica per la proteina fluorescente GFP (green fluorescence protein) posto sotto il controllo del promotore e terminatore dell'istone H3, anch'essi di *C. neoformans*. Il pPZP-Hxk2.GFP-NATcc rappresenta una variante del pPZP-GFP-NATcc in cui, all'inizio del promotore H3, è presente la porzione N-terminale della proteina dell'esochinasi Hxk2 che funge da stabilizzatore dell'espressione della proteina fluorescente GFP (Idnurm *et al.,* 2007).

7.3.4 - Trasformazione mediata da *A. tumefaciens*

La AMT è stata eseguita riportato come descritto da Idnurm *et al.,* (2004) utilizzando il ceppo EHA105 di *A. tumefaciens* contenente un plasmide Ti difettivo recante i geni *vir* e i plasmidi pPZP-HYG2, pPZP-NEO1, pPZP-NATcc, pPZP-GFP-NATcc e pPZP-Hxk2.GFP-NATcc (Tab. 12; Fig. 16 - 19). Come controllo positivo delle trasformazioni è stato utilizzato il ceppo JEC 21 di *C. neoformans* (Idnurm *et al.,* 2004, 2007; Walton *et al.,* 2005), come controllo negativo il ceppo EHA105 privo dei vettori binari.

Le cellule di *A. tumefaciens* EHA105, cresciute ON in LB contenente 50 µg/ml di kanamicina sono state centrifugate a 3000 rpm per 5 minuti (min), lavate con acqua sterile e, dopo ulteriore centrifugazione, risospese in 5 ml di IM (*Induction medium*) [MM salts 1X, 40 mM di 2-(N-morpholino) *ethanesulfonic acid* (MES), pH 5.3, 10 mM di glucosio, 0,5% (p/v) di glicerolo e 100 µM di Acetosiringone (AS)] (Bundock *et al.,* 2005). Al termine dell'incubazione è stata misurata la densità ottica (600 nm) e la coltura ON è stata

diluita in IM fino ad un valore di OD_{600} compreso tra 0,15 e 0,3. La coltura è stata incubata per 6 ore (h) a 28°C su agitatore orbitale a 200 rpm fino a OD_{600} pari a 0,6. Per quanto riguarda *R. kratochvilovae* LS11, cellule allevate ON sono state lavate con acqua sterile e risospese in IM ad una densità ottica di 0,2, corrispondente a $2*10^6$ UFC (unità formanti colonie) per ml.

Duecento µl delle sospensioni cellulari di *A. tumefaciens* EHA105 e di LS11 tal quali e diluite 1:10 sono state poste nelle 4 combinazioni possibili su una piastra di IM agar [MM salts 1X, 40 mM di 2-(N-morpholino) ethanesulfonic aci*d* (MES), pH 5.3, 10 mM di glucosio, 0,5% (p/v) di glicerolo, 100 µM di AS, 20g/L di agar] prestando attenzione nel disperdere il meno possibile la miscela. Le piastre sono state incubate per 2-3 giorni a 24°C prive di parafilm per permettere una maggiore circolazione di ossigeno. Al termine,le cellule incubate in coltura duale sono state risospese in 10 ml di YPD, centrifugate a 2000 rpm per 7 min e il supernatante, in cui si concentra la maggior parte delle cellule batteriche date le loro ridotte dimensioni, è stato scartato. Il pellet è stato risospeso in YPD e diverse aliquote sono state disperse su terreno agarizzato YPD contenente uno dei tre antibiotici e 200 µg/ml di cefotaxime, per selezionare i trasformanti e, contemporaneamente, eliminare le cellule batteriche. Le piastre sono state incubate a 24°C fino alla comparsa delle colonie.

Le singole colonie che si sono sviluppate sono state trasferite mediante stuzzicadenti sterili in piastre Petri contenenti lo stesso substrato impiegato per la selezione (con antibiotico e cefotaxime). Il cefotaxime è stato utilizzato in almeno due trasferimenti in mado da sopprimere completamente le cellule batteriche.

7.3.5 - Test di stabilità dei putativi trasformanti di *R. kratochvilovae* LS11 ottenuti

Il test di stabilità, condotto come riportato da Idnurm *et al.* (2004) è stato eseguito per verificare la capacità dei putativi trasformanti di mantenere stabilmente il DNA esogeno inserito con la trasformazione. I putativi trasformanti cresciuti su piastre con terreno agarizzato selettivo, sono stati trasferiti in YPD non selettivo (senza antibiotici) su agitatore orbitale a 200 rpm e 23°C. Dopo 3 giorni di incubazione, aliquote (2 µl) di ogni sospensione cellulare sono state trasferite nuovamente su YPD agar con e senza antibiotico e le piastre incubate a 23°C per 4 giorni. I putativi trasformanti stabili sono stati selezionati in base alla capacità di svilupparsi nuovamente su substrato selettivo. In particolare, quelli non più in grado di svilupparsi o che hanno mostrato crescita stentata sono stati scartati, mentre quelli stabili sono stati impiegati per i successivi esperimenti di caratterizzazione molecolare (PCR, *inverse* PCR e *Southern blot*).

7.3.6 - Analisi genetico-molecolare dei putativi trasformanti ottenuti

Per determinare l'avvenuta integrazione del T-DNA nel genoma ospite, sono state effettuate analisi PCR, *Southern blot* e *inverse* PCR.

7.3.6.1 - Estrazione del DNA genomico

Per l'analisi molecolare dei trasformanti sono stati impiegati due differenti protocolli per l'estrazione del DNA: un metodo di estrazione rapida per analisi PCR e un altro metodo per estrazione di elevate concentrazioni di DNA necessarie per l'analisi mediante *Southern blot*. Per l'estrazione rapida del DNA è stato impiegato il metodo descritto da Hoffman (1997) leggermente modificato. Le cellule allevate su terreno selettivo agarizzato, sono state risospese in 500 µl di acqua sterile in eppendorf da 2 ml e centrifugate per 5 secondi (sec) a *room temperature* (RT). Dopo eliminazione del supernatante, sono stati aggiunti 200 µl di *breaking buffer* [2% (v/v) Triton X-100, 1% (v/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 mM NaCl, 10 mM Tris·Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0], 0,3 g di *glass beads* e 200 µl di fenolo/cloroformio/alcol isoamilico (25/24/1) e i campioni sono stati posti su vortex per 3 min. Dopo aver aggiunto 200 µl di TE buffer (10 mM Tris·Cl, pH 7.4; 1 mM EDTA, pH 8.0), i campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm per 5 min a RT e la fase superiore acquosa è stato trasferita in un'altra eppendorf, in cui è stati aggiunto 1 ml di etanolo al 100%. Dopo centrifugazione per 3 min in centrifuga da tavolo il supernatante è stato allontanato e il pellet lasciato ad asciugare. Quindi il DNA è stato purificato incubando i campioni in presenza di DNase-free RNase A (3 µl di soluzione 10 mg/ml) e precipitato con acetato di sodio 3M pH 5.2 come descritto da Sambrook *et al.,* 1989. Infine, il pellet è stato risospeso in un volume variabile di TE buffer e mantenuto a -20°C fino all'utilizzo.

Per ottenere DNA quantitativamente e qualitativamente migliore da sottoporre ad analisi *Southern blot*, è stato seguito il metodo descritto da Pitkin *et al.* (1996). Pellet cellulare derivante da colture allevate su terreno selettivo liquido e/o agarizzato, è stato posto a -80 °C per 30 - 60 minuti e subito liofilizzato per un tempo variabile a seconda della quantità di pellet (solitamente da 6 h a ON). Il pellet liofilizzato è stato frammentato in presenza di 3-5 ml di *glass-beads* (diametro 2 mm), e successivamente sono stati aggiunti 10 ml di *buffer* di estrazione CTAB [Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 0,7 M, EDTA 10 mM, cetyltrimetil ammonio bromuro 1% (m/v), β-mercaptoetanolo 1% (v/v)]. La miscela di lisi cellulare è stata incubata a 65°C per 30 min, sono stati aggiunti 10 ml di cloroformio e dopo leggera agitazione per circa un min la miscela è stata centrifugata a 3000 rpm per 10 min a RT (Centrifuga Effendorf 5810R). Sette ml circa di fase acquosa

superiore contenente il DNA sono stati trasferiti in falcon da 15 ml contenenti un ugual volume di isopropanolo. Il pellet di DNA è stato raccolto per centrifugazione a 4000 rpm per 10 min a 4°C, lavato con 1 ml di etanolo al 70% e trasferito in tubi da 1,5 ml. I campioni sono stati nuovamente centrifugati in centrifuga da tavolo a 14000 rpm per 10 min, l'etanolo allontanato e il pellet lasciato ad asciugare. Infine, il pellet di DNA è stato risospeso in un volume variabile di TE *buffer,* è stata aggiunta RNAse A (Sigma) (3 µl di soluzione 10 mg/ml) e dopo una breve incubazione a 37°C il DNA è stato posto a -20°C fino all'utilizzo.

7.3.6.2 - Analisi PCR

Per verificare la presenza del DNA esogeno, sono state preliminarmente condotte analisi PCR sul DNA genomico di diversi putativi trasformanti scelti a *random* tra quelli risultati stabili. Come controllo positivo sono stati utilizzati i vettori utilizzati per la trasformazione e in alcuni casi anche il DNA genomico estratto da trasformanti di *C. neoformans* JEC 21 generati durante lo stesso esperimento di trasformazione, mentre come controllo negativo è stato utilizzato il DNA genomico dei ceppi WT non trasformati; un controllo senza DNA è stato effettuato in tutte le reazioni PCR per accertare la qualità dei reagenti utilizzati. Nelle reazioni PCR condotte sul DNA genomico dei trasformanti ottenuti mediante AMT, inizialmente sono stati utilizzati i primer M13_F e M13_R (Tab. 13), disegnati vicino ai bordi del T-DNA e comuni a tutti i vettori derivanti dal pPZP-201BK utilizzati in questo lavoro (l'esatta posizione dei primer M13_F e M13_R sui vettori binari è indicata nelle figure 16 - 19). In analisi PCR successive, invece, sono state utilizzate coppie di primer specifiche disegnate nella ORF (primer *inside,* indicati con In) e sul promotore e sul terminatore del gene (primer *outside,* indicati con Out) dei geni *marker* che conferiscono la resistenza ad antibiotici (Tab. 13). Per il gene che codifica per la proteina fluorescente GFP invece, sono stati disegnati solo primer all'interno della ORF. L'esatta posizione dei primer *inside* e *outside* sui vettori binari è riportata nelle figure 16 – 19. Per le analisi sono stati impiegati circa 100 ng di DNA genomico e circa 10-50 ng di DNA plasmidico. Le concentrazioni dei singoli componenti utilizzati nelle reazioni PCR basate sul protocollo fornito dalla casa produttrice del Kit impiegato (Taq DNA Polymerase, recombinant-Invitrogen; ExTaq polymerase, Taqara.), sono le stesse per tutte le reazioni PCR condotte in questo lavoro di tesi (Tab. 5).

Tabella 5: Concentrazione finale dei reagenti utilizzati per le PCR	
Reagenti	**Conc. finale**
10X PCR Buffer	1X
$MgCl_2$	1.5 mM
dNTP	0.2 mM
Primer F-R	0.4 µM
Taq Polymerase	0,05 U
DNA genomico	100-150 ng
H_20	Fino a 20 o 50 µl

Le reazioni sono state condotte in 20 µl per verificare la semplice analisi dei prodotti di amplificazione o in 50 µl per produrre una quantità di amplificato sufficiente per ulteriori analisi (sequenziamento, clonaggio, ecc.). L'esito delle reazioni PCR è stato visualizzato mediante elettroforesi su gel d'agarosio (1% p/v).

Una denaturazione iniziale di 5 min a 95°C, una denaturazione di 30 sec a 95°C, un *annealing* di 30 sec a 55°C e una *final extension* di 7 min a 72°C sono le condizioni comuni utilizzate per analizzare i putativi trasformanti ottenuti con i vettori pPZP-HYG2, pPZP-NEO1, pPZP-NATcc e pPZP-GFP-NATcc; ciò che varia è la durata della fase di *extension* che è in stretta correlazione con la lunghezza dei prodotti di amplificazione attesi. Di conseguenza, per prodotti di amplificazione attesi maggiori di 2200 bp (primer M13_F e M13_R) (Tab. 6) è stata utilizzata una *extension* di 2 min a 72°C, per prodotti attesi di circa 1500 bp (primer *outside*) (Tab. 7) è stata utilizzata una *extension* di 1 min e 30 sec e infine, per prodotti attesi di circa 600 bp (primer *inside*) è stata utilizzata una *extension* di 45 sec (Tab. 8).

Tabella 6: Condizioni PCR utilizzate per i primer *M13_F-R*		
STEP	**TEMPERATURA**	**DURATA**
Denat. iniziale	95°C	5 min
Denaturazione	95°C	30 sec
Annealing	55°C	30 sec
Estensione	72°C	2 min
Est. finale	72°C	7 min
Numero di cicli 35		

Tabella7: Condizioni PCR utilizzate per i primer *Outside*		
STEP	**TEMPERATURA**	**DURATA**
Denat. iniziale	95°C	5 min
Denaturazione	95°C	30 sec
Annealing	55°C	30 sec
Estensione	72°C	1 min 30 sec
Est. finale	72°C	7 min
Numero di cicli 35		

Tabella 8: Condizioni PCR utilizzate per i primer *Inside*		
STEP	**TEMPERATURA**	**DURATA**
Denat. iniziale	95°C	5 min
Denaturazione	95°C	30 sec
Annealing	55°C	30 sec
Estensione	72°C	45 sec
Est. finale	72°C	7 min
Numero di cicli 35		

7.3.6.3 - Analisi *Southern blot*

Per accertare l'avvenuta integrazione del T-DNA nel genoma ospite e il numero di inserzioni di T-DNA, sono stati effettuati una serie di *Southern blot* secondo la procedura riportata da Sambrook *et al.,* 1989. Data l'assenza di prodotti di amplificazione nelle reazioni PCR per i putativi trasformanti di LS11 ottenuti con il vettore pPZP-NATcc (par. 8.1.4.1 pag. 92; Fig. 21), sono stati condotte analisi *Southern blot* sul DNA genomico di putativi trasformanti ottenuti con gli altri vettori utilizzati, pPZP-NEO1, pPZP-HYG2, pPZP-GFP-NATcc e pPZP-Hxk2.GFP-NATcc. Per i putativi trasformanti ottenuti col vettore pPZP-HYG2, il DNA genomico è stato digerito con l'enzima di restrizione ClaI (che non taglia nella sequenza del T-DNA) (Fig 16); l'enzima EcoRI, che taglia ai bordi del T-DNA (Fig. 17), è stato utilizzato solo per i putativi trasformanti ottenuti con il vettore pPZP-NEO1. Per i putativi trasformanti ottenuti con i vettori pPZP-GFP-NATcc e pPZP-Hxk2.GFP-NATcc invece, il DNA genomico è stato digerito con l'enzima di restrizione EcoRV (che taglia in tre diversi punti all'interno del T-DNA: nell'istone H3 del gene codificante per la proteina fluorescente GFP, tra il terminatore H3 dello stesso gene e il promotore ACT1 e nel gene NAT, Fig. 19). Sono stati utilizzati enzimi di restrizione forniti

dalla Invitrogen, Fermentas, Promega e New England Biolabs (NEB). Quantità variabili da 2 a 5 μg di DNA genomico sono state digerite ON a 37°C con 5-20 unità (U) di enzima di restrizione (1 μl) in presenza del *buffer* appropriato per l'enzima utilizzato, quindi separati mediante elettroforesi sul gel d'agarosio 0,8% (p/v) e infine trasferiti ON per capillarità su membrana di nylon carica positivamente in presenza del buffer di trasferimento SSC 10X (l'SSC 1X è costituito da una soluzione tamponata a pH 7.0 di NaCl 0.14 M e citrato di sodio 0.01 M). Le membrane quindi sono state esposte ai raggi UV [Energy: 1200 (x100 $\mu J/cm^2$)] e mantenute a 4°C fino alle successive fasi di marcatura della sonda, ibridazione e sviluppo. Come sonda per i *Southern blot* è stato utilizzato il frammento ottenuto mediante PCR con i primer M13_F e M13_R dal vettore utilizzato per la trasformazione. Per la marcatura della sonda sono stati utilizzati due differenti metodi, uno "freddo" che prevede l'utilizzo di una fosfatasi alcalina e uno "caldo" che prevede l'utilizzo del fosforo radioattivo 32 (^{32}P-dCTP).

Nel metodo "freddo" la sonda molecolare è stata marcata con una tecnica che non prevede l'utilizzo di materiale radioattivo, ma di una fosfatasi alcalina termostabile del kit fornito dalla Gene Images™ AlkPhos Direct™. Per tutte le fasi (marcatura della sonda, ibridazione, lavaggi post-ibridazione e sviluppo della lastra) è stato seguito il protocollo fornito dalla ditta produttrice. Per la marcatura e l'ibridazione sono stati utilizzati i reagenti forniti con il kit; le soluzioni per i lavaggi post-ibridazione sono state preparate utilizzando reagenti Sigma. Il volume di buffer di ibridazione da utilizzare e la quantità di sonda per ml di buffer sono stati calcolati in base all'area della membrana di nylon: 0,125 ml di buffer per cm^2 di membrana e 5-10 ng di DNA sonda (diluito ad una concentrazione iniziale di 10 ng/μl) per ml di buffer. Il DNA sonda è stato denaturato per 5 min e successivamente raffreddato in ghiaccio. Dopo una breve centrifugazione sono state aggiunti, in relazione alla quantità di sonda utilizzata, *reaction buffer*, *labelling reagent* [contenente 0,1% (p/v) di sodio azide] e *cross-linker working solution* [contenente 4,7% (p/v) di formaldeide]. La miscela di reazione è stata incubata per 15 min a 37°C durante i quali la formaldeide lega covalentemente una fosfatasi alcalina termostabile alla sonda di DNA. Al termine, la miscela di reazione è stata aggiunta in tubi di ibridazione contenenti la membrana di nylon (Zeta-Probe e GE Heathcare) pre-ibridata per circa un'ora nel buffer di ibridazione (contenente 0.5 M di cloruro di sodio e 4% (p/v) di *blocking reagent*) pre-riscaldato alla stessa temperatura di ibridazione (65°C). La scelta della temperatura di ibridazione è stata effettuata sulla base dei risultati ottenuti in esperimenti precedenti. In generale, utilizzando temperature di 55°C c'è la tendenza ad ottenere ibridazioni aspecifiche e le lastre

presentano un elevato *background* di fondo; al contrario, utilizzando temperature di 70°C si ottengono bande di ibridazioni molto deboli dovute alla elevata stringenza della reazione di ibridazione. La temperatura di 65°C si è dimostrata quella più opportuna per avere un segnale di ibridazione specifico e allo stesso tempo lastre con basso *background*. Dopo l'ibridazione condotta ON, le membrane sono state lavate per due volte a 70°C con diverse quantità (2-5 ml per cm^2 di membrana) di *primary wash buffer* pH 7 [(urea 2 M, 0,1% (p/v) di SDS, NaH_2PO_4 (pH 7) 50 mM, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1mM, 0,2 % (p/v) di *blocking reagent*)] pre-riscaldato alla stessa temperatura. Anche per i lavaggi post-ibridazione la temperatura da utilizzare è stata decisa sulla base dei risultati ottenuti in esperimenti precedenti. Successivamente, le membrane sono state lavate due volte con *secondary wash buffer* pH 10 (Tris base 1M e NaCl 2M) a RT ed a esse è stato poi aggiunto il substrato chemiluminescente *CDP-Star detection reagent* (30 - 40 µl per cm^2 di membrana) per una incubazione di 3-5 minuti.

Al termine, le membrane, avvolte in pellicola trasparente, sono state messe per circa 1 h in cassette per esposizione a contatto con una lastra per autoradiografia (Hyperfilm ECL). L'avvenuta ibridazione è rivelata dalla defosforilazione enzimatica del substrato chemioluminescente diossietano ad opera della fosfatasi alcalina legata covalentemente alla sonda, che genera un il segnale luminoso in grado di impressionare la lastra autoradiografica. Lo sviluppo della lastra rivela i risultati dell'avvenuta ibridazione.

Per la marcatura della sonda con fosforo radioattivo ^{32}P-dCTP è stato seguito il protocollo raccomandato dalla casa fornitrice del kit Amersham Rediprime™ II DNA Labeling System (Amersham) leggermente modificato. Circa 20 ng di DNA sonda, diluiti in tampone TE fino a raggiungere un volume finale di 47,5 µl, sono stati denaturati a 95°C per 5 min e raffreddati in ghiaccio; 2,5 µl di fosforo radioattivo ^{32}P-dCTP (25 µCi) sono stati aggiunti alla sonda denaturata e il tutto è stato trasferito nella "provetta di marcatura" (*labeling reaction*) fornita dal kit contenente i reagenti necessari per la l'incorporazione del ^{32}P nella sonda (soluzione tamponata di dATP, dGTP e dTT, enzima di Klenow *esonuclease-free* e *random primers* in forma stabile). Dopo una prima incubazione a 37°C per 15 min e una seconda a 95°C per 5 min, la miscela di reazione è stata aggiunta in tubi di ibridazione contenenti la membrana di nylon (Zeta-Probe) pre-ibridata per circa un'ora a 65°C in 10-15 ml di tampone di ibridazione "Church buffer modificato" [Na_2HPO_4 0,36M, NaH_2PO_4 0,14M, EDTA 1mM, 7% (p/v) di SDS (Church and Gilbert, 1984)]. Dopo ibridazione ON a 65°C, le membrane sono state sciacquate con una soluzione 2X SSC/0,5% (p/v) SDS e lavate a 65°C per 2 volte (15 min per ogni lavaggio) in presenza di

15-20 ml di una soluzione 0,5X SSC/0,5% (p/v) SDS. Tutte le soluzioni, compreso il tampone di ibridazione, sono state riscaldate a 65°C prima dell'utilizzo. A questo punto le membrane, avvolte in pellicola trasparente, sono state messe in cassette per esposizione a contatto con film per autoradiografia per tempi variabili dipendenti dalla radioattività rilevata sulla membrana mediante contatore Geiger [da esposizioni di 2 - 4 ore a RT per membrane con segnale forte a esposizioni di 2 o 3 giorni a -80°C in presenza di un intensificatore di segnale (*intensifying screen*)]. Infine le lastre sono state sviluppate nell'autoprocessore Konica SRX-101A.

7.3.6.4 - Analisi *inverse* PCR dei putativi trasformanti selezionati

Parallelamente ai *Southern blot*, sono state effettuate una serie di *inverse* PCR (par. 5.3.1) come ulteriore conferma dell'integrazione del T-DNA nel genoma ospite. Due-cinque µg di DNA genomico di alcuni putativi trasformanti selezionati a *random* tra quelli ottenuti col vettore pPZP-HYG2 sono stati digeriti ON a 37°C con BglII e con ClaI (che non tagliano nel T-DNA; Fig. 16) e successivamente purificati con il kit QIAquick (Qiagen); 8,5 µl di DNA genomico digerito e purificato sono stati ligati ON a 4°C con 0,5 µl di T4 Ligase in presenza di 1 µl dell'apposito tampone (NEB). Un µl di reazione di ligazione è stato utilizzato direttamente come templato per la *inverse* PCR. Per le reazioni di amplificazione sono stati disegnati dei primer (invHYG_F e invHYG_R) (Tab. 13) complementari a porzioni del T-DNA comprendenti al gene marker *HPH* che, sulla base delle PCR precedentemente condotte utilizzando i primer M13_F e M13_R (dati non mostrati) e i primer specifici inHYG_F e inHYG_R (par. 8.1.4.1, pag.93; Fig.23 A, B), era presumibilmente integrata nel genoma di LS11.
Nella tabella seguente si riportano le condizioni di amplificazione utilizzate (Tab. 9).

Tabella 9: Condizioni di amplificazione utllizzate per la *Inverse PCR*

STEP	TEMPERATURA	TEMPO
Denat. iniziale	94°C	2 min
Denaturazione	94°C	15 sec
Annealing	55°C	15 sec
Estensione	72°C	2 min 30 sec
Est. finale	72°C	7 min
Numero di cicli 35		

La miscela di ogni singola reazione è stata separata mediante elettroforesi su gel d'agarosio 1% (p/v) e le bande di interesse sono state rimosse dal gel con l'ausilio di un bisturi e purificate secondo il protocollo QIAquick II (Qiagen). I prodotti purificati sono stati quindi sequenziati presso l'Uppsala Genome Center (Svezia).

7.3.6.5 - Analisi microscopica dell'espressione della GFP *(Green Fluorescent Protein)*

Per accertare a livello fenotipico l'avvenuta trasformazione di *R. Kratochvilovae* LS11 coi vettori binari pPZP-GFP-NATcc e pPZP-Hxk2.GFP-NATcc contenenti il gene codificante per la GFP, cellule di 2-3 giorni di putativi trasformanti di *R. kratochvilovae* LS11 sono state osservate al microscopio ottico e allo stereoscopio utilizzando filtri con eccitazione a 480/40 nm ed emissione a 527/30 nm. Come controllo positivo sono stati utilizzati trasformanti di *C. neoformans* JEC 21 ottenuti durante lo stesso esperimento di trasformazione con gli stessi vettori, mentre come controllo negativo sono stati utilizzati i ceppi WT non trasformati.

7.4 - Saggi di degradazione della patulina da parte di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481

Data la mancanza di metodi efficaci per mutagenizzare *R. kratochvilovae* LS11 (par. 8.1.4; Fig. 21- 25), si è reso necessario individuare altri lieviti rosa filogeneticamente correlati al genere *Rhodosporidium* capaci di degradare la patulina secondo lo stesso *pathway* metabolico recentemente confermato per LS11 (dati non pubblicati). Dopo una serie di *screening* preliminari per la degradazione della patulina utilizzando ceppi appartenenti ai generi *Rhodosporidium* e *Sporobolomyces* (dati non mostrati), è stato scelto il ceppo "tipo" del genere *Sporobolomyces*, *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 di cui è disponibile una bozza della sequenza completa del genoma (http://genome.jgi-psf.org/Sporo1/Sporo1.home.html).

Sono stati effettuati diversi saggi di degradazione della patulina a concentrazioni di 50 e 100 µg/ml sia in piastre a 96 pozzetti con 100 µl di substrato per ogni pozzetto, sia in tubi Falcon da 15 ml contenenti 2 ml di Lilly-Barnett; inoltre, per analizzare l'effetto di una diversa concentrazione iniziale di cellule, i microrganismi sono stati inoculati in modo non quantitativo con uno stuzzicadenti sterile sia ad una concentrazione iniziale di 2×10^6 UFC/ml. L'inoculazione dei microrganismi mediante stuzzicadenti sterile è un metodo rapido e utile per lo *screening* di un gran numero di campioni; di contro però, non essendo nota la concentrazione iniziale delle cellule che si inoculano, può portare risultati differenti tra repliche dello stesso esperimento. Tuttavia, dato che questa procedura è stata utilizzata nella successiva fase di *screening* dei mutanti inserzionali generati, si è deciso di mostrare la cinetica di degradazione della patulina da parte del ceppo WT di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 inoculato mediante stuzzicadenti sterile in tubi Falcon contenenti 100 µg/ml di questa micotossina solubilizzata in 2 ml di Lilly-Barnett; sulla base dei risultati ottenuti in

questo esperimento, sono state stabilite le modalità di esecuzione (i.e. analisi dei filtrati colturali) delle successive prove di degradazione della patulina da parte mutanti inserzionali. In tutti gli esperimenti condotti, il ceppo LS11 è stato utilizzato sia come controllo positivo della degradazione sia per accertare che i prodotti di degradazione della patulina prodotti da *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 corrispondessero a quelli prodotti dal ceppo LS11 di *R. kratochvilovae.*

In dettaglio, un volume di *stock solution* di patulina opportunamente calcolato è stato portato a secco sotto un flusso di azoto e risospeso alla concentrazione desiderata (100 µg/ml) direttamente in Lilly-Barnett. La soluzione è stata sterilizzata mediante filtri da 0,22 µm e successivamente è stato aggiunto mediante stuzzicadenti sterile del pellet cellulare di *R. kratochvilovae* LS11 o di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 prelevati da capsule Petri di 3 giorni. Come controlli i microrganismi sono stati inoculati e allevati nelle stesse condizioni in Lilly-Barnett privo di patulina, ed è stata valutata anche la stabilità della sola micotossina incubata in assenza dei microrganismi nello stesso terreno colturale. L'incubazione è stata condotta su agitatore rotante a 24°C e 200 rpm.

La crescita dei due microrganismi è stata monitorata prelevando giornalmente 300 µl di coltura (3 aliquote da 100 µl) da ogni campione per la lettura spettrofotometrica della densità ottica (595 nm) al *microplate reader"* (Lopez-Garcia *et al*., 2000). I risultati sono stati espressi come UFC/ml mediante confronto delle medie delle O.D. misurate con le curve standard precedentemente calcolate per i due lieviti. Gli stessi 300 µl di coltura sono stati utilizzati per le successive fasi di analisi cromatografiche mediante analisi TLC (*Thin Layer Chromatography* come segue: 150 µl sono stati estratti due volte con lo stesso volume di acetato d etile (pH 2), portati a secco, rispospesi in 10 µl di acetato di etile e caricati su una lastra TLC in gel di silice con indicatore di fluorescenza (F_{254}, Merck). La lastra quindi, è stata posta in una *tank* contenente la fase mobile toluene, acetato di etile e acido formico 5:4:1 (v/v/v). A fine corsa la lastra è stata asciugata sotto flusso di aria calda e osservata sotto luce UV per verificare la presenza degli *spot* della patulina e/o dei metaboliti. Per tutti gli spot rilevati è stato calcolato l'Rf [fattore di ritenzione (*retention factor*)] che è dato dal rapporto tra dr/dm (dr = distanza percorsa dallo spot dalla linea di caricamento dei campioni; dm = distanza compresa tra la linea di caricamento dei campioni ed il fronte del solvente). Per l'analisi HPLC (*High-performance liquid chromatography*), i restanti 150 µl sono stati filtrati con filtri da 0,22 µm per eliminare le cellule e i campioni cosi ottenuti sono stati utilizzati per l'analisi cromatografica, effettuata apportando lievi variazioni ai protocolli riportati in bibliografia (MacDonald *et al*., 2000; Shephard e

Leggott, 2000; AOAC, 2000). Apparato analitico Kontron 325 costituito da pompa "system 325", "detector UV 335" settato a 276 nm e da "autocampionatore 360" con *loop* da 20 µl; colonna Zorbax Eclipse XDB C18 analytical 250 x 4.6 mm con diametro interno di 5 µm; fase mobile H_20 (acidulata con 1% di acido acetico) e metanolo 95:5 (v/v); flusso 1 ml al minuto.

Prima dell'analisi dei campioni è stata elaborata una retta di taratura iniettando in colonna standard di patulina e DPA a diverse concentrazioni (100, 50, 20 e 5 µg/ml), comprese nell'intervallo di linearità di risposta dello strumento. Per la micotossina, le soluzioni standard sono state preparate a partire da una *stock solution* di 2000 µg/ml di patulina commerciale acquistata dalla A.G. Scientific (par. 7.2) solubilizzata in acetato di etile. Il DPA invece, non essendo reperibile in commercio, è stato ottenuto mediante estrazione con acetato di etile e purificazione su colonna di silice direttamente da colture di LS11 incubato in presenza di patulina; successivamente è stato solubilizzato in acetato di etile (2000 µg/ml) e mediante opportune diluizioni sono stati ottenuti gli standard alle concentrazioni desiderate

I campioni quindi, sono stati posti nell'autocampionatore per l'analisi.

7.5 - Trasformazione mediata da *A. tumefaciens* degli auxotrofi *ura* di *Sporobolomyces* sp IAM 13481 e *R. kratochvilovae* LS11

7.5.1 – Cenni introduttivi sull'auxotrofia per l'uracile

La necessità di utilizzare metodi di trasformazione diversi da quelli basati sull'utilizzo di *marker* codificanti la resistenza agli antibiotici, è emersa in seguito alla capacità dei lieviti LS11 e *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 di manifestare resistenza spontanea agli antibiotici igromicina, neomicina G418 e nurseotricina (Ianiri *et al.,* inviato per la pubblicazione). Si è passati quindi alla scelta di un sistema di trasformazione e selezione basato sull'auxotrofia per l'uracile.

In breve, l'auxotrofia per l'uracile è data dall'assenza di una copia funzionale dei geni *URA3* e/o *URA5* i quali codificano per enzimi coinvolti nella biosintesi delle pirimidine. Il gene *URA5,* utilizzato in questa tesi come *marker* selettivo negli esperimenti di mutagenesi inserzionale e mutagenesi mirata, codifica per l'orotato fosforibolsiltrasferasi, enzima che catalizza la conversione dell'acido orotico in orotidina 5-monofosfato, quinta reazione della *pathway* metabolico delle pirimidine (Mondon *et al*., 2000).

Nei funghi prototrofi per l'uracile, in cui la via biosintetica delle pirimidine è funzionale, l'orotato fosforibolsiltrasferasi metabolizza il composto acido 5-fluoroorotico (5-FOA), analogo strutturale dell'acido diidroorotico (DHO) [precursore dell'acido orotico (OA)], formando 5-fluorouracile, composto tossico per le cellule. Di conseguenza, funghi aventi il gene *URA5* funzionale (prototrofi per l'uracile, *URA*) non possono crescere in terreni contenenti 5-FOA poiché muoiono per la sintesi del 5-fluorouracile. Funghi aventi tale gene disattivo (auxotrofi per l'uracile, *ura*) invece, possono crescere in presenza di 5-FOA ma necessitano di uracile; in mancanza di esso non riescono a svilupparsi. Per queste ragioni terreni contenenti 5-FOA e uracile sono utilizzati per la selezione di mutanti spontanei *ura5*; di contro, terreni privi di uracile possono essere utilizzati per le selezione di prototrofi *URA* generati in seguito a trasformazione di organismi originariamente auxotrofi con un gene *URA5* funzionale. Il gene *URA5* si può perciò impiegare come *marker* selettivo in ceppi ospiti che siano auxotrofi per l'uracile (Mondon *et al*., 2000; Ianiri *et al.,* inviato per la pubblicazione)

7.5.2 - Generazione e caratterizzazione di auxotrofi *ura* di *Sporobolomyces* sp IAM 13481

Auxotrofi *ura* di *Sporobolomyces* sp IAM 13481 sono stati selezionati come descritto da Ianiri *et al.*(in preparazione). Singole colonie di *Sporobolomyces* sp IAM 13481 isolate da terreno agarizzato YPD sono state inoculate in 2 ml di YPD per crescita ON su agitatore rotante a 25°C. Successivamente le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione, risospese in acqua distillata sterile e 200 µl di questa sospensione cellulare sono stati dispersi su terreno agarizzato YNB (6,7 g/L di yeast nitrogen base senza amminoacidi, 20 g/L di glucosio, 20g/L di agar) contenente 5-FOA (1 g/L) e uracile (20 mg/L) per la selezione degli auxotrofi spontanei *ura*. La stabilità delle colonie ottenute è stata verificata mediante trasferimento in YPD liquido per 4 giorni, e successivo piastramento di un'aliquota su terreno minimo YNB agarizzato che essendo privo di uracile permette solo la crescita di organismi prototrofi. Tutti i putativi auxotrofi che dopo la crescita in terreno non selettivo YPD erano in grado di svilupparsi su YNB sono stati scartati in quanto il fenotipo *ura* precedentemente osservato non era stato conservato. Per gli auxotrofi risultati stabili invece, mantenuti su 5-FOA, si è proceduto alla caratterizzazione delle mutazioni nel gene *URA5* mediante sequenziamento. A tal fine i ceppi auxotrofi e il ceppo WT sono stati allevati ON in YPD liquido e si è proceduto all'estrazione del DNA come descritto nel paragrafo 7.3.5.1.

Il gene *URA5* di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 è stato identificato sul *database* http://genome.jgi-psf.org/Sporo1/Sporo1.home.html usando come sequenza *query* l'omologo *URA5* di *S. cerevisiae.* Primer specifici per *URA5* (ALID0562 - ALID0564) (Tab. 13) sono stati utilizzati per ottenere dal DNA genomico di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 e dagli auxotrofi *ura* da esso derivati il corrispettivo gene mediante amplificazione PCR secondo le condizioni riportate in tabella 10. I prodotti PCR sono stati visualizzati su gel d'agarosio (1% p/v), rimossi mediante l'ausilio di un bisturi e eluiti utilizzando il kit QIAquick (Qiagen). Il sequenziamento è stato effettuato presso il centro "DNA Core Facility" dell'*University of Missouri, Columbia.* Per il sequenziamento sono stati utilizzati i *primer* ALID0562 e ALID0564, e il primer interno al gene *URA5* ALID0563 (Tab 13; Fig 28 A). Le sequenze ottenute sono state confrontate con quella del ceppo WT utilizzando il programma Sequencer 4.2, che ha consentito di verificare la natura della mutazione.

Tabella 10: Condizioni di amplificazione utllizzate per l'amplificazione del gene *URA5*		
STEP	**TEMPERATURA**	**TEMPO**
Denat. iniziale	94°C	2 min
Denaturazione	94°C	15 sec
Annealing	55°C	15 sec
Estensione	72°C	1 min 30 sec
Est. finale	72°C	7 min
Numero di cicli 35		

Oltre che per gli auxotrofi stabili di *Sporobolomyces* sp IAM 13481, nello stesso modo si è cercato di individuare la natura delle mutazioni nell'auxotrofo *ura5* Rgpo1 di *R. kratochvilovae* LS11 isolato in esperimenti precedenti a questo lavoro di tesi (dati non pubblicati). Poiché con la combinazione ALID0562-ALID0564 non è stato possibile ottenere alcun prodotto di amplificazione corrispondente al gene *URA5* compreso di promotore, è stata sequenziata solo la ORF del gene ottenuta con i primer ALID0563-ALID0564. Come confronto è stata utilizzata la sequenza del gene *URA5* dell'organismo WT ottenuto utilizzando la stessa combinazione di primer.

7.5.3 - Costruzione del vettore binario pPZP-URA5

Per la trasformazione dell'auxotrofo AIS2 *ura5* di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 e dell'auxotrofo Rgpo1 di *R. kratochvilovae* LS11, è stato utilizzato il gene *URA5* dello stesso *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 clonato nel T-DNA del vettore binario pPZP-201BK (Covert *et al.,* 2001).

Il clonaggio è riportato di seguito. Il gene *URA5* di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481, ottenuto mediante PCR come descritto precedentemente (par. 7.5.2), è stato clonato in pCR2.1 TOPO (Invitrogen) per formare il vettore TOPO-URA5. Per il clonaggio è stato seguito il protocollo indicato dalla ditta fornitrice: incubazione a RT per 5 min di 6 µl di miscela di reazione composta da 4,5 µl di prodotto PCR (gene *URA5*), 1 µl di soluzione salina fornita con il kit e 0,5 µl di *TOPO vector;* aggiunta di 2 µl della miscela di reazione a cellule competenti di *E. coli* (ceppo Top10) e incubazione per 30 min in ghiaccio. Al termine i campioni sono stati posti in bagnetto termostatato per 30 secondi a 42°C (*heat-shock*) e successivamente trasferiti in 250 µl di SOC *medium* (2% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 10 mM di NaCl, 2,5 mM di KCl, 20 mM di $MgSO_4$ e 20 mM glucosio). Dopo circa 1 h di incubazione a 37°C in agitazione a 200 rpm, due diverse aliquote di

miscela di reazione sono state disperse su terreno selettivo pre-riscaldato a 37°C Luria Bertani (Difco) + kanamicina (50 µg/ml) su cui erano stati precedentemente dispersi 40 µl di X-Gal e 40 µl di IPTG (concentrazione finale di 40 µg/ml). Dieci colonie bianche selezionate casualmente sono state poste ON in agitazione a 37°C in Luria Bertani contenente kanamicina (50 µg/ml) e sottoposte a miniprep (kit QIAprep spin, Qiagen) per l'estrazione del DNA plasmidico. Un µg dei plasmidi è stato digerito a 37°C per 2 h con 20 U dell'enzima di restrizione EcoRI (NEB); i vettori recanti l'inserto, identificati dalla presenza di una banda di 1768 bp corrispondente al frammento inserito, sono stati mantenuti a -20°C; un frammento ottenuto dalla digestione con EcoRI è stato utilizzato per la generazione dei vettori da utilizzare per la AMT.

Per la generazione del plasmide pPZP-URA5 (Tab. 12; Fig. 20) da utilizzare per la AMT, il gene *URA5* ottenuto come descritto in precedenza dal vettore TOPO-URA5, è stato tagliato dal gel, purificato mediante kit QIAquick (Qiagen), quindi ligato nel *multi cloning site* (MCS) del pPZP-201BK (Covert *et al.,* 2001) precedentemente digerito a 37°C per 2 h con 20 U di EcoRI e trattato con 1 U di fosfatasi alcalina (Promega). Per la ligazione, condotta ON a 4°C, è stata utilizzata T4 DNA Ligase (NEB). Il vettore è stato trasferito in *E.coli* DH5α mediante trasformazione con *shock* termico e successivamente estratto da una decina di colonie selezionate a caso su Luria Bertani contenente kanamicina (50 µg/ml). Al fine di verificare l'avvenuta integrazione e la corretta direzione dell'inserto (orientamento 5' - 3' tra i bordi destro e sinistro del T-DNA), i plasmidi estratti sono stati digeriti a 37°C per 2 h con 20 U di EcoRI e HindIII, rispettivamente. Circa 1 µg di pPZP-URA5 (pPZP-201BK recante il gene *URA5* correttamente inserito), è stato elettroporato (Gene Pulser II, Biorad) in cellule competenti di *A. tumefaciens* EHA105 come descritto da Sambrook *et al.* (1989) alle seguenti condizioni: 25 µF, 2.0 kV e 200 Ohm. A questo punto le cellule elettroporate sono state trasferite in SOC e incubate per circa 1 h a 28°C; quindi diverse aliquote sono state disperse su piastre Petri con Luria Bertani contenenti 50 µg/ml di Kanamicina dove singole colonie sono state selezionate per essere utilizzate nei successivi esperimenti di AMT.

7.5.4 - Trasformazione mediata da *A. tumefaciens*

Il protocollo di trasformazione mediante *A. tumefaciens* dell'auxotrofo AIS2 *ura5* di *Sporobolomyces* sp IAM 13481 e del putativo auxotrofo Rgpo1 di *R. kratochvilovae* LS11 è lo stesso descritto nel paragrafo 7.3.4. Per la trasformazione è stato utilizzato il ceppo EHA105 di *A. tumefaciens* contenente il vettore binario pPZP-URA5 (Tab. 12; Fig 20).

Dopo 2 e 3 giorni di coincubazione su IM *medium* (100 µM di acetosiringone), i putativi trasformanti prototrofi sono stati selezionati su YNB agarizzato contenente 200 µg/ml di cefotaxime. La stabilità dei putativi trasformanti selezionati a *random* è stata valutata come descritto nel paragrafo 7.3.5; in breve, le colonie sono state fatte sviluppare in terreno non selettivo YPD per quattro giorni e successivamente un'aliquota è stata posta su terreno selettivo YNB agarizzato. Anche in questo caso le colonie in grado di svilupparsi sono state mantenute per le successive analisi, mentre le altre sono state scartate.

7.5.5 - Analisi genetico-molecolare dei trasformanti ottenuti

Prima di saggiare la capacità dei trasformanti di degradare la patulina, è stata verificata l'avvenuta trasformazione mediante PCR e *Southern blot*.

L'estrazione del DNA è stata condotta come descritto nel paragrafo 7.3.6.1. Per l'analisi PCR dei trasformanti prototrofi generati a partire dall'auxotrofo AIS2, sono stati utilizzati i primer ALID0562 e ALID0564 (Tab 13), utilizzati per ottenere il gene *URA5* di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (par. 7.5.2; Tab. 10) e impiegati con lo scopo di accertare eventuali fenomeni di ricombinazione omologa tra il gene nativo *URA5* mutato (*ura5*) e il gene *URA5* introdotto con la trasformazione, e i primer M13_F e M13_R, propri dei vettori binari creati a partire dal pPZP-201BK e già utilizzati per l'analisi PCR dei putativi trasformanti di LS11 (par. 7.3.6.2; Tab 6). In figura 20 è riportata la posizione dei primer utilizzati sul vettore binario pPZP-URA5.

Le stesse combinazioni di primer (ALID0562-ALID0564, M13_F e M13_R) sono state utilizzate anche per l'analisi PCR dei prototrofi derivati da Rgpo1; in più, impiegando le stesse condizioni riportate per l'amplificazione del gene *URA5* (par. 7.5.2; Tab. 10), è stata utilizzata anche la combinazioni di primer ALID0563-ALID0564 (Tab.13) poiché con le combinazioni indicate in precedenza non era stato ottenuto alcun prodotto di amplificazione.

L'analisi *Southern blot*, condotta allo scopo di confermare i risultati ottenuti nelle PCR e conoscere il numero di inserzioni del T-DNA, è stata effettuata come descritto nel paragrafo 7.3.6.3. I DNA genomici sono stati digeriti con l'enzima di restrizione ClaI (che non taglia nel T-DNA del plasmide pPZP-URA5) e come sonda è stata utilizzata la porzione del T-DNA amplificata dal vettore utilizzando i primer M13_F e M13_R (Tab 6).

7.5.6 - Saggi di degradazione della patulina da parte dei trasformanti prototrofi

Prima di essere testata la loro capacità di degradare la patulina, i trasformanti selezionati su YNB agarizzato contenente cefotaxime sono stati trasferiti su terreno YPD agar. Questo passaggio si è reso necessario perché è stato osservato che se prima del biosaggio le cellule dei trasformanti vengono prelevate da terreno con antibiotico, si incontrano problemi nella fase finale di *screening* in quanto, nell'esecuzione del biosaggio, si ottengono aloni di inibizione di *E. coli* DH5α crescita persino maggiori del controllo positivo costituito da sola patulina. Da diversi esperimenti è emerso che questo fenomeno è dovuto all'assorbimento dell'antibiotico da parte delle cellule dei trasformanti e al suo rilascio nel terreno di incubazione (dati non mostrati).

I saggi di degradazione della patulina da parte dei trasformanti di *Sporobolomyces* sp IAM 13481, inoculati mediante stuzzicadenti sterili, sono stati effettuati in piastre da microplate reader a 96 pozzetti poste in statica a 24°C. In ogni esperimento come controllo positivo è stato usato il ceppo IAM 13481 inoculato anch'esso con uno stuzzicadenti sterile in 100 µl di Lilly-Barnett contenente 100 µg/ml di patulina. Dopo 8-9 giorni di incubazione sono stati prelevati i supernatanti mediante centrifugazione delle piastre a 96 pozzetti a 5500 rpm per 15 minuti (Beckman coulter "Allegra™ 25R centrifuge"). La valutazione preliminare della persistenza della patulina in presenza dei diversi trasformanti è stata condotta mediante il saggio biologico descritto da Wright *et al.* (2008) basato sulla diversa sensibilità del batterio *E. coli* DH5α alla patulina e ai prodotti derivanti dalla sua degradazione. La metodica prevede la deposizione di aliquote di 40 µl dei supernatanti ottenuti su uno strato solidificato di Luria Bertani soft agar contenente il batterio *E. Coli* DH5α come indicatore della presenza della micotossina.

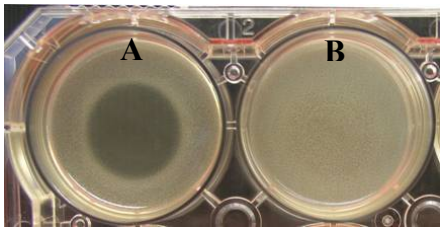


Figura 11: biosaggio basato sulla diversa tossicità di *E. coli* DH5α alla patulina [100 µg/ml (A)] e al DPA prodotto in seguito alla degradazione della micotossina da parte di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (B)

I trasformanti che hanno mostrato una degradazione della micotossina più lenta del ceppo WT sono stati identificati per la presenza di un alone di inibizione di crescita di *E. coli* DH5α causato dalla patulina ancora non degradata presente nel terreno colturale. (Fig. 11). Questi trasformanti sono stati testati nuovamente nelle stesse condizioni e la presenza della micotossina e/o dei prodotti di degradazione nei rispettivi supernatanti è stata analizzata mediante TLC dopo 4, 6 e 9 giorni di incubazione in presenza di 50 e 100 µg/ml di patulina disciolta in Lilly-Barnett. Come dato comparativo, è stata anche monitorata la

crescita dei trasformanti in terreno minimo Lilly Barnett e in terreno ricco YPD, entrambi privi di patulina.

Successivamente, è stata saggiata la capacità di degradazione della patulina (50 e 100 µg/ml) degli stessi trasformanti partendo da una bassa concentrazione iniziale di cellule (2 × 10^6 UFC/ml); l'analisi TLC è stata condotta dopo 6, 10 e 14 giorni di incubazione e anche in questo caso, come dato comparativo, è stata monitorata la crescita in terreno minimo Lilly-Barnett e in terreno ricco YPD privi di patulina. Entrambi gli esperimenti sono stati ripetuti due volte.

I trasformanti risultati più lenti nel degradare la patulina rispetto al ceppo WT, denominati *slower patulin degraders*, sono stati mantenuti permanentemente su terreno selettivo YNB agarizzato e in *stock* al 30% (v/v) di glicerolo per la conservazione a -80°C.

7.5.7 - Caratterizzazione genetico-molecolare dei mutanti *slower patulin degraders*

I trasformanti *slower patulin degraders* sono stati sottoposti ad estrazione del DNA (par. 7.3.6.1) per la caratterizzazione delle inserzioni mediante *inverse* PCR e *Southern blot*.

La procedura utilizzata per i *Southern blot* è la stessa descritta nel paragrafo 7.3.6.3. Il DNA genomico estratto dai ceppi non trasformati (*Sporobolomyces* sp IAM 13481 e auxotrofo AIS2) e da tutti i trasformanti *slower patulin degraders* è stato digerito con ClaI, separato mediante elettroforesi su gel d'agarosio (0,8% p/v) e posto a contatto con la sonda di DNA marcata con fosforo radioattivo P^{32}. Come sonda è stata usata la porzione di T-DNA del pPZP-URA5 ottenuta mediante PCR utilizzando i primer M13_F e M13_R (Tab 6; Figura 20).

Per la *inverse* PCR sono stati inizialmente utilizzati per la digestione dei DNA genomici enzimi che non tagliano nella sequenza del T-DNA (ClaI o NdeI) e per la reazione PCR i primer ai76 e ai77 (Tab. 13). Nei casi in cui non è stata ottenuta alcuna amplificazione, i DNA genomici sono stati digeriti con EcoRI e per la reazione PCR sono state utilizzate due diverse coppie di primer: ai76-M13F e ai77-M13R per ottenere le sequenze al *border* destro e sinistro del T-DNA, rispettivamente. Spesso è stato necessario utilizzare anche altri enzimi di restrizione per l'ottenimento delle inserzioni ai due bordi (BglII, KpnI, NlaIII, TaqaI). Le condizioni di amplificazione sono le stesse riportate in tabella 9. La miscela di ogni singola reazione è stata separata elettroforeticamente su gel d'agarosio 1% (p/v) e le bande di interesse sono state rimosse dal gel con l'ausilio di un bisturi e purificate secondo il protocollo QIAquick II (Qiagen). I prodotti purificati sono

stati quindi sequenziati presso il centro "DNA Core Facility" dell'*University of Missouri, Columbia.*

Nel caso in cui i prodotti di amplificazione ottenuti non erano abbastanza concentrati per la reazione di sequenziamento, si è risaliti al gene fiancheggiante l'inserzione di T-DNA mediante *plasmid rescue* apportando delle variazioni al metodo riportato nel paragrafo introduttivo 5.3.1. I prodotti di amplificazione ottenuti come riportato per la *inverse* PCR, sono stati clonati in pCR2.1 TOPO e inseriti in *E. coli* Top10 come descritto nel paragrafo 7.5.3. I vettori recanti l'inserto, individuati mediante visualizzazione su gel d'agarosio (1% p/v) dopo digestione con EcoRI, sono stati sequenziati utilizzando i primer M13_F e M13_R presso il centro "DNA Core Facility" dell'*University of Missouri, Columbia.*

7.6 - Mutagenesi mirata

In questo lavoro sono state create cassette per la disattivazione del gene *VPS8*, che codifica la proteina vacuolare vps8, del gene *DLH* che codifica per l'enzima diene lattone idrolasi, e del gene *rDLH* che codifica per un enzima con attività idrolitica e classificato nel KOG *database* (*euKaryotic Orthologous Groups*) come "*predicted hydrolase related to dienelactone hydrolase*". Come organismo da trasformare, è stato utilizzato il ceppo AIS2 *ura5* derivato da *Sporobolomyces* sp IAM 13481, caratterizzato da una delezione di 129 basi nel gene URA5 (Fig 28 A, mutazione B1a).

Per il gene *VPS8* è stata valutata l'efficacia di tre diversi metodi per generare le cassette per la disattivazione genica mirata. Il metodo risultato più efficace è stato poi scelto per generare i costrutti per la mutagenesi dei geni *DLH* e *rDHL*.

7.6.1 - Generazione del costrutto per la mutagenesi mirata del gene *VPS8* mediante *overlap* PCR

Il primo metodo utilizzato prevede tre passaggi, ed è basato sulla *overlap* PCR (par. 5.1.1, Fig. 4) (Davidson *et al.*, 2002). Inizialmente, utilizzando le coppie di primer 1.VPS8 - 2.VPS8, 3.VPS8 - 4.VPS8 e ALID0562 - ALID0564 (Tab. 13) sono state effettuate tre diverse PCR per ottenere rispettivamente dal DNA genomico di *Sporobolomyces* sp IAM 13481 la porzione 5' e 3' del gene *VPS8* e il gene *URA5* (Fig. 12, primo step); le condizioni di amplificazione sono riportate in tabella 10. I tre prodotti PCR attesi sono stati rimossi dal gel con l'ausilio di un bisturi e purificati secondo il protocollo QIAquick II (Qiagen). L'*overlap* PCR è stata condotta utilizzando i primer 1.VPS8 - 4.VPS8 e come templato una combinazione di 1, 5 e 10 µl dei tre prodotti eluiti (Fig 12, secondo step). In teoria, come descritto nel paragrafo 5.1.1, la complementarietà di basi tra le regioni chimeriche dei primer 2.VPS8 e 3.VPS8 (porzioni dei primer tratteggiate in figura 12; basi sottolineate in tabella 13) rispettivamente con i primer ALID0562 e ALID0564 permette ai tre singoli frammenti di combinarsi in un unico grande frammento corrispondente al costrutto da utilizzare per la mutagenesi mirata. La reazione di amplificazione, condotta utilizzando le condizioni riportate in tabella 9, non ha permesso di ottenere il costrutto *vps8::URA5* atteso e di conseguenza è stato necessario testare l'applicabilità degli altri due metodi descritto nel paragrafo introduttivo 5.1.1 (i.e. *Double Joint* PCR con *URA5-split marker* e ricombinazione *in vivo* in *S. cerevisiae*).

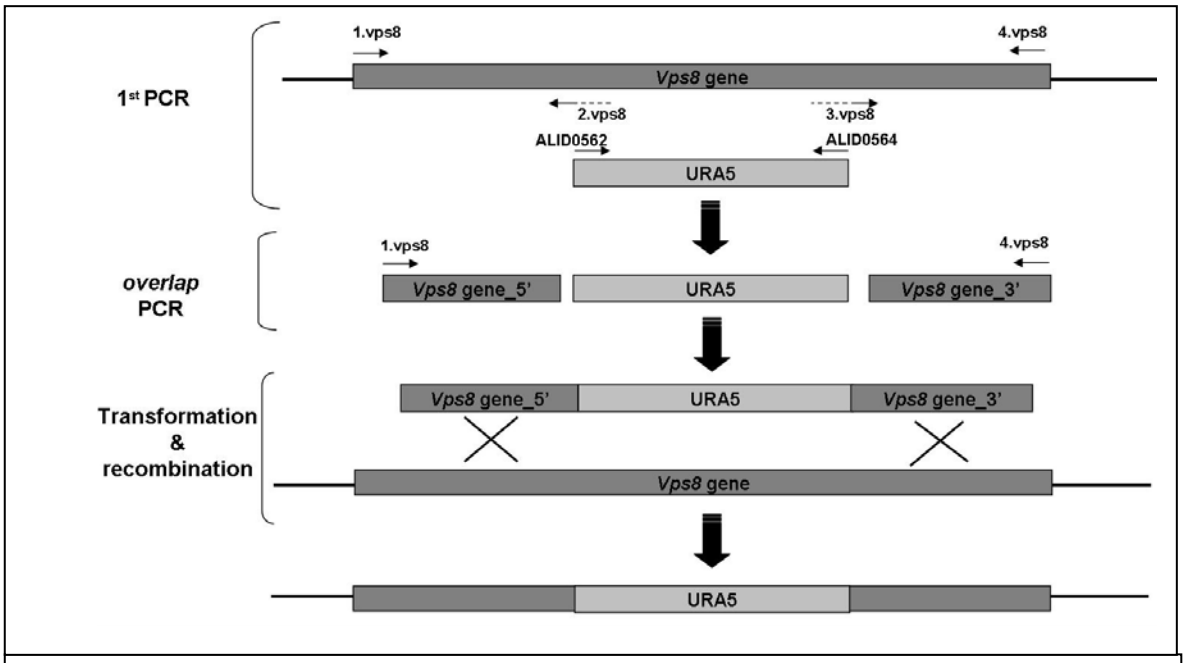


Figura 12: Schema della *overlap* PCR per la mutagenesi mirata del gene *VPS8* dell'auxotrofo *ura5* AIS2 derivato da *Sporobolomyces* sp. IAM 13481. Le reazioni PCR del primo step sono state condotte utilizzando come templato il DNA genomico di *Sporobomolomyces* sp. IAM 13481. Le estremità 5' e 3' del gene *target VPS8* sono state ottenute mediante PCR utilizzando i primer 1.VPS8 - 2.VPS8 e 3.VPS8 - 4.VPS8, rispettivamente; i primer ALID0562 - ALID0564 sono stati utilizzati per amplificare il gene *marker URA5*. I tre prodotti di amplificazione sono stati utilizzati come templato per la *overlap* PCR condotta utilizzando i primer 1.VPS8 - 4.VPS8.
I primer 2.VPS8 e 3.VPS8 presentano delle regioni chimeriche (linee tratteggiate) complementari rispettivamente ai primer ALID0562 e ALID0564. Modificata da Davidson *et al.* (2002).

7.6.2 – Gene replacement del gene *VPS8* utilizzando la *Double Joint PCR con URA5-split marker*

Il secondo metodo testato invece, è chiamato *Double Joint PCR* con *URA5-split marker* ed è stato applicato con successo in diversi funghi filamentosi (Yu *et al.,* 2004) e nel lievito basidiomicete *C. neoformans* (Fu *et al.,* 2006; Kim *et al.,* 2009). Come descritto nel paragrafo 5.1.1 questo metodo, diversamente dal precedente, prevede 2 *round* di PCR e tre eventi di ricombinazione omologa all'interno dell'organismo ospite. Due di questi interessano i frammenti *double joint* 5' e 3' e le regioni complementari del gene *target*, mentre un terzo evento di ricombinazione omologa interessa porzioni complementari del gene *split-marker URA5*. La procedura riportata è la stessa seguita da Kim *et al.* (2009) con qualche leggera variazione.

Come illustrato in figura 13, il *first round* è consistito nella generazione mediante PCR di quattro frammenti differenti, due frammenti (5' e 3') relativi al gene *target VPS8* e due frammenti (5' e 3') relativi al gene *marker URA5.* Per ottenere il frammento 5' e 3' del gene *VPS8* sono state utilizzate le combinazioni di primer 1.VPS8 - 2.VPS8 e 3.VPS8 -

4.VPS8, rispettivamente (Tab. 13); per quando riguarda il gene *URA5* invece, la porzione 5' è stata ottenuta con i primer ALID0562 – DoubleJoint URA5_R (DJ URA5 R), mentre la porzione 3' è stata ottenuta con i primer ALID0563 - ALID0564 (Tab. 13). Le condizioni di amplificazione sono le stesse utilizzate per l'ottenimento del gene *URA5* (Tab. 10). L'avvenuta amplificazione dei quattro frammenti attesi è stata verificata visualizzando 2 µl di ogni singola reazione su gel d'agarosio 1% (p/v). Al fine di ottenere i due frammenti *double joint* 5' e 3'(*second round* PCR), 1, 5 e 10 µl dei due frammenti 5' e dei due frammenti 3' sono stati amplificati separatamente mediante PCR utilizzando i primer 1.VPS8 – DoubleJoint URA5_R (DJ URA5 R) e ALID0563 - 4.VPS8, rispettivamente. Le condizioni di amplificazione sono state le stesse utilizzate per la *inverse* PCR (Tab. 9). L'unione dei due frammenti 5' è permessa grazie alla complementarietà tra la regione chimerica del primer 2.VPS8 (porzione del primer tratteggiata in figura 13; basi sottolineate in tabella 13) con il primer ALID0562; allo stesso modo, l'unione dei due frammenti 3' è permessa grazie alla complementarietà tra la regione chimerica del primer 3.VPS8 (porzione del primer tratteggiata in figura 13; basi sottolineate in tabella 13) con il primer ALID0564.

Dopo aver accertato su gel d'agarosio 1% (p/v). la presenza dei due frammenti *double joint* 5' e 3' attesi, i prodotti delle due miscele di reazione sono stati combinati, purificati utilizzando il kit QIAquick (Qiagen) e 10 µl (corrispondenti circa a 1µg di DNA per ogni frammento *double joint*) sono stati precipitati su microparticelle d'oro per la trasformazione mediante biolistica come descritto in seguito. Nella figura 13 si riporta uno schema dei vari step che caratterizzano la *double joint* PCR con *URA5-split marker*

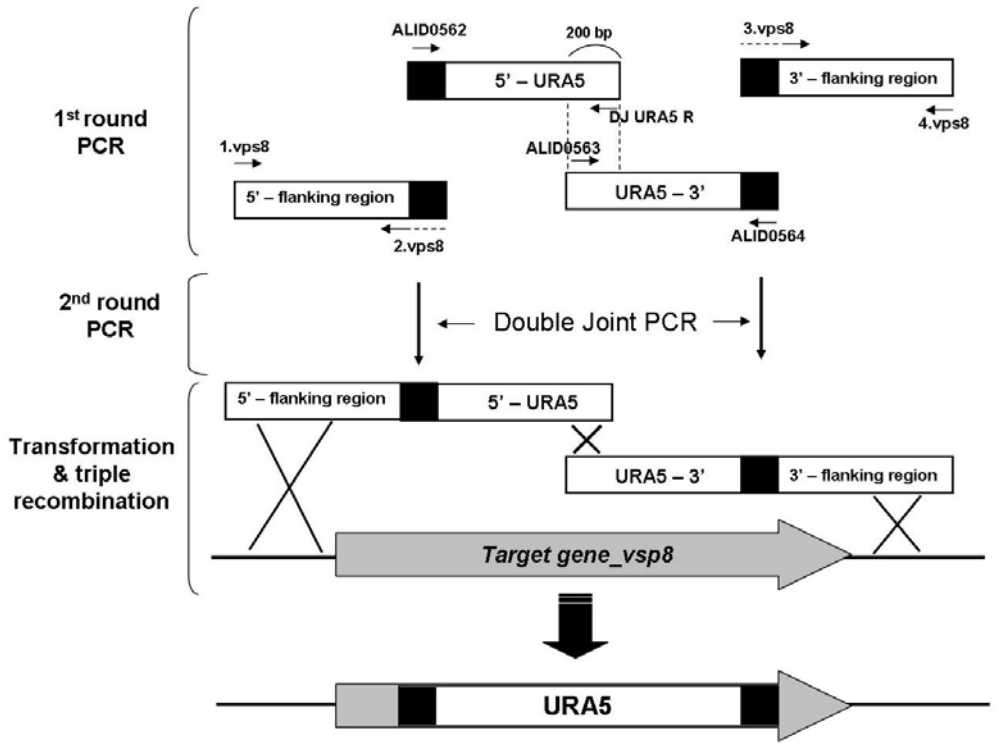


Figura. 13: Schema della *Double Joint* PCR con *URA5-spit marker* per la mutagenesi mirata del gene *VPS8* dell'auxotrofo *ura5* AIS2 derivato da *Sporobolomyces* sp. IAM 13481. Le reazioni PCR del *first round* sono state condotte utilizzando come templato il DNA genomico di *Sporobomolomyces* sp. IAM 13481. Le estremità 5' e 3' del gene *target VPS8* sono state ottenute mediante PCR utilizzando i primer 1.VPS8 - 2.VPS8 e 3.VPS8 - 4.VPS8, rispettivamente; le estremità 5' e 3' del gene *marker URA5* sono state ottenuta utilizzando i primer ALID0562 - DoubleJoint URA5_R (DJ URA5 R) e ALID0563 - ALID0564, rispettivamente. Nel *second round*, per formare il frammento *double joint 5'* le estremità 5' del gene *target VPS8* e del gene *marker URA5* sono state combinate e amplificate utilizzando i primer 1.VPS8 e DoubleJoint_URA5 R; nello stesso modo, per formare il frammento *double joint 3'* le estremità 3' del gene *target VPS8* e del gene *marker URA5* sono state combinate e amplificate utilizzando i primer ALID0563 e 4.VPS8. I due frammenti *double joint* sono stati combinati, purificati e introdotti mediante biolistica nell'auxotrofo AIS2 dove avvengono tre eventi di ricombinazione omologa tra i frammenti *double joint* 5' e 3' e le regioni 5' e 3' del gene *target,* e tra le regioni 5' e 3' del gene *marker URA5.*
I primer 2.VPS8 e 3.VPS8 presentano delle regioni chimeriche (linee tratteggiate) complementari rispettivamente ai primer ALID0562 e ALID0564. Modificata da Kim *et al.* (2009).

La trasformazione è stata effettuata con la tecnica biolistica, utilizzando la "Bio-Rad PDS-1000 He *biolistic particle delivery system*" con dischi di rottura di 1350 psi e microparticelle d'oro di 0,8 micron (Bio-WORLD, Dublin, OH) come descritto per *C. neoformans* da Toffaletti *et al.* (1993). Per la preparazione delle cellule da trasformare, l'auxotrofo AIS2 è stato allevato *overnight* in 25 ml YPD, il pellet cellulare è stato raccolto mediante centrifugazione, risospeso in 1 ml di YPD, e 350 µl sono stati dispersi su terreno

selettivo YNB agarizzato contenente 1 M di sorbitolo. La trasformazione mediante biolistica del microrganismo auxotrofo è stata effettuata circa 15-30 minuti dal piastramento, diversamente dalle trasformazioni effettuate utilizzando geni *marker* codificanti resistenza ad antibiotici che possono essere eseguite anche dopo 3 ore .

Per la precipitazione del DNA sulle microparticelle d'oro, 10 µl di *gold beads* risospese in glicerolo sono state centrifugate a 14000 rpm per 30 sec, il supernatante è stato rimosso e sono stati aggiunti nell'ordine: 10 µl della soluzione contenente il DNA preparato come riportato in precedenza, 10 µl di una soluzione 2,5 M di cloruro di calcio e 2 µl di spermidina 1M *free base* (Sigma). Dopo aver *vortexato* per circa 30 sec, la miscela è stata incubata per 5 min a RT, quindi centrifugata a 14000 rpm per 30 sec ed il supernatante è stato scartato. Al termine, le *gold beads* sono state lavate con 0,5 ml di etanolo al 100%, risospese in 12 µl di etanolo al 100% e caricate su dischi *microcarrier* da 2,5 cm previamente lavati in etanolo al 100%. In camera da vuoto, le piastre contenenti l'auxotrofo AIS2 sono state "bombardate" con microparticelle d'oro guidate da un flusso di elio e successivamente incubate a 25°C fino alla comparsa dei trasformanti.

7.6.3 - Generazione del costrutto per la mutagenesi mirata del gene *VPS8* mediante ricominazione *in vivo* in *Saccharomyces cerevisiae*

Il terzo metodo saggiato è stato pubblicato da Colot *et al.* (2006). A differenza dei precedenti sfrutta l'alta capacità endogena di ricombinazione omologa del lievito *Saccharomyces cerevisiae* dal quale è possibile amplificare la cassetta per la mutagenesi mirata da utilizzare negli esperimenti di trasformazione. I diversi componenti per la trasformazione sono:

- Il ceppo FY834 di *S. cerevisiae* caratterizzato da auxotrofia per istidina, uracile (*ura3*), leucina, lisina e triptofano (*MATα his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63*) (Winston *et al.,* 1995).
- il plasmide pRS426 contenente il gene AMP^r che conferisce la resistenza all'ampicillina per la selezione in *E. coli* DH5α e il gene *URA3* di *S. cerevisiae* come *marker* selettivo per eucarioti; per la trasformazione, il plasmide pRS426 è stato estratto da *E. coli* DH5α mediante miniprep (kit QIAprep spin, Qiagen) e digerito con gli enzimi di restrizione XhoI e EcoRI (NEB);
- le porzioni 5' e 3' del gene *target VPS8* e il gene *marker URA5*, amplificati mediante PCR dal genoma di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481.

Come descritto per l'*overlap* PCR, al fine di ottenere i tre frammenti da utilizzare per la trasformazione di *S. cerevisiae* FY834, utilizzando le coppie di primer 5.VPS8 - 2.VPS8, 3.VPS8 - 6.VPS8 e ALID0562 - ALID0564 (Tab. 13) sono state effettuate tre diverse PCR per ottenere dal genoma di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 i frammenti 5' e 3' del gene *VPS8* e il gene *URA5* utilizzato come *marker* selettivo, rispettivamente. La differenza con l'*overlap* PCR sta nel fatto che ai primer 1.VPS8 e 4.VPS8 sono state aggiunte sequenze chimeriche disegnate sul plasmide pRS426 sul quale avviene la ricombinazione omologa in *S. cerevisiae* FY834 (basi in minuscolo sottolineate in tabella 13). Le condizioni di amplificazione sono le stesse utilizzate per l'ottenimento del gene *URA5* (Tab. 10).

La trasformazione di *S. cerevisiae* FY834 è stata eseguita secondo il protocollo riportato da Sambrook *et al.* (1989) che prevede l'utilizzo di PEG e acetato di litio. Pellet cellulare di *S. cerevisiae* FY834 allevato in YPD fino ad una densità ottica (600 nm) di circa 0,7, è stato raccolto mediante centrifugazione e lavato con 1 ml di acetato di litio 0,1 M in TE buffer (pH 7.5). Dopo un'altra centrifugazione, il pellet è stato risospeso in 50 µl della stessa soluzione e a questa sono stati aggiunti 25 µg di DNA *carrier* (*sheared salmon sperm* DNA, Ambion), 1 µg del plasmide pRS426 digerito con gli enzimi di restrizione XhoI e EcoRI, 2 µl (circa 500 pg) di ognuno dei tre frammenti ottenuti dalle reazioni PCR (porzioni 5' e 3' del gene *target VPS8* e gene *marker URA5*) e 0,3 ml di una soluzione al 40% di PEG preparata in acetato di litio 0,1 M. Dopo 30 min di incubazione a RT, la miscela di reazione è stata posta per 15 minuti in un bagno termostatato a 42°C (*heat shock*), quindi le cellule sono state lavate con acqua distillata sterile, risospese in 100 µl della stessa, disperse su apposito terreno selettivo [YNB contenente leucina (1.0 g/l), triptofano (200 mg/l), istidina (200 mg/l) e lisina (300 mg/l)] e incubate per 3 - 4 giorni a 30°C.

Al termine, da circa 15 - 20 colonie riunite insieme è stato estratto il DNA secondo il protocollo di estrazione rapido riportato da Sambroock *et al.* (1989) con qualche variazione. In breve, pellet cellulare risospeso in 150 µl di buffer di estrazione [NaCl 0,5M, tris-HCl pH 7.5 10mM, EDTA 10mM e 1% SDS (p/v)] in presenza di *glass beads* (425-600 µm di diametro), è stato vortexato per circa 30 sec e quindi posto a -80°C fino a completo congelamento; successivamente è stato scongelato ed è stato nuovamente vortexato e congelato. Dopo esser stati scongelati, i campioni sono stati centrifugati per 10 min a 13000 rpm e il supernatante, trasferito in nuovi tubi eppendorf, è stato precipitato con 100 µl di isopropanolo; dopo un'ulteriore centrifugazione a 13000 rpm per 10 min, il pellet di

DNA è stato lavato con etanolo al 70% e una volta asciugato è stato risospeso in 15 - 20 µl di TE buffer.

Per amplificare il costrutto *gene replacement* da utilizzare per la trasformazione, 2 µl del DNA estratto sono stati utilizzati come templato per la PCR effettuata utilizzando separatamente le diverse combinazioni di *primer* disponibili: 1.VPS8 - 4.VPS8 (comprendenti solo le porzioni del gene *VPS8* prive di quelle del plasmide pRS426), 5.VPS8 - 6.VPS8 (comprendenti sia le porzioni del gene *VPS8* che quelle del plasmide pRS426) e ALID0917 - ALID0918 (comprendenti solo le regioni del plasmide pRS426) (Tab. 13). Le condizioni di amplificazione sono state le stesse utilizzate per la *inverse* PCR (Tab. 9). In figura 14 si riporta uno schema delle vari fasi del processo di creazione della cassetta per la mutagenesi mirata. I prodotti ottenuti con la combinazione di primer ALID0917 - ALID0918, la più efficiente tra le tre utilizzate, sono stati visualizzati su gel d'agarosio 1% (p/v) utilizzando il kit QIAquick (Qiagen), concentrati con etanolo e precipitati su microparticelle d'oro per la trasformazione biolistica come descritto per la *Double Joint* PCR con *URA5-split marker* (par 7.6.2).

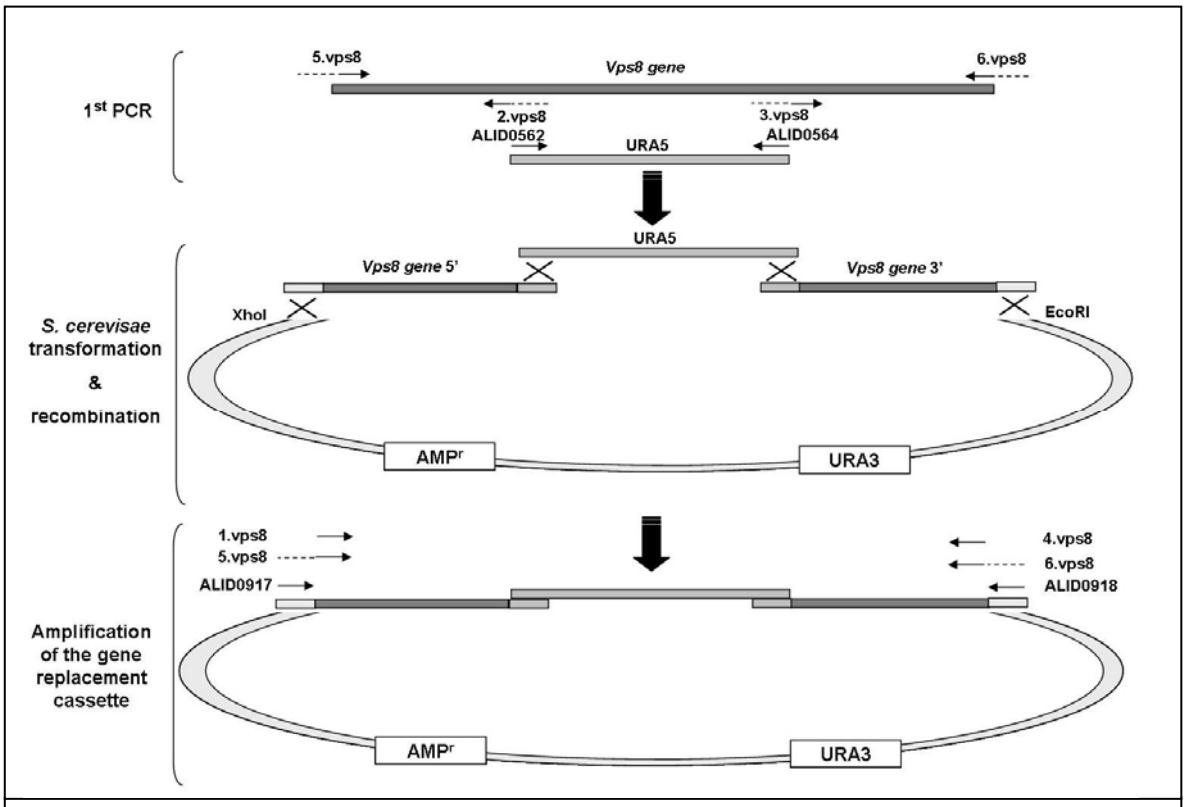


Figura 14: **Schema per la creazione del costrutto per la mutagenesi mirata del gene *VPS8* dell'auxotrofo *ura5* AIS2 derivato da *Sporobolomyces* sp. IAM 13481. Le reazioni PCR del primo step sono state condotte utilizzando come templato il DNA genomico di *Sporobomolomyces* sp. IAM 13481. Le estremità 5' e 3' del gene *target VPS8* sono state ottenute mediante PCR utilizzando i *primer* 5.VPS8 - 2.VPS8 e 6.VPS8 - 4.VPS8, rispettivamente; i *primer* ALID0562 - ALID0564 sono stati utilizzati per amplificare il gene *marker URA5*. I tre prodotti di amplificazione sono stati usati per trasformare *S. cerevisiae* FY834.**
L'omologia tra le porzioni chimeriche dei *primer* 5.VPS8 e 6.VPS8 (linee tratteggiate) rispettivamente con le porzioni del plasmide digerite con XhoI e EcoRI (grigio chiaro), e tra le regioni chimeriche dei primer 2.VPS8 e 3.VPS8 (linee tratteggiate) rispettivamente con i primer ALID0562 e ALID0564, permettono la circolarizzazione del plasmide in *S. cerevisiae* conferendogli la prototrofia (gene *URA3*). Il costrutto *vps8::URA5* può essere amplificato dal DNA estratto da *S. cerevisiae* FY834 utilizzando le combinazioni di primer 1.VPS8 - 4.VPS8 (comprendono solo le porzioni del gene *VPS8* senza quelle del plasmide pRS426), 5.VPS8 - 6.VPS8 (comprendono sia le porzioni del gene *VPS8* che quelle del plasmide pRS426) e ALID0917 - ALID0918 (comprendono solo le regioni del plasmide pRS426. Modificato da Colot *et al.* (2006).

7.6.4 - Analisi genetico-molecolare dei putativi mutanti *vps8*Δ

I trasformanti selezionati su YNB agarizzato contenente sorbitolo 1M, sono stati allevati *overnight* in YNB liquido per l'estrazione del DNA genomico, al fine di accertare mediante analisi PCR e *Southern blot* quale dei trasformanti fosse un mutante *vps8*Δ.

Per l'analisi PCR sono stati disegnati due nuovi *primer* (outVPS8_F e outVPS8_R) (Tab. 13) distanti circa 200 bp dai primer 1.VPS8 e 4.VPS8 utilizzati per generare la cassetta per la mutagenesi mirata (Fig 35 D). Le analisi PCR sono state condotte utilizzando le combinazioni di *primer* 1.VPS8 - 4.VPS8, outVPS8_F - outVPS8_R, outVPS8_F - DoubleJointURA5_R, outVPS8_R - ALID0562 e outVPS8_R - ALID0563 (Tab. 13). I primer contenenti la sigla "vps8" sono stati disegnati sulla sequenza del gene *VPS8* riportata sul database di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481. Come riportato in precedenza (par 7.6.2), i primer ALID0562, ALID0563 e DoubleJoint URA5_R sono stati disegnati al'interno del gene URA5 utilizzato come *marker* selettivo negli esperimenti di mutagenesi (in figura 35 D è riportata la posizione di tutti i primer utilizzati in questo esperimento). Le condizioni di amplificazione sono le stesse utilizzate per la *inverse* PCR (Tab 9).

Per di verificare l'inserzione del costrutto *vps8::URA5* nel gene *VPS8* sono state eseguiti due diversi *Southern blot*. Quantità variabili da 2 a 5 μg di DNA genomico sono state digerite in un caso con 5-20 U dell'enzima di restrizione HindIII (che non taglia nel gene *VPS8*), mentre nell'altro con 5-20 U degli enzimi di restrizione PstI (che non taglia all'interno del gene *URA5*) e SpeI (un solo sito di riconoscimento è presente nel gene *URA5*) (Fig 35 D). In entrambi i casi è stata utilizzata come sonda la porzione del gene *VPS8* ottenuta mediante PCR dal genomico di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 utilizzando i primer 1.VPS8 - 4.VPS8 (Tab. 13) marcata con fosforo radioattivo P^{32}. La procedura dettagliata delle varie fasi di marcatura della sonda, ibridazione e sviluppo delle lastre sono riportate nel paragrafo 7.3.6.3.

7.6.5 - Mutagenesi mirata a carico dei geni *DHL* e *rDHL*

Per la mutagenesi mirata dei geni *DHL* e *rDLH*, codificanti entrambi per enzimi aventi attività diene lattone idrolasica, è stato seguito l'approccio che prevede l'utilizzo del ceppo FY834 di *S. cerevisiae,* essendo questo risultato il più efficace.

La procedura è la stessa riportata nel paragrafo 7.6.3. Come DNA templato per le PCR è stato utilizzato il DNA genomico di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481. Per generare

le porzioni 5' e 3' del gene *target DLH* sono state utilizzate rispettivamente le combinazioni di primer 9.DienelactoHydro_F - 10.DienelactoHydro_R e 11.DienelactoHydro_F - 12.DienelactoHydroR (Tab. 13). Per generare le porzioni 5' e 3' del gene *rDLH* invece, sono state utilizzate rispettivamente le combinazioni di primer 1.9.DienelactoHydro_F - 1.10.DienelactoHydro_R e 1.11.DienelactoHydro_F - 1.12.DienelactoHydro_R (Tab. 13).; il gene *marker URA5* è stato ottenuto utilizzando i primer ALID0562-ALID0564 (par. 7.5.3). In tutti i casi sono state utilizzate le condizioni di amplificazione impiegate per l'ottenimento del gene *URA5* (Tab. 10).

Considerando entrambi i geni *DLH* e *rDLH,* la circolarizzazione del plasmide è possibile grazie all'omologia tra:

- le porzioni chimeriche dei primer 9.DienelactoHydro_F- e 1.9.DienelactoHydro_F (basi in minuscolo sottolineate in tabella 13) con il sito XhoI del plasmide pRS426;
- le porzioni chimeriche dei primer 12.DienelactoHydro_R e 1.12.DienelactoHydro_R (basi in minuscolo sottolineate in tabella 13) con il sito EcoRI del plasmide pRS426
- le porzioni chimeriche dei primer 10.DienelactoHydro_R e 1.10.DienelactoHydro_R (basi sottolineate in tabella 13) con il primer ALID0562;
- le porzioni chimeriche dei primer 11.DienelactoHydro_F e 1.11.DienelactoHydro_F (basi sottolineate in tabella 13) con il primer ALID0564.

In figura 15 le porzioni chimeriche dei primer sono rappresentate da linee tratteggiate.

Per entrambi i geni *DLH* e *rDLH* i tre prodotti PCR ottenuti sono stati utilizzati per la trasformazione di *S. cerevisiae* FY834 come descritto in precedenza per il gene *VPS8* (par. 7.6.3). Dai trasformanti ottenuti è stato estratto il DNA e la cassetta per la mutagenesi mirata è stata ottenuta mediante PCR utilizzando per entrambi i geni i primer ALID0917 - ALID0918 (Tab. 13); le condizioni di amplificazione sono state le stesse utilizzate per la *inverse* PCR (Tab. 9). I prodotti ottenuti sono stati purificati, concentrati e precipitati su microparticelle d'oro per la trasformazione biolistica come descritto in precedenza.

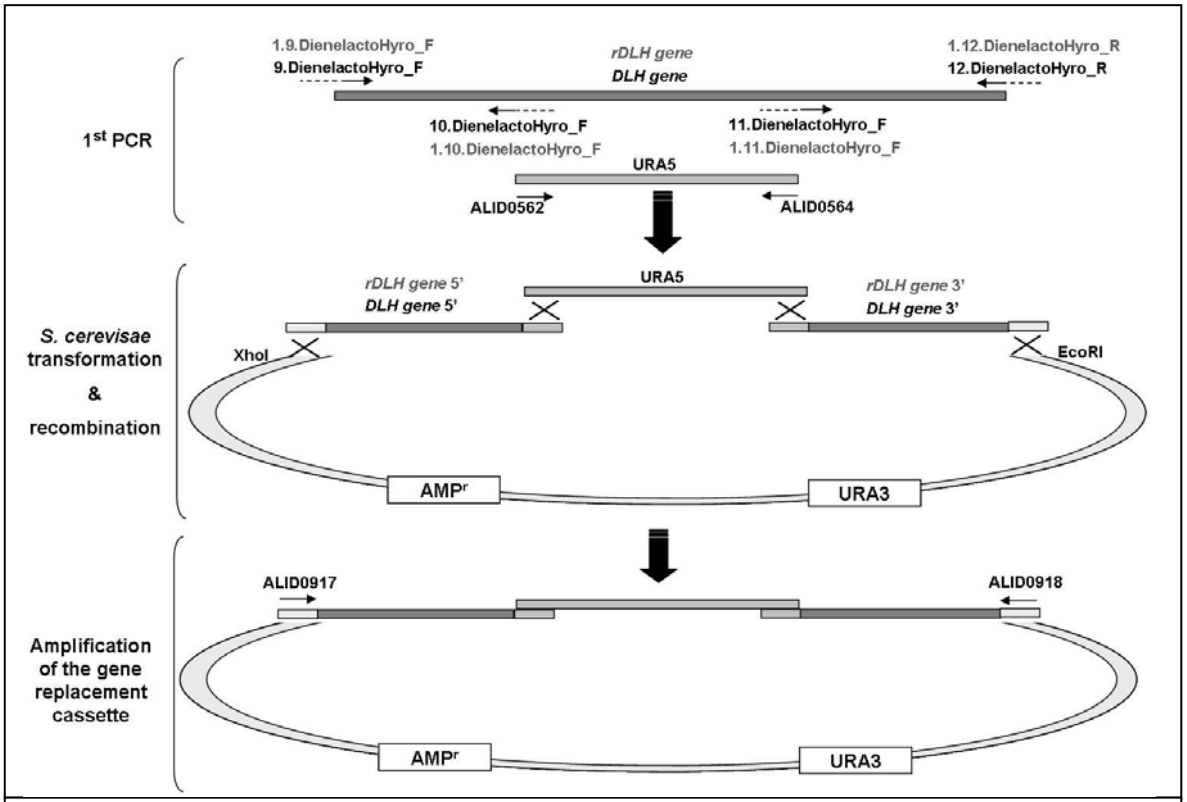


Fig 15: **Schema per la creazione del costrutto per la mutagenesi mirata dei geni *DLH* e *rDLH* (in grigio)dell'auxotrofo *ura5* AIS2 derivato da *Sporobolomyces* sp. IAM 13481. Le reazioni PCR del primo step sono state condotte utilizzando come templato il DNA genomico di *Sporobomolomyces* sp. IAM 13481. Le estremità 5' e 3' del gene *target DLH* sono state ottenute mediante PCR utilizzando rispettivamente le combinazioni di primer 9.DienelactoHydro_F - 10.DienelactoHydro_R e 11.DienelactoHydro_F - 12.DienelactoHydroR. Per generare le porzioni 5' e 3' del gene *rDLH* (in grigio) sono state utilizzate rispettivamente le combinazioni di primer 1.9.DienelactoHydro_F - 1.10.DienelactoHydro_R e 1.11.DienelactoHydro_F - 1.12.DienelactoHydro_R. I primer ALID0562 - ALID0564 sono stati utilizzati per amplificare il gene *marker URA5*. Per entrambi i geni I tre prodotti di amplificazione sono stati usati per trasformare *S. cerevisiae* FY834.**
Tutti i primer utilizzati in questo esperimento sono caratterizzati dalla presenza di porzioni chimeriche (linee tratteggiate) che permettono ricombinazione omologa tra le regioni 5' e 3' dei geni *target DLH* e *rDLH* con il gene *marker URA5* e con le porzioni del plasmide pRS426 digerite con XhoI e EcoRI. Modificato da Colot *et al.* (2006).

7.6.6 - Analisi genetico-molecolare dei putativi mutanti *dlh*Δ e *rdlh*Δ

Per i putativi trasformanti mutati nei geni *dlh*Δ e *rdlh*Δ in seguito a eventi di ricombinazione omologa selezionati anch'essi su YNB contenente sorbitolo 1M, è stato estratto il DNA genomico (par. 7.3.6.1) per la caratterizzazione molecolare mediante analisi PCR e *Southern blot*.

Per l'analisi PCR dei putativi mutanti *dlh*Δ è stata utilizzata la combinazione di primer 7.DienelactoHydro_F - 8.DienelactoHydro_R (Tab. 13). Questi primer sono stati disegnati rispettivamente vicino ai *primer* 9.DienelactoHydro_F e 12.DienelactoHydro_R utilizzati per generare il costrutto per il *gene replacement.* Per l'analisi PCR dei putativi

mutanti *rdlh*Δ è stata utilizzata la combinazione di primer 1.7.OutDienelactoHydro_F-1.8.OutDienelactoHydro_R (Tab. 13) disegnati come per il gene *VPS8* a circa 200 bp dai primer 1.9.DienelactoHydro_F e 1.12.DienelactoHydro_R utilizzati per generare la cassetta per la mutagenesi mirata. In tutti i casi sono state utilizzate le stesse condizioni di amplificazione della *inverse* PCR (Tab. 9).

Le analisi *Southern blot*, effettuate secondo la procedura riportata in precedenza (par. 7.3.6.3), sono state condotte solo sui trasformanti/mutanti risultati positivi alle analisi PCR. Per la digestione dei DNA genomici dei putativi mutanti di entrambi i geni è stato utilizzato l'enzima di restrizione KpnI (che presenta due siti di taglio nel gene *URA5* e nessuno nei geni *DLH* e *rDLH*). Come sonde sono state utilizzate porzioni dei geni *DLH* e *rDLH* ottenute rispettivamente con le combinazioni di primer 1.DienelactoHydro_F - 4.DienelactoHydro_R e 1.1.DienelactoHydro_F - 1.4.DienelactoHydro_R (Tab. 13). In questi due casi la sonda è stata marcata secondo il metodo "freddo" riportato nel paragrafo 7.3.6.3

7.7 - Analisi fenotipica dei mutanti *slower patulin degraders, vps8*Δ e dei putativi mutanti *dlh*Δ *e rdlh*Δ

Al fine di verificare la disattivazione dei geni anche a livello fenotipico, tutti i trasformanti *slower patulin degraders* sono stati posti su terreno YPD agarizzato contenente composti solitamente impiegati per determinare mediante l'osservazione del fenotipo l'attività di geni coinvolti in diverse funzioni cellulari (Thorpe *et al.,* 2004; Maeng *et al.,* 2010; Ianiri *et al.* in preparazione). In particolare, per valutare l'attività di geni coinvolti nella resistenza allo stress ossidativo sono stati utilizzati il perossido di idrogeno (2 e 2.5 mM) e il t-butil-idroperossido (tBOOH) (0,4 mM) (Thorpe *et al.,* 2004; Maeng *et al.,* 2010), mentre il tiabendazolo (TBZ) (5 µg/ml) e il *sodium docedyl sulfate* (SDS) (0,018% p/v) sono stati utilizzati per valutare rispettivamente l'attività di geni coinvolti con il corretto funzionamento dei microtubuli e l'attività di geni coinvolti con il mantenimento dell'integrità della parete cellulare e della membrana cellulare (Maeng *et al.,* 2010). Nel caso del perossido di idrogeno e del tBOOH, data la loro relativa instabilità, le piastre sono state utilizzate subito dopo solidificazione del terreno (i.e circa 10-15 min), mentre nel caso del TBZ e dell'SDS le piastre sono state utilizzate dopo un giorno. Inoltre, per identificare geni coinvolti nella crescita a temperature non permissive, piastre di YPD agarizzato contenenti i trasformanti sono state prima poste a 37°c per 16 h e successivamente a 24°C per 3 giorni. In tutti i casi come controllo positivo i putativi

mutanti sono stati piastrati è stato utilizzato il terreno agarizzato YPD in assenza dei diversi composti usati nell'analisi fenotipica. Tutti i test fenotipici sono stati ripetuti tre volte.

Pellet cellulare dei diversi trasformanti è stato risospeso in 100 µl di YPD liquido, sono state effettuate delle diluizioni seriali (fino a $1*10^4$ - $1*10^5$) e 2 µl di ogni diluizione sono stati deposti in piastre con i terreni contenenti l'uno o l'altro dei composti succitati; le piastre sono state incubate a 24°c per 3-7 giorni.

Per l'analisi fenotipica del mutante *vps8*Δ e dei putativi mutanti *dlh*Δ e *rdlh*Δ, oltre ai test di crescita effettuati sui terreni appena descritti, sono stati anche effettuati dei saggi di degradazione della patulina. I saggi sono stati condotti, come già descritto per i trasformanti *slower patulin degraders*, in piastre a 96 pozzetti contenenti 100 µl di Lilly-Barnett con o senza patulina (100 µg/ml). Anche in questo caso i microrganismi sono stati inoculati con metodo non quantitativo mediante stuzzicadenti sterili. I filtrati colturali, estratti con acetato di etile (par. 7.4), sono stati analizzati mediante TLC dopo 3 e 6 giorni di incubazione.

RISULTATI

8.1 – Trasformazione di *R. kratochvilovae* mediata da *Agrobacterium tumefaciens*

8.1.1 - Sensibilità di *R. kratochvilovae* LS11 agli antibiotici

Prima degli esperimenti di trasformazione è essenziale valutare la sensibilità agli antibiotici al fine di determinarne l'esatta concentrazione necessaria per inibire la crescita del ceppo WT per una efficace selezione dei trasformanti recanti il gene *marker* utilizzato nella trasformazione.

In questi esperimenti sono state saggiate diverse concentrazioni (50, 100, 200 e 300 µg/ml) di igromicina B, neomicina G418 e nurseotricina su terreno agarizzato YPD. Nel caso dell'igromicina B, è stata anche confrontata l'azione tossica dell'antibiotico acquistato da tre diverse ditte produttrici (Sigma, Invitrogen e Roche). Questi esperimenti hanno mostrato che la crescita di LS11 diminuisce all'aumentare della concentrazione di igromicina B fino ad essere completamente inibita a 400 µg/ml di antibiotico acquistato dalla Sigma e a 200 µg/ml di igromicina B acquistata dalla Invitrogen e Roche. Per gli antibiotici nurseotricina e neomicina G418, invece, a 50 µg/ml si registra una bassissima percentuale di crescita microbica che è totalmente soppressa a 100 µg/ml.

Alla luce dei risultati ottenuti, negli esperimenti di trasformazione sono state utilizzati 200 µg/ml di igromicina B acquistata dall'Invitrogen o dalla Roche e 100 µg/ml di nurseotricina e neomicina G418.

8.1.2 - Sensibilità di *Agrobacterium tumefaciens* al cefotaxime

Per la prova di tossicità del cefotaxime nei confronti del ceppo EHA105 di *A. tumefaciens* impiegato per la AMT di LS11, sono state testati 100 µg/ml, 200 µg/ml e 300 µg/ml di antibiotico su terreni Luria Bertani e YPD agarizzati.

Dopo sette giorni di incubazione, è stato rilevato che la crescita di *A.tumefaciens* EHA105 è completamente inibita a 200 µg/ml di cefotaxime su entrambi i terreni. Sulla base di questi risultati, i terreni per la selezione dei trasformanti ottenuti mediante AMT contenenti le concentrazioni di antibiotici indicate nel precedente paragrafo, sono stati integrati dall'aggiunta di cefotaxime a 200 µg/ml, in modo da sopprimere totalmente la crescita di *Agrobacterium* al termine della AMT.

8.1.3 - Trasformazione mediata da *A. tumefaciens*

Per gli esperimenti di AMT di LS11 è stato utilizzato il ceppo EHA105 di *A. tumefaciens* contenente uno di 5 vettori binari recanti come *marker* selettivi geni che

codificano per la resistenza a igromicina B (pPZP-HYG2, fig. 16), neomicina G418 (pPZP-NEO1, fig. 17) e nurseotricina (pPZP-NATcc, pPZP-GFP-NATcc e pPZP-Hxk2.GFP-NATcc, Fig. 18, 19). Nel corso di vari esperimenti di trasformazione, è stato valutato l'effetto di una concentrazione di 100 e 200 μM di acetosiringone nell'IM per i tempi di coincubazione di 24, 48 e 72 h a 24 °C.

Come per altre specie di funghi e lieviti (Michielse *et al.,* 2005; MacClelland *et al.,* 2005), il numero di putativi trasformanti aumenta all'aumentare della lunghezza del tempo di coincubazione. A parità di tempo di coincubazione, il numero maggiore di putativi trasformanti si ottiene con una concentrazione di acetosiringone 100 μM. In sintesi, partendo da una concentrazione iniziale di cellule di lievito di $2*10^6$ UFC/ml, il maggior numero di putativi trasformanti (da 500 a 1000) è ottenuto con 3 giorni di coincubazione ed una concentrazione di acetosiringone 100 μM. Il tipo di vettore utilizzato invece, non sembra influenzare in maniera significativa l'efficacia della trasformazione (dati non mostrati).

Prima dell'analisi genetico-molecolare e dell'osservazione microscopica (quest'ultima per analizzare l'espressione della GFP), è stata valutata la stabilità delle presunte inserzioni di T-DNA nel genoma di LS11. Indipendentemente dal tipo di vettore utilizzato, più del 99,5 % dei putativi trasformanti testati è in grado di crescere su terreno selettivo con antibiotico dopo un periodo di crescita di quattro giorni su terreno non selettivo.

8.1.4 - Analisi genetico-molecolare dei putativi trasformanti di *R. kratochvilovae* LS11

8.1.4.1 – Analisi mediante PCR e *Southern blot*

L'avvenuta integrazione del T-DNA esogeno nel DNA genomico dei putativi trasformanti di LS11 selezionati a *random*, è stata inizialmente valutata utilizzando i primer M13_F e M13_R. Come illustrato nelle figure 16 – 19, questi primer sono comuni a tutti i vettori binari utilizzati in questo lavoro di tesi in quanto disegnati sui bordi del T-DNA e quindi fuori dalle cassette recanti i diversi geni *marker.*

Per tutti i trasformanti generati con i vettori pPZP-NATcc, pPZP-NEO1 e pPZP-HYG2 non è stato ottenuto alcun prodotto di amplificazione, mentre nei controlli positivi, costituiti dai relativi vettori e da trasformanti di *C. neoformans* JEC 21, sono stati ottenuti prodotti PCR della grandezza attesa (1816 bp per il pPZP-NATcc, 2332 bp per il pPZP-NEO1 e 2110 bp per il pPZP-HYG2).

A questo punto, per ogni singolo vettore sono state utilizzate coppie di primer specifiche disegnate all'interno della ORF *(Open Reading Frame)* (primer In) e sul promotore e sul terminatore del gene (primer Out) (Fig 16 - 19). Anche in questo caso, i trasformanti di *C. neoformans* JEC 21 e i relativi vettori sono stati utilizzati come controlli positivi.
Dalla PCR condotta con le combinazioni di primer InNAT_F - InNAT_R e OutNAT_F – OutNAT_R sul DNA genomico di putativi trasformanti di LS11 ottenuti con il vettore pPZP-NATcc non è stata ottenuta nessun amplificazione per entrambe le coppie di primer (Fig. 21, *lanes* 5-9 e 17-20), mentre nei controlli positivi costituiti dai trasformanti di JEC 21 ottenuti con lo stesso vettore pPZP-NATcc (Fig. 21, *lanes* 2 e 3 per i primer OutNAT e 13 e 14 per i primer InNAT) e dal vettore stesso (Fig. 21, *lanes* 10 e 21), sono state ottenute le bande di grandezza attesa (1394 bp e 436 bp, rispettivamente). Dati i risultati negativi della PCR, per questi trasformanti non è stata effettuata l'analisi *Southern blot*.

Per quanto riguarda i putativi trasformanti di LS11 resistenti alla neomicina G418, dalla PCR effettuata utilizzando la combinazione di primer InNEO_F - InNEO_R è stata ottenuta la banda di grandezza attesa (545 bp) per tutti i campioni testati (Fig. 22 A), inclusi però anche i ceppi WT di LS11 e *C. neoformans* (Fig. 22 A, *lanes* 2 e 12, rispettivamente) in cui la banda non era ovviamente attesa, anche se in questi casi è possibile notare una minore intensità del prodotto di amplificazione. I risultati ottenuti utilizzando la combinazione di primer OutNEO_F – OutNEO_R sono leggermente diversi; nei campioni corrispondenti alle *lanes* 6, 7 e 8 (Fig. 22 B) non è stato ottenuto alcun prodotto di amplificazione, mentre per tutti gli altri campioni, inclusi però anche i ceppi WT di LS11 e *C. neoformans* (Fig. 22 B, *lanes* 2 e 12 rispettivamente), è stato ottenuto il prodotto di grandezza attesa (1397 bp).
Per confermare i risultati ottenuti mediante PCR, sono stati effettuati diversi *Southern blot* utilizzando diversi enzimi di restrizione. In figura 22 C, è mostrata l'analisi *Southern blot* del DNA genomico di cinque putativi trasformanti ottenuti con il vettore pPZP-NEO1 (*lanes* 2 - 6) risultati positivi alle analisi PCR. La digestione dei DNA genomici è stata effettuata con EcoRI, enzima che taglia in prossimità ai due bordi del T-DNA (Fig. 17); la banda di ibridazione attesa dovrebbe perciò essere di 1726 bp. Come controlli negativi sono stati inclusi i ceppi WT di *R. kratochvilovae* e *C. neoformans* (Fig. 22 C, *lanes* 1 e 7 rispettivamente), mentre come controlli positivi sono stati inclusi un trasformante di JEC21 resistente alla neomicina (Fig. 22 C, *lane* 8) generato nello stesso esperimento di trasformazione e il plasmide pPZP-NEO1 (Fig. 22 C, *lane* 9), anch'essi digeriti con EcoRI. La banda di ibridazione di 1726 bp attesa è stata ottenuta solo nel caso del trasformante di

JEC21 e del vettore binario (Fig. 22 C, *lanes* 8 e 9, rispettivamente), non per i due ceppi WT, ne per tutti i putativi trasformanti di LS11 fenotipicamente resistenti alla neomicina. Identico risultato è stato ottenuto in altri *Southern blot* in cui i DNA genomici erano stati digeriti con altri enzimi di restrizione (dati non mostrati).

Per i putativi trasformanti resistenti all'igromicina B, entrambe le combinazioni di primer (InHYG e OutHYG) (Fig. 23 A - B) hanno dato origine alle bande di grandezza attesa (826 e 1506 bp, rispettivamente) per tutti i campioni testati (Fig 23 A – B, *lanes* 3-10), incluso il controllo positivo costituito dal vettore pPZP-HYG2 (Fig. 23 A – B, *lane* 11). Risultati inattesi sono stati ottenuti col ceppo LS11 WT non trasformato: con i primer InHYG una banda di amplificazione, peraltro più grande (circa 1300 bp) di quella ottenuta per i putativi trasformanti (Fig. 23 A, *lane* 2), e con i primer OutHYG una banda di circa 1000 bp con i primer OutHYG (Fig. 23 B, *lane* 2).

Lo stesso DNA genomico sottoposto ad analisi PCR è stato utilizzato per l'analisi *Southern blot*. Come è possibile osservare in figura 23 D, è stata ottenuta la banda di ibridazione di grandezza attesa (2110 bp) solo in corrispondenza della sonda (controllo positivo) (*lane* 11).

Per i putativi trasformanti ottenuti con i vettori pPZP-GFP-NATcc e pPZP-Hxk2.GFP-NATcc, sono stati sostanzialmente ottenuti gli stessi risultati conseguiti dall'analisi dei putativi trasformanti che risultavano fenotipicamente resistenti a neomicina e igromicina. L'analisi PCR condotta con i primer InNAT_F – InNAT_R e OutNAT_F – OutNAT_R mostra i prodotti di amplificazione della grandezza attesa per tutti i campioni, controlli negativi inclusi (LS11 WT e JEC21) (dati non mostrati). Nel caso della PCR condotta con i primer InGFP_F – InGFP_R, disegnati internamente al gene che codifica per la proteina fluorescente GFP (Fig. 19), è stato ottenuto il prodotto di amplificazione atteso solo per i controlli positivi (i.e. trasformante di JEC21 ottenuto con lo stesso vettore e plasmide utilizzato per la trasformazione) mentre in tutti i putativi trasformanti di LS11 è stata ottenuta una banda di amplificazione aspecifica (dati non mostrati).

Lo stesso DNA genomico sottoposto ad analisi PCR è stato digerito, per il *Southern blot*, con l'enzima EcoRV che taglia in tre diversi punti del T-DNA [nel promotore *H3* del gene GFP, tra il terminatore *H3* dello stesso gene e il promotore *ACT1* del gene NAT e nel gene *NAT* (Fig. 19)]. Sono stati analizzati 6 putativi trasformanti di LS11 ottenuti con il vettore pPZP-GFP-NATcc (Fig. 24 A- B, *lanes* 3-8) e 8 ottenuti con il pPZP-Hxk2.GFP-NATcc (Fig. 24 A- B, *lanes* 9-16); come controllo negativo è stato utilizzato LS11 WT (Fig. 24 A-B, *lane* 2), mentre come controlli positivi sono stati utilizzati un trasformante di JEC21

ottenuto con il vettore pPZP-Hxk2.GFP-NATcc e la sonda (Fig. 24 A- B, *lanes* 17 e 18, rispettivamente), ottenuta amplificando dal vettore con i primer M13_F e M13_R una porzione del T-DNA di 3501 bp (Fig. 19). Come è possibile notare in figura 24 B, le 4 bande attese di 1285 bp, 1190 bp (porzioni interne del T-DNA), di circa 3500 e 4500 bp (giunzioni del T-DNA con il DNA genomico) sono state ottenute solo in corrispondenza del trasformante di JEC21 (*lane* 17), mentre per tutti i putativi trasformanti di LS11 non è stata ottenuta ibridazione per nessuno dei due vettori utilizzati.

Come descritto nella sezione Materiali e Metodi (par. 7.3.6.5), dopo le analisi PCR e *Southern blot* per verificare l'integrazione del T-DNA nel genoma di LS11, è stata anche verificata l'espressione della proteina fluorescente GFP nelle cellule dei putativi trasformanti mediante l'osservazione al microscopio a fluorescenza. Dalle osservazioni effettuate sia al microscopio ottico che a allo stereoscopio (Fig. 24, C - L), anche se fenotipicamente tutti i trasformanti sono in grado di svilupparsi su nurseotricina, risulta evidente la differente intensità del segnale fluorescente emesso dai putativi trasformanti di LS11 (Fig. 24, C - F) rispetto a quelli ottenuti da quelli di *C. neoformans* JEC 21 (Fig. 24, G - L). Per i putativi trasformanti di LS11 il segnale fluorescente è paragonabile a quello emesso dal WT, mentre per i trasformanti di *C. neoformans* JEC 21, in accordo con quanto riportato da Idnurm *et al.* (2007), il segnale fluorescente è nettamente più intenso di quello del WT (dati non mostrati). Le osservazioni fenotipiche al microscopio a fluorescenza, contrariamente alla crescita su terreno selettivo contenente NAT, corroborano i risultati del *Southern blot* i quali mostrano che non è presente integrazione del T-DNA di entrambi i vettori pPZP-GFP-NATcc e pPZP-Hxk2.GFP-NATcc nel genoma di LS11.

8.1.4.2 – Analisi mediante *inverse* PCR

Sebbene nei *Southern blot* non è stata mai ottenuta una banda di ibridazione che confermasse l'integrazione del T-DNA nel genoma di LS11, è stata effettuata un'ulteriore verifica mediante *inverse* PCR per alcuni putativi trasformanti precedentementi risultati positivi alle analisi PCR. Sono stati esaminati i putativi trasformanti generati coi vettori pPZP-HYG2, pPZP-GFP-NATcc e pPZP-Hxk2.GFP-NATcc. Poiché sono stati ottenuti risultati simili per tutti i vettori esaminati, in figura 25 vengono mostrati solo quelli relativi a putativi trasformanti resistenti all'igromicina. In tutti i campioni, compreso LS11 WT, è stato ottenuto un *pattern* di amplificazione aspecifico in quanto sono presenti più frammenti tutti simili tra loro. Ciononostante, alcuni di essi sono stati sequenziati e sottoposti ad analisi Blastx (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) nessuno risultava

essere di interesse perché non corrispondente a porzioni di genoma di organismi filogeneticamente correlati, come per esempio *Rhodotorula graminis* e *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (dati non mostrati).

8.2 - Degradazione della patulina da parte di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481

La degradazione della patulina a concentrazioni di 50 e 100 μg/ml da parte di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 è stata condotta in piastre a 96 pozzetti e tubi Falcon da 15 ml; l'inoculazione è stata effettuata sia con metodo non quantitativo mediante stuzzicadenti sterile che utilizzando una concentrazione iniziale di $2*10^6$ UFC/ml. In tutti gli esperimenti condotti, il BCA *R. kratochvilovae* LS11 è stato utilizzato sia come controllo positivo della degradazione, sia per accertare che i prodotti di degradazione della patulina prodotti da *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 fossero gli stessi di quelli prodotti da LS11.

È importante sottolineare che quando le cellule sono state inoculate con lo stuzzicadenti, è stata ottenuta una leggera variabilità tra i risultati dei diversi esperimenti eseguiti, poiché la concentrazione iniziale di cellule inoculate con lo stuzzicadenti non è esattamente riproducibile, sebbene sempre maggiore di $2*10^6$ UFC/ml, e ciò si riflette sulla diversa velocità di degradazione della patulina. Tuttavia, il ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp., in tutti gli esperimenti in cui è stato inoculato con lo stuzzicadenti, è stato sempre in grado di degradare completamente 50 μg/ml e 100 μg/ml di patulina in 4-6 giorni e in 7-8 giorni, rispettivamente.

L'obiettivo primario di questi esperimenti di degradazione era verificare che il ceppo IAM 13481 fosse in grado di degradare la patulina secondo lo stesso *pathway* identificato per LS11. Inoltre, poiché la successiva fase di *screening* dei mutanti ottenuti da AMT prevede l'inoculazione non quantitativa mediante stuzzicadenti nel terreno contenente patulina, sono stati qui riportati i risultati delle analisi TLC e HPLC della degradazione di 100 μg/ml di patulina in tubi Falcon da 15 ml contenenti 2 ml di Lilly-Barnett in cui sia il ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. che *R. kratochvilovae* LS11 sono stati inoculati mediante stuzzicadenti. Inoltre, sebbene l'analisi HPLC sia il metodo d'elezione per l'analisi quantitativa della degradazione della patulina da parte dei lieviti basidiomiceti (Castoria *et al.,* 2005), in questo lavoro è stata utilizzata solo per confermare i risultati ottenuti dalle analisi TLC, mediante la comparazione qualitativa dei picchi relativi ai prodotti di degradazione della patulina formati dall'agente di biocontrollo *R. kratochvilovae* LS11 e da *Sporobolomyces* sp. IAM 13481.

Sia per l'analisi TLC che HPLC, gli *spot* (in TLC) e i picchi (in HPLC) ottenuti dall'analisi delle colture di incubazione, sono stati confrontati con degli standard di patulina [Rf = 0,58, Rt [tempo di ritenzione (*retention time*) = 8,74 min] e DPA e (Rf =

0,46, Rt = 9,19 min]. Poiché lo standard di DPA è stato ottenuto direttamente da colture di incubazione della patulina con LS11, nel box di figura 26 relativo all'analisi HPLC si notano ancora residue tracce della tossina.

In dettaglio, l'analisi TLC relativa ai campioni ottenuti dalla degradazione di 100 µg/ml di patulina mostra che nelle *lanes* corrispondenti agli estratti colturali di LS11, al giorno 2 di incubazione è appena visibile lo *spot* con Rf di 0,58 della patulina, che scompare completamente al giorno 3, tempo al quale è ben visibile lo *spot* con Rf di 0,46 del DPA (Fig. 26 A). L'analisi HPLC (Fig 26 C) conferma i risultati della TLC. In corrispondenza dei campioni di LS11 analizzati dopo 2 giorni di incubazione si nota la presenza contemporanea sia del picco della patulina (Rt = 8,74) che del DPA (Rt = 9,19), mentre dal giorno 3 in poi è visibile solo il picco del DPA. E' probabile che la completa degradazione della micotossina sia avvenuta dopo 4 giorni di incubazione in quanto l'area del picco del DPA ottenuta a questo *time point* è maggiore di quella a 3 giorni (Fig. 26 C).
Le analisi TLC e HPLC della degradazione della patulina da parte di *Sporobolomyces* sp IAM 13481 mostrano che questo lievito è più lento di LS11 nella degradazione della tossina (Fig. 26 A, B). Infatti, dopo 2 giorni di incubazione sono ben visibili lo *spot* con Rf di 0,58 (in TLC) e il picco con Rt di 8,74 (in HPLC) della patulina, mentre sono appena visibili quelli del DPA (Rf 0,46 e Rt 9,19). Dal giorno 3 in poi, si nota la graduale scomparsa di *spot* e picco della patulina e la comparsa ed il progressivo aumento di quelli del DPA. Dopo 6 giorni di incubazione, sia in TLC che in HPLC non è più rilevabile patulina, anche se la completa degradazione della tossina da parte di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 probabilmente è avvenuta in 7 giorni dato che l'area del picco del DPA nelle analisi HPLC è maggiore di quella a 6 giorni.
La figura 27 B mostra il grafico della crescita di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 e LS11 in presenza di 100 µg/ml di patulina. La crescita di entrambi i lieviti appare strettamente correlata ai rispettivi andamenti della degradazione della micotossina. LS11 è caratterizzato da una fase di crescita immediata che corrisponde ad una rapida degradazione della patulina, mentre per *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 si osserva una fase di "latenza" iniziale con crescita dal giorno 3 in poi, corrispondente al tempo in cui si rende ben visibile su TLC lo *spot* del DPA. Sia per LS11 che per *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 la degradazione della patulina inizia a circa $1,3 * 10^6$ UFC/ml (corrispondenti a OD_{600} di 0,05), mentre a valori di UFC/ml pari a $4 * 10^6$ (corrispondenti a OD_{600} di 0,35) la micotossina è completamente degradata. Questa correlazione tra crescita e degradazione

della patulina è stata riscontrata anche in altri esperimenti effettuati con diversi lieviti appartenenti al genere *Sporobolomyces* (dati non mostrati).

Anche per quanto riguarda la crescita nel controllo Lilly-Barnett privo di patulina, LS11 appare svilupparsi un po' più rapidamente di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481, sebbene le due curve di crescita abbiano un andamento simile tra di loro (Fig. 27 A).

Negli esperimenti di degradazione della patulina condotti in piastre a 96 pozzetti e con inoculazione non quantitativa dei microrganismi mediante stuzzicadenti sterili, i risultati ottenuti sono analoghi a quelli in tubi Falcon appena descritti, anche se spesso i tempi di degradazione riscontrati sono più lunghi di 1-2 giorni circa , sia per *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 che per LS11 (dati non mostrati).

Nel caso della degradazione della patulina da parte di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 in tubi Falcon da 15 ml e in piastre a 96 pozzetti inoculando il lievito ad una concentrazione iniziale di 2×10^6 UFC/ml, sono state registrate differenze notevoli rispetto all'inoculazione con lo stuzzicadenti nello stesso tipo di coltura. Negli esperimenti iniziati con 2×10^6 UFC/ml, la completa degradazione della patulina a 50 μg/ml era più lenta di 1-2 giorni rispetto all'inoculo iniziale con stuzzicadenti, mentre a 100 μg/ml di patulina in due esperimenti su tre il ceppo IAM 13481 non è riuscito a svilupparsi, con conseguente assenza di degradazione (dati non mostrati). LS11 invece, anche quando inoculato ad una concentrazione iniziale di 2×10^6 UFC/ml è stato sempre in grado di degradare completamente 50 μg/ml e 100 μg/ml di patulina, anche se i tempi di degradazione sono più lunghi rispetto all'inoculazione con stuzzicadenti sempre in tubi Falcon. Questi dati confermano risultati ottenuti in esperimenti precedenti (dati non mostrati).

La capacità di degradare la patulina è stata saggiata anche per gli auxotrofi *ura5* (AIS2) e *ura3* (AIS1) derivati da *Sporobolomyces* sp. IAM 13481. Entrambi i microrganismi quando inoculati a ad una concentrazione iniziale di 2×10^6 UFC/ml si sviluppano molto lentamente in Lilly-Barnett privo di patulina e non si sviluppano affatto in presenza di 50 μg/ml di tossina; quando inoculati con lo stuzzicadenti invece, entrambi sono stati in grado di degradare completamente la tossina con formazione finale di DPA, anche se più lentamente rispetto al ceppo WT (dati non mostrati).

8.3 - Selezione di auxotrofi spontanei per l'uracile per *Sporobolomyces* sp. IAM 13481

Per la trasformazione di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 sono stati inizialmente saggiati gli stessi vettori [pPZP-HYG2, pPZP-NEO1, pPZP-NATcc, (Fig. 16 – 18)] utilizzati per la trasformazione di *C. neoformans* (Idnurm *et al.,* 2004, 2007; Walton *et al.,* 2005) che conferiscono ai trasformanti la resistenza agli antibiotici igromicina B, neomicina G418 e nurseotricina. L'isolamento di colonie di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 spontaneamente resistenti ai tre antibiotici e la loro capacità di crescita incrociata su di essi per ripetute generazioni, hanno mostrato chiaramente che il sistema di trasformazione basato sulla resistenza agli antibiotici sarebbe stato di difficile utilizzo per la generazione di una collezione di mutanti inserzionali.

Il secondo approccio ha previsto la generazione di costrutti recanti come *marker* selettivi geni codificanti per enzimi di *pathway* metabolici. A tal fine i geni *URA3* e *URA5* di *S. cerevisiae* sono stati utilizzati come sequenze *query* per l'individuazione degli omologhi *URA3* e *URA5* di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481- In questo modo è stata individuata nel genoma di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 una copia di ciascuno dei due geni: scaffold 10:560684-563897 e scaffold_9:740266-745011, per *URA3* e *URA5*, rispettivamente. In questa tesi è stato utilizzato solo il gene *URA5.*

Mutanti auxotrofi spontanei per l'uracile sono stati isolati su terreno con 5-FOA. Otto auxotrofi (Fig. 28 A) selezionati sono risultati stabili in quanto il fenotipo *ura* è stato conservato dopo 4 giorni di crescita su terreno privo di uracile. Il DNA genomico di questi auxotrofi *ura* stabili è stato estratto e il gene *URA5* è stato amplificato mediante PCR. Gli auxotrofi isolati e la natura delle mutazioni individuate sono indicate in figura 28 A. Il ceppo AIS2 presenta una delezione di 129 bp (AACAGAAT…TCTCTCTC). In B4a la porzione CCTCAAAGTGTCTAC del gene *URA5* è stata rimpiazzata da una inserzione TCCCCTCCCTACCAT corrispondente alla regione 5' del gene adiacente a *URA5*. B11a, B9a e B2a hanno delezioni di una singola T in una delle sei T della regione CCTTA<u>TTTTTT</u>CAACT. B3a e B7a hanno una delezione di tre basi (CGGAGA<u>AGG</u>AGGTTC) e 8A presenta una delezione di 10 basi (ATTGTACAAG).

In questo lavoro di tesi per tutti gli esperimenti di trasformazione è stato utilizzato l'auxotrofo *ura5* AIS2, che presenta una delezione di 129 bp centrata su una palindrome imperfetta di 18 bp (TTCTTTTGATCAACAGAA). (Fig. 28 A, mutazione B1a). Questo auxotrofo AIS2 è stato scelto perché una delezione cosi estesa rende molto improbabile la reversione della mutazione alla prototrofia.

Per quanto riguarda l'individuazione delle mutazioni nel gene *URA5* dell'auxotrofo Rgpo1 di *R. kratochvilovae* LS11, le sequenze ottenute con i primer ALID0563 e ALID0564 (ORF del gene), non hanno mostrato differenze con quella del gene *URA5* dell'organismo WT. Il putativo auxotrofo Rpo1 fenotipicamente mostra capacità di crescita su 5-FOA quindi è ipotizzabile l'eventuale presenza di mutazioni sulla regione del promotore del gene *URA5* non coperta dai primer utilizzati per la PCR. Per questa ragione anche Rgpo1 è stato utilizzato per gli esperimenti di trasformazione con *A. tumefaciens* riportati in seguito.

8.4 – AMT dell'auxotrofo AIS2 derivato da *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 e del putativo auxotrofo Rgpo1 di *R. kratochvilovae* LS11

Il ceppo EHA105 di *A. tumefaciens* trasformato con il vettore binario pPZP-URA5 è stato co-incubato sia con l'auxotrofo AIS2 di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 che con il putativo auxotrofo Rgpo1 di *R. kratochvilovae* LS11; tre giorni dopo, i putativi trasformanti prototrofi sono stati selezionati su terreno selettivo YNB contenente cefotaxime per inibire la crescita batterica.

Sia per l'auxotrofo AIS2 di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 che per il putativo auxotrofo Rgpo1 di *R. kratochvilovae* LS11 sono stati ottenuti fino a 5000 putativi trasformanti prototrofi per piastra di co-incubazione. Dal test di stabilità effettuato su circa 200 di questi (sia per AIS2 che per Rgpo1) selezionati a *random* è emerso che, in entrambi i casi, più del 99,5 % è risultato essere stabile, cioè in grado di svilupparsi su terreno selettivo YNB dopo crescita in terreno non selettivo YPD.

Sul DNA genomico estratto da dieci trasformanti stabili derivati dall'auxotrofo AIS2, sono state effettuate analisi PCR utilizzando i primer ALID0562-ALID0564 e i primer M13_F e M13_R. Come controlli sono stati inclusi il ceppo IAM 13481, l'auxotrofo AIS2 e il plasmide pPZP-URA5. La figura 28 B mostra che i primer ALID0562-ALID0564 producono la banda attesa di 1766 bp corrispondente al gene *URA5* di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 per questo ceppo WT non trasformato (*lane* 2) e per il vettore binario (*lane* 14). Nel caso dell'auxotrofo AIS2 (*lane* 3), invece, è stata ottenuta una banda di 1637 bp corrispondente al gene *ura5* recante la delezione di 129 bp, mentre per tutti i trasformanti (*lanes* 4 - 13) testati è stata ottenuta la stessa banda di 1637 bp ottenuta per il ceppo AIS2 e una banda di 1766 bp corrispondente al T-DNA inserito con la trasformazione. La presenza di due bande indica che non si sono verificati fenomeni di ricombinazione omologa tra il gene nativo *ura5* e il gene *URA5* inserito con la trasformazione. In caso di

ricombinazione omologa, si sarebbe dovuta ottenere un‘unica banda più grande di quella di 1639 bp ottenuta per i trasformanti.

Questi risultati sono confermati dai risultati ottenuti dalla PCR condotta coi primer M13_F e M13_R (Fig 28 C). In corrispondenza dei trasformanti (*lanes* 4 - 13) e del vettore pPZP-URA5 (*lane* 14) è stata ottenuta una sola banda di 2429 bp corrispondente al T-DNA, mentre per il WT di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (*lane* 2) e per l'auxotrofo AIS2 (*lane* 3), come atteso, non è stato ottenuto alcun prodotto di amplificazione.

Per i putativi trasformanti derivati da Rgpo1 invece, i risultati ottenuti non sono stati molto incoraggianti poiché non è stato ottenuto alcun prodotto di amplificazione utilizzando le combinazioni di primer ALID0562-ALID0564 e M13_F-M13_R; utilizzando la combinazione ALID0563-ALID0564 invece, è stata ottenuta una sola banda di 1168 bp per tutti i campioni analizzati (LS11 WT, auxotrofo Rgpo1, putativi trasformanti e vettore pPZP-URA5) corrispondente al gene nativo *URA5* (dati non mostrati).

Dopo l'analisi PCR, per confermare e quantificare l'integrazione del T-DNA nel genoma di entrambi gli auxotrofi utilizzati per la AMT, sono stati effettuati diversi *Southern blot*. In tutti i casi il DNA genomico è stato digerito con ClaI e come sonda è stata utilizzata la porzione di T-DNA compresa tra i primer M13_F e M13_R. Come è possibile notare in figura 29 D, per i trasformanti generati a partire dall'auxotrofo AIS2, è stata ottenuta in tutti i campioni analizzati una banda di ibridazione di 4.47 Kb corrispondente al gene nativo *URA5* dell'auxotrofo AIS2 (*lane* 1) e, in corrispondenza dei trasformanti prototrofi (*lanes* 2-13) sono state ottenute una o più bande di ibridazione corrispondenti alle inserzioni di T-DNA. In particolare, sono state ottenute per lo più singole inserzioni anche se in alcuni casi sono presenti due inserzioni di T-DNA (*lanes* 10 e 11); inoltre, in diversi casi (come per esempio nelle *lanes* 3 e 5), sono state ottenute bande di ibridazione di intensità minore che potrebbero essere dovute a digestioni parziali oppure a ibridazioni aspecifiche. Per Rgpo1 e i putativi trasformanti prototrofi da esso derivati invece (Fig. 29 B), è stata ottenuta ibridazione solo in corrispondenza della sonda (*lane* 14), dove è presente anche una banda aspecifica di circa 900 bp. Sorprendentemente, nonostante le sequenze dei geni *URA5* di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 e *R. kratochvilovae* LS11 siano identiche tra loro non è stata ottenuta ibridazione nemmeno sul gene *URA5* nativo (Fig. 29 B).

Come ulteriore conferma dei risultati ottenuti, cioè la effettiva trasformazione del solo auxotrofo AIS2 di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481, è stata eseguita un'ulteriore analisi *Southern blot* caricando sullo stesso gel DNA genomico digerito con ClaI e

corrispondente ai putativi trasformanti prototrofi derivanti sia dall'auxotrofo AIS2 che da Rgpo1. Anche in questo caso è stata ottenuta ibridazione solo in corrispondenza dei prototrofi di AIS2 (*lanes* 14-18), mentre per quelli derivati da Rgpo1 (*lanes* 2-13) non è stata ottenuta alcuna ibridazione (Fig 29 F).

Per quanto riguarda l'agente di biocontrollo *R. kratochvilovae* LS11, questi risultati indicano che, come ottenuto nel caso dei vettori recanti *marker* codificanti per la resistenza ad antibiotici, non è stata ottenuta integrazione di T-DNA esogeno nel genoma del putativo auxotrofo Rgpo1 derivato da LS11. Per quanto riguarda *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 invece, questi risultati confermano che il sistema di trasformazione basato sull'utilizzo del *marker URA5* può essere utilizzato con successo per la generazione di un *pool* di mutanti inserzionali da sottoporre a *screening* per la loro capacità di degradare la patulina.

8.4.1 - Degradazione della patulina da parte dei trasformanti prototrofi derivati dall'auxotrofo *Sporobolomyces* sp. AIS2

Dei circa 5000 trasformanti prototrofi ottenuti dalla AMT dell'auxotrofo AIS2 di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481, circa 3200 di questi sono sottoposti a *screening* per la loro capacità di degradare 100 μg/ml di patulina. La fase di *screening* inizialmente è stata eseguita utilizzando il biosaggio messo a punto da Wright *et al.* (2008) basato sulla sensibilità del batterio *E. coli* DH5α alla patulina ed alla sua insensibilita ai prodotti di degradazione della micotossina (par 7.5.6). In breve, la presenza di un alone di inibizione di crescita di *E. coli* DH5α indica che la patulina è ancora presente nel terreno di incubazione, mentre la crescita del batterio indica che la micotossina è degradata a DPA, che non causa inibizione e la formazione dell'alone (Fig. 11).

Dopo lo *screening* mediante biosaggio, 15 trasformanti che, diversamente dal ceppo WT, che avevano causato un alone di inibizione di crescita di *E. coli* DH5α sono stati nuovamente testati nelle stesse condizioni di saggio monitorando il processo di degradazione della patulina mediante TLC. I risultati ottenuti confermano che i 15 trasformanti inizialmente individuati col biosaggio hanno un fenotipo differente dal ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. in quanto più lenti a degradare la patulina; per questa ragione sono stati denominati *slower patulin degraders*.

Parallelamente all'individuazione dei geni recanti l'inserzione di T-DNA mediante *inverse* PCR (par. 8.4.2) è stato nuovamente analizzato mediante TLC il *time course* della degradazione della patulina a 50 e 100 μg/ml da parte dei trasformanti selezionati. Sono stati predisposti due diversi tipi di esperimenti che prevedono uno l'inoculazione non

quantitativa delle cellule tramite stuzzicadenti sterile e l'altro l'inoculazione ad una concentrazione iniziale di cellule pari a $2*10^6$ UFC/ml.

Considerando l'inoculazione non quantitativa dei trasformanti *slower patulin degraders* mediante stuzzicadenti sterili, poiché dopo 9 giorni di incubazione la degradazione di 100 µg/ml di patulina era avvenuta solo per i ceppi WT *R. kratochvilovae* LS11 e *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (dati non mostrati), per poter studiare la degradazione della micotossina, si è deciso di utilizzare una concentrazione di 50 µg/ml. Dopo 4 giorni di incubazione statica a 24°C, la patulina è stata completamente degradata solo da *R. kratochvilovae* LS11 e *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 per i quali si nota la presenza dello *spot* di Rf pari a 0,46 corrispondente al DPA (Fig. 30, *lanes* 2 e 3, rispettivamente); tranne che in corrispondenza del trasformante Pink5 (*lane* 4), per tutti i trasformanti è presente sia lo *spot* della patulina (Rf = 0.58) sia quello del DPA. Dopo 7 giorni di incubazione, lo spot della patulina scompare parallelamente alla comparsa del DPA solo nella *lane* del trasformante 685c (*lane* 14), mentre dopo 9 giorni solo i trasformanti 123a, 164c, 523c, 685c e 985b (*lanes* 7, 12, 13, 14 e 18, rispettivamente) hanno completamente degradato la patulina (Fig. 30).

Negli esperimenti in cui i microrganismi sono stati inoculati a $2*10^6$ UFC/ml, a concentrazione di 100 µg/ml di patulina nessun trasformante è riuscito a svilupparsi (dati non mostrati). A 50 ppm, invece, si registra una crescita molto rallentata e, dopo 14 giorni di incubazione, in corrispondenza delle *lanes* di tutti i *slower patulin degraders* (*lanes* 4-18) è ancora presente lo *spot* della patulina (Fig. 30).

I risultati di queste prove di degradazione, confrontati con i dati di crescita (non mostrati), indicano chiaramente che tutti i trasformanti *slower patulin degraders* selezionati sono più lenti del ceppo WT di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 nel degradare la patulina a causa di una maggior sensibilità all'effetto tossico della micotossina che ne inibisce la crescita e, di conseguenza, la degradazione.

8.4.2 - Caratterizzazione genetico-molecolare dei mutanti *slower patulin degraders*

In questo paragrafo sono riportate le analisi del numero di inserzioni di T-DNA (*Southern blot*) nei trasformanti *slower patulin degraders* e le sequenze dei geni disattivati identificate mediante *inverse* PCR e *plasmid rescue*.

Il DNA genomico per il *Southern blot* è stato digerito con ClaI che non presenta siti di restrizione all'interno del T-DNA. Come si può notare in figura 31, sia per il ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. che per l'auxotrofo *ura5* AIS2 è stata ottenuta una banda di ibridazione di 4.6 Kb e 4.47 Kb corrispondente, rispettivamente, al gene nativo *URA5* e a quello mutato a causa della delezione di 129 bp (par. 8.3) presente nel gene dell'auxotrofo AIS2.

In tutti i trasformanti *patulin slower degraders* è presente, come atteso, la stessa banda di 4.47 Kb dell'auxotrofo AIS2, corrispondente al gene *ura5* mutato, e in più sono presenti altre bande di ibridazione corrispondenti alle inserzioni di T-DNA recanti il gene *URA5* introdotto con la AMT. In particolare, di quindici trasformanti analizzati, cinque (Fig. 31, trasformante 5a_*lane* 4, trasformante 870a_*lane* 10, trasformante 954a_*lane* 12, trasformante 630b_*lane* 13, trasformante 523c_*lane* 16) presentano più di un inserzione di T-DNA, mentre nei restanti dieci è presente una sola inserzione. Come accennato nel paragrafo introduttivo 5.2, la presenza di più di una singola inserzione di T-DNA esogeno rende molto difficile trovare una corrispondenza tra il gene disattivato e il fenotipo osservato. Inoltre, lo studio dei mutanti inserzionali di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481, è reso ancora più difficoltoso per l'assenza di un sistema di segregazione genetica che permetterebbe di assegnare in modo inequivocabile, mediante analisi fenotipica della progenie ottenuta in seguito ad incrocio, il legame tra fenotipo mutante e funzione del gene recante l'inserzione di T-DNA.

Tutti gli *slower patulin degraders* identificati sono stati sottoposti a *inverse* PCR per cercare di ottenere le sequenze dei geni disattivati dalle inserzioni di T-DNA. La posizione di alcune delle inserzioni di T-DNA è stata identificata all'interno della sequenza del genoma di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (Fig. 32). In alcuni casi sono state identificate le sequenze fiancheggiante entrambi i bordi del T-DNA inserito, mentre in altri ne è stata identificata solo una, ciò a seconda dell'enzima utilizzato per la digestione del DNA genomico sottoposto a *inverse* PCR o a *plasmid rescue.* Le sequenze ottenute sono state confrontate mediante analisi Blastx con le sequenze presenti sul database di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (http://genome.jgi-psf.org/Sporo1/Sporo1.home.html), di

S. cerevisiae (SGD, *Saccharomyces* genome database, http://www.yeastgenome.org/) e quelle presenti sul sito del *National Center for Biotechnology information* (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Il confronto delle sequenze ottenute con quelle di altri organismi è stato necessario per risalire alla natura e alla funzione dei geni identificati, poiché il database di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 è ancora in fase di aggiornamento e, nella maggior parte dei casi, non fornisce informazioni relative alla sigla utilizzata per indicare i geni e alle loro funzioni. Di conseguenza, è stato utilizzato il nome del gene di *S. cerevisiae* col più elevato grado di omologia (Tab. 14), mentre per l'indicazione del fenotipo mutante sono state applicate le regole riconosciute a livello internazionale. Per esempio, nel gene *URA5* codifica la proteina Ura5, isolati recanti un inserzione *random* di DNA esogeno oppure mutanti ottenuti in seguito a mutagenesi mirata (*gene replacement*) vengono indicati come *ura5::T-DNA* e *ura5*Δ, rispettivamente.

La funzione presunta dei geni disattivati dall'inserzione di T-DNA è riportata in Tab. 14. Per valutare le conseguenze fenotipiche delle mutazioni di geni ipoteticamente coinvolti nella resistenza allo stress ossidativo i trasformanti sono stati incubati con perossido di idrogeno e il *tert-butyl hydroperoxide* (tBOOH) (Fig. 33). Per testare il corretto funzionamento di parete cellulare e membrana plasmatica, i trasformanti sono stati incubati in presenza del detergente SDS, mentre per accertare la funzione di geni coinvolti nel corretto funzionamento dei microtubuli è stato utilizzato il fungicida tiabendazolo (TBZ) (Fig. 34). Infine, per identificare geni coinvolti nello sviluppo a temperature non permissive è stata valutata la capacità di recupero della crescita dei trasformanti dopo 16 ore di incubazione a 37°C. In generale, con quest'ultima analisi fenotipica vengono identificati diverse classi di geni che ricoprono ruoli distinti nella cellula, come per esempio geni coinvolti nel meccanismo di *splicing* (per esempio *SAD1*) degli introni, geni coinvolti nella sintesi della parete cellulare (per esempio *CHS7*) e geni coinvolti nei processi di endocitosi (per esempio *TGL1*) in *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (Ianiri *et al.,* inviato per la pubblicazione).

Di seguito si riportano i risultati ottenuti per i trasformanti 34a, 40a, 596a, 938a e 958b recanti una singola inserzione di T-DNA (Fig. 31, *lanes* 6, 7, 9, 11 e 14, rispettivamente) nella ORF dei geni *CYB5, YCK2, PAC2, ECM38* e del gene che codifica per la proteina con ID 28891, rispettivamente (Fig. 32). La singola integrazione del T-DNA ha permesso di stabilire la relazione tra i geni disattivati dall'inserzione di T-DNA e la risposta fenotipica osservata.

Il trasformante 34a (Fig. 31, *lane* 6) reca un'inserzione di T-DNA nell'omologo di *S. cerevisiae CYB5* (Citocromo b5) (Fig. 32); questo gene è coinvolto nel *pathway* biosintetico di steroli e lipidi e agisce come donatore di elettroni nel processo di desaturazione dello sterolo tra il carbonio 5 e 6, codificato dal gene *ERG3* (Truan *et al.* 1994; Lamb *et al.,* 1999) (Tab. 14). Fenotipicamente il trasformante 34a (*cyb5::T-DNA*) mostra sensibilità all'SDS (Fig. 34), una limitata sensibilità al tBOOH (Fig. 33) e non risulta sensibile al perossido di idrogeno (Fig. 33), allo stress causato dall'esposizione a 37°C (Fig. 34) e al TBZ (Fig. 34 B).

Il trasformante 40a (Fig. 31, *lane* 7) presenta un'inserzione di T-DNA nel primo esone dell'omologo di *S. cerevisiae YCK2* (Fig. 32). Yck2 (Yeast Casein Kinase 2) è una proteina associata con la membrana plasmatica e viene inclusa nella famiglia *Casein Kinase 1* (CK1) *Protein Kinase;* insieme con il suo omologo Yck1, è richiesta per diverse funzioni, come per esempio la morfogenesi, la citocinesi, l'endocitosi e altre funzioni cellulari. Blankenship *et al.* (2010) gli attribuiscono anche un ruolo indiretto nella biogenesi della parete cellulare in quanto regolatore del flusso di carboidrati nel corrispettivo *pathway* biosintetico (Tab. 14). Fenotipicamente il trasformante 40a (*yck2::T-DNA*) mostra sensibilità al perossido di idrogeno (Fig. 33) e all'SDS (Fig. 34), mentre è in grado di svilupparsi come il WT su tBOOH (Fig. 33) e dopo esposizione per 16 h a 37°C (Fig. 34).

Per il trasformante 596a il T-DNA si è inserito nel primo esone dell'omologo *PAC2* di *S. cerevisiae*. Per questo trasformante nel *Southern blot* è stata ottenuta una sola banda di ibridazione (Fig. 31, *lane* 9); è possibile che la grandezza del frammento di ibridazione corrispondente al T-DNA inserito nel gene *PAC2* sia simile a quella del frammento di ibridazione relativo al gene *ura5* nativo (4.47 Kb). Inoltre, dalla sequenza ottenuta mediante *inverse* PCR si evince che il T-DNA si è integrato in modo inusuale in quanto sia dopo il *border* destro che sinistro del T-DNA si trova la stessa sequenza di basi GACCTAC (Fig 32, basi sottolineate).

Come riportato sul database di *S. cerevisiae*, Pac2 è un effettore dei microtubuli richiesto per la formazione di eterodimeri con la α e β-tubulina e per la normale funzione dei microtubuli (Hoyt *et al.,* 1997) (Tab. 14). Fenotipicamente, il mutante 596a (*pac2::T-DNA*) è l'unico sensibile al TBZ (Fig. 34 B), che agisce appunto impedendo la polimerizzazione dei microtubuli; è sensibile inoltre, allo stress ossidativo causato da perossido di idrogeno e tBOOH (Fig. 33), all'SDS e mostra anche bassa capacità di recupero dopo esposizione a 37°C per 16 ore (Fig. 34).

Il trasformante 938a presenta come detto anch'esso una sola inserzione di T-DNA (Fig. 31, *lane* 11). In questo caso la sequenza del gene interrotto dall'inserzione di T-DNA è stata ottenuta mediante *plasmid rescue* (par. 5.3.1 e 7.5.6); tuttavia, a causa della bassa qualità delle sequenze ottenute, non è stata individuata l'esatta posizione di entrambi i bordi del T-DNA e quindi non è stato possibile rappresentare graficamente la situazione del trasformante 938a in figura 32. Il gene recante l'inserzione di T-DNA corrisponde all'omologo *ECM38* di *S. cerevisiae* che codifica per una *gamma-glutamyl transpeptidase*, enzima coinvolto nel turnover del glutatione (Kumar *et al.*, 2003) (Tab. 14). Fenotipicamente il trasformante 938a (*ecm38::T-DNA*) risulta sensibile al perossido di idrogeno e al tBOOH (Fig. 33), all'SDS e mostra anche bassa capacità di recupero dopo esposizione a 37°C per 16 ore (Fig. 34).

Il trasformante 958b reca un'inserzione di T-DNA (Fig. 31, *lane* 14) nel terzo esone del gene che codifica per la proteina con ID 28891 (Fig. 32). Sui diversi database non sono state trovate molte informazioni riguardanti questo gene; sul database di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 è riportato che codifica per una chitinasi coinvolta nel trasporto e metabolismo dei carboidrati (Tab. 14). In *S. cerevisiae* corrisponde ad una proteina la cui funzione non è stata ancora determinata (YJR098C) e sul database NCBI corrisponde ad una *hypothetical protein* con funzione sconosciuta in diversi organismi quali *K. lactis, P. chrysogenum, A. niger* e *A. flavus, Zygosaccharomyces roux,* ecc. Fenotipicamente il trasformante 985b mostra sensibilità solo all'SDS (Fig. 34), mentre presenta la stessa risposta fenotipica del ceppo WT su perossido di idrogeno, tBOOH (Fig. 33) e dopo esposizione a temperatura di 37°C per 16 h (Fig. 34).

I trasformanti Pink5, 18a, 123a, 164c e 685c presentano una sola inserzione di T-DNA (Fig. 20, *lanes* 3, 5, 8, 15 e 17, rispettivamente). Tuttavia, nei trasformanti 123a e 164c il T-DNA si è inserito tra due geni adiacenti, mentre per i trasformanti Pink5 e 685c i due bordi del T-DNA si sono inseriti separatamente in posizioni diverse del genoma. Perciò per ognuno di questi trasformanti, diversamente da quelli appena descritti, sulla base della risposta fenotipica osservata si è cercato di stabilire quale tra i due geni potenzialmente "colpiti" dal T-DNA fosse stato inattivato.

Il trasformante 123a (Fig. 31, *lane* 8) presenta un'inserzione di T-DNA tra due geni adiacenti, corrispondenti agli omologhi di *S. cerevisiae TPK2* e *CDC24*. Analizzando l'esatta posizione del bordo destro del T-DNA (l'unico ottenuto con la *inverse* PCR, fig. 32), è possibile notare che questo si è inserito 91 basi a valle del codone di stop (TAA) del gene *TPK2* e 380 basi a monte del codone di inizio (ATG) del gene *CDC24*. Il gene *TPK2*

codifica per la *protein kinase* Tpk2, effettore del *cAMP (cyclic adenosine 5'-monophosphate)-dependent protein kinase pathway* (Toda *et al.,* 1987). CDC24 invece, è un fattore di scambio di guanine (GEF = *guanine nucleotide exchange factor*) per Cdc42 nel Ras (*Rat Sarcoma*) *signaling pathway* (Maeng *et al.,* 2010) (Tab. 14). Entrambi i geni rivestono un ruolo importantissimo in molti processi cellulari quali la differenziazione cellulare e la risposta ai nutrienti e agli stress. Fenotipicamente il trasformante 123a è sensibile al perossido di idrogeno, al tBOOH (Fig. 33) e all'SDS (Fig. 34), mentre presenta la stessa risposta fenotipica del ceppo WT dopo esposizione a temperatura di 37°C per 16 h (Fig. 34).

Il trasformante 164c (Fig. 31, *lane* 15), come il trasformante 123a, presenta un'inserzione di T-DNA tra due geni adiacenti: 155 basi a monte del gene *NAR1* (*Nuclear Architecture Related*) e 237 basi a monte del gene *GYP7* (Fig. 21). *NAR1* è un gene essenziale in *S. cerevisiae* ed è richiesto per la maturazione post-traduzionale delle proteine ferro-solfato (FeS *protein*) e per la resistenza allo stress ossidativo (Fujii *et al,* 2009). *GYP7* è coinvolto nella regolazione del traffico vescicolare di proteine ed è una *GTPase-activating protein* per le proteine della Rab *family* (le proteine Rab sono coinvolte in diverse fasi nel traffico vescicolare tra citosol e membrane plasmatiche) (Vollmer *et al.*, 1999; Eitzen *et al.,* 2000) (Tab. 14). Fenotipicamente il trasformante 164c mostra sensibilità solo all'SDS (Fig. 34), mentre è in grado di svilupparsi come il ceppo WT in presenza di specie reattive dell'ossigeno (Fig. 33) e dopo esposizione per 16 h a 37°C (Fig. 34).

Per il trasformante Pink5 (Fig. 31, *lane* 3) il bordo destro del T-DNA si è inserito nel gene *VPS8* (*Vacuolar Protein Sorting*) mentre il bordo sinistro si è inserito a circa 155 Kb dal precedente in una parte del genoma dove non sono presenti regioni codificanti (Fig. 32). Vps8 è una proteina vacuolare di membrana necessaria per il traffico vescicolare tra il Golgi e gli endosomi (Horazdovsky *et al.,* 1996) e tra gli endosomi e i vacuoli e ricopre un ruolo fondamentale nella resistenza allo stress ossidativo (Martinez *et al.*, 2003) (Tab. 14). I risultati dei test di sensibilità mostrano che il trasformante Pink5 è caratterizzato da un'elevata sensibilità al perossido di idrogeno e al tBOOH (Fig. 33), un'elevata sensibilità all'SDS e una limitata capacità di recupero dopo crescita a temperature non permissive (37°C) (Fig. 34).

Il trasformante 685c (Fig. 31, *lane* 17) presenta anch'esso una sola inserzione di T-DNA. Tuttavia, la sequenza ottenuta mediante *inverse* PCR (DNA genomico digerito con NdeI, ligato e amplificato utilizzando i primer ai76 - ai77) rivela una modalità di

integrazione del T-DNA simile a quella del trasformante Pink5 in quanto i due bordi si sono inseriti separatamente in due siti genomici, in questo caso corrispondenti a geni diversi (Fig. 32). Il bordo sinistro si è inserito in posizione 118356 sullo scaffold 2 (gene che codifica per la proteina con ID 25175, scaffold_2:114304-119976), mentre una porzione del bordo destro in posizione 123682 dello scaffold 2 (gene che codifica per la proteina con ID 25176, scaffold_2:120398-133167). Il gene che codifica per la proteina con ID 25175 corrisponde all'omologo *IML1* di *S. cerevisiae*, un gene coinvolto nella crescita filamentosa di questo lievito (Kang e Jiang, 2005). Il gene che codifica per la proteina con ID 25176 invece, corrisponde all'omologo di *S. cerevisiae SSO1* che fa parte del complesso t-SNARE (***S**oluble **N**SF **a**ttachment **p**rotein **r**eceptors **t**arget*) della membrana plasmatica; sso1p è un omologo della sintaxina 1 ed è coinvolto nel trasporto e nella fusione delle vescicole sulla membrana plasmatica e nella fusione delle vescicole durante la sporulazione (Aalto *et al.*, 1993) (Tab. 14). Fenotipicamente il trasformante 685c mostra sensibilità all'SDS (Fig. 34), mentre non è sensibile alle specie reattive dell'ossigeno (Fig. 33) e allo stress causato da esposizione a 37°C per 16 h (Fig 33).

Nel caso del trasformante 18a, infine, che anche presenta una sola inserzione di T-DNA (Fig. 31, *lane* 5), non è stato ottenuto alcun prodotto di amplificazione in seguito ad *inverse* PCR condotta utilizzando diversi enzimi di restrizione per la digestione del DNA genomico. Fenotipicamente, il trasformante 18a mostra elevata sensibilità a entrambe le specie reattive dell'ossigeno utilizzate (Fig. 33), all'SDS e scarsa capacità di recupero della crescita dopo esposizione a 37°C per 16 h (Fig. 34).

I trasformanti 5a, 870a, 954a, 630b e 523c presentano inserzioni multiple di T-DNA (Fig. 31, *lanes* 4, 10, 12, 13 e 16, rispettivamente) e di conseguenza risulta problematico stabilire quale dei geni disattivati dalle inserzioni di T-DNA è responsabile del fenotipo mutante osservato. Ciò nonostante, tutti e cinque questi trasformanti sono stati sottoposti ad *inverse* PCR per cercare di individuare alcuni dei geni disattivati dall'inserzione di T-DNA.

I trasformanti 5a, 870a e 630b presentano due inserzioni di T-DNA (Fig. 31, *lanes* 4, 10 e 13). Per i trasformanti 5a e 630b, nonostante siano stati utilizzati diversi enzimi di restrizione per la digestione del DNA genomico da sottoporre a *inverse* PCR, non sono stati ottenuti prodotti di amplificazione corrispondenti ai geni recanti l'inserzione di T-DNA. Per il trasformante 870a, invece, il prodotto di amplificazione della *inverse* PCR ottenuto corrisponde ad una porzione dello *scaffold* 9 dove non sono presenti regioni codificanti (Fig. 32). Dai test di sensibilità effettuati è emerso che i trasformanti 5a e 870a

mostrano lo stesso fenotipo del ceppo IAM 13481 WT su tutti i composti utilizzati (Fig. 33, 34), mentre il trasformante 630b mostra solo una limitata sensibilità al detergente SDS (Fig. 33, 34).

Il trasformante 954a (Fig. 31, *lane* 12) presenta tre inserzioni di T-DNA. Uno dei tre geni interrotti è stato ottenuto mediante *inverse* PCR. L'analisi della sequenza mostra che in questo caso l'inserzione non è limitata solo ai bordi del T-DNA ma comprende anche la porzione del plasmide pPZP-URA5 oltre il bordo sinistro. La sequenza ottenuta corrisponde all'omologo *MCM1* di *S. cerevisiae.* Questo gene, essenziale in *S. cerevisiae* e *C. albicans*, ricopre un ruolo pleiotropico nelle cellule perché coinvolto in molte funzioni cellulari, incluso il controllo del ciclo cellulare, la struttura della membrana e della parete cellulare, il *mating*, l'osmotolleranza e la resistenza agli stress esterni, incluso lo stress ossidativo (Kuo *et al.,* 1994; Messenguy e Dubois 2003, Shapira *et al.* 2004) (Tab. 14). Fenotipicamente il trasformante 954a è sensibile al perossido di idrogeno, al tBOOH (Fig. 33), all'SDS e mostra anche limitata capacità di recupero dopo esposizione a 37°C per 16 ore (Fig. 34). Poiché per questo trasformante sono presenti tre inserzioni di T-DNA, non è da escludere che le risposte fenotipiche ottenute possono essere dovute al non corretto funzionamento di uno o tutti i geni (considerati singolarmente o nel complesso) recanti l'inserzione di T-DNA.

Il trasformante 523c presenta 3 inserzioni di T-DNA (Fig. 31, *lane* 16). Anche in questo caso mediante *inverse* PCR è stata ottenuta la sequenza di un solo gene recante l'inserzione di T-DNA. Questa si trova in una porzione del genoma dove non sono presenti regioni codificanti (Fig. 32); in particolare, è situata 842 basi a monte dell'omologo *HMN1* di *S.cerevisiae* e a 1220 basi a monte dell'omologo *RPS19A*. *HMN1* codifica per un trasportatore di colina e etanolamina, rispettivamente precursori per la biosintesi di fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, principali componenti dei fosfolipidi di membrana (Nikawa *et al.,* 1986, 1990). La proteina Rps19a, invece, è un componente della sub-unità ribosomale 40S ed è richiesta per l'assemblaggio e la maturazione dei precursori della sub-unità 40S (Leger-Silvestre *et al.*, 2005). Fenotipicamente il trasformante 523c è sensibile solo all'SDS (Fig. 34) mentre mostra la stessa risposta fenotipica del ceppo IAM 13481 WT su perossido di idrogeno, tBOOH (Fig. 33) e dopo esposizione a 37°C per 16 h (Fig. 34). Poiché per questo trasformante sono presenti tre inserzioni di T-DNA, non è da escludere che le risposte fenotipiche ottenute siano determinate anche dalle altre inserzioni.

8.5 - Mutagenesi mirata (*gene replacement*)

8.5.1 - Generazione dei costrutti per la mutagenesi mirata del gene *VPS8*

Gli esperimenti di mutagenesi mirata a carico del gene *VPS8* sono stati condotti per confermare che il fenotipo osservato per il trasformante Pink5 fosse effettivamente dovuto alla disattivazione di questo gene causata dall'inserzione del T-DNA. Nel caso di questo trasformante, come conseguenza di possibili fenomeni di riarrangiamento, i due bordi del T-DNA si sono inseriti in posizioni differenti del genoma (Fig. 32; par. 8.4.2) e quindi le risposte fenotipiche osservate (Fig. 30, 33, 34) potrebbero essere dovute al non corretto funzionamento dei geni (tra cui *VPS8*) interessati dalle inserzioni dei due frammenti del T-DNA. In assenza di un sistema di segregazione genetica (vedi par. 8.4.2) che permette di assegnare in modo inequivocabile il legame tra fenotipo osservato e gene disattivato (Fig. 9), l'unico modo per identificare il gene responsabile del fenotipo mutante, quindi per legare un gene ad una specifica funzione, è disattivare il gene in modo mirato (*gene replacement*) e confrontare il fenotipo del mutante delezionale (in questo caso *vps8*Δ) con quello generato mediante mutagenesi inserzionale (in questo caso *vps8::T-DNA*) (Fig. 37).
Per la mutagenesi mirata del gene *VPS8* inizialmente è stata eseguita la *overlap* PCR (par. 5.1.1 e 7.6.1). Dal DNA genomico di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 sono stati ottenuti mediante PCR tre frammenti di 1168 bp, 1098 bp e 1802 bp corrispondenti rispettivamente alle porzioni 5' e 3' del gene *VPS8* e al gene *URA5*. I tre frammenti generati, utilizzati in proporzioni equimolari, sono stati sottoposti a PCR (*overlap* PCR) utilizzando i primer 1.VPS8 - 4.VPS8 al fine di ottenere un solo prodotto di amplificazione (i.e. costrutto *vps8::URA5*) avente la grandezza pari alla somma dei tre prodotti utilizzati come templato (4032 bp), come descritto nel paragrafo 5.1.1. Il frammento di amplificazione atteso però, non è stato ottenuto ed è stato necessario testare l'applicabilità delle altre due tecniche (*Double Joint* PCR e ricombinazione *in vivo* in *S. cerevisiae*) riportate nel paragrafo introduttivo 5.1.1.
Con la *Double Joint* PCR, dopo la prima PCR sono stati ottenuti 4 prodotti di amplificazione di 1168 bp, 1098 bp, 847 bp e 1168 bp corrispondenti rispettivamente alle porzioni 5' e 3' dei geni *VPS8* e *URA5* (Fig 35 A). I due frammenti 5' e i due frammenti 3' sono stati sottoposti separatamente a PCR e i prodotti di amplificazione ottenuti, corrispondenti alle porzioni 5' (2015 bp) e 3' (2226 bp) della cassetta per la mutagenesi

mirata (indicati come *Double Joint*) (Fig 35 B), sono stati precipitati su microparticelle d'oro di 0,8 micron per la trasformazione mediante biolistica dell'auxotrofo *ura5* AIS2.

Per la ricombinazione *in vivo* in *S. cerevisiae*, le porzioni 3' e 5' del gene *VPS8* e il gene *URA5* sono stati ottenuti mediante PCR dal DNA genomico di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481; i tre frammenti ottenuti, rispettivamente di 1145 bp, 1215 bp e 1802 bp (Fig 35 C, *lanes* 1, 2 e 3), sono stati utilizzati per trasformare il ceppo FY834 di *S. cerevisiae.* Il costrutto *vps8::URA5*, corrispondente al prodotto di amplificazione di 4126 bp (Fig 35 C, *lane* 4), è stato ottenuto mediante PCR dal DNA genomico estratto da un *pool* di trasformanti di *S. cerevisiae*.

Per entrambi i metodi, l'integrazione del costrutto generato dovrebbe rimpiazzare una porzione di 1756 bp al centro del gene *VPS8*, creando il mutante delezionale *vps8*Δ (Fig. 35 D).

8.5.2 - Analisi genetico-molecolare dei putativi mutanti *vps8*Δ ottenuti

Negli esperimenti di mutagenesi mirata del gene *VPS8,* sono stati ottenuti 4 trasformanti prototrofi seguendo la procedura della *Double Joint* PCR e 6 utilizzando il costrutto amplificato dal plasmide pRS426 di *S. cerevisiae* FY834. Da tutti e dieci i trasformanti è stato estratto il DNA genomico e l'avvenuta integrazione nel locus *target* è stata accertata mediante analisi PCR, sequenziamento dei prodotti PCR ottenuti e analisi *Southern blot* (Fig. 35 E-I; Fig. 36).

Per le analisi PCR sono stati disegnati due primer (outVPS8_F e outVPS8_R) distanti circa 200 bp dai primer 1.VPS8 e 4.VPS8 utilizzati per originare il costrutto *vps8::URA5* (Fig. 35 D); tali primer, utilizzati in combinazione con primer disegnati all'interno del gene *marker URA5* (ALID0562, ALID0563 e DoubleJoint URA5_R), dovrebbero dare prodotti di amplificazione solo per i mutanti *vps8* originati in seguito a eventi di ricombinazione omologa.

Dalla PCR effettuata utilizzando il primer outVPS8_R in combinazione con i primer ALID0563 (Fig 35 E) e ALID0562 (Fig 35 F), sono stati ottenuti i prodotti di grandezza attesa (2425 e 3025 bp, rispettivamente) solo per due trasformanti (*lanes* 7 e 10) generati con il costrutto *vps8::URA5* ottenuto dal plasmide di *S. cerevisiae;* per la PCR effettuata utilizzando la combinazione di primer outVPS8_R - ALID0563, sono stati ottenuti altri due prodotti PCR di 1200 e 1500 bp nel caso di un altro trasformante ottenuto seguendo la procedura della *Double Joint* PCR (Fig 35 E, *lane* 3).

Utilizzando il primer outVPS8_F in combinazione con il primer DoubleJoint URA5_R, è stata ottenuta la banda di grandezza attesa (2415 bp) per tre trasformanti (Fig 35 G, *lanes* 4, 7 e 10), di cui uno è stato ottenuto mediante *Double Joint* PCR (*lane* 4) e i restanti due con il costrutto amplificato dal plasmide di *S. cerevisiae* FY834 (*lanes* 7 e 10); oltre alla banda attesa sono state ottenute anche altre bande da considerare aspecifiche perché non ottenute in condizioni di amplificazione più stringenti (temperatura di *annealing* di 55°C invece che 50°C) (dati non mostrati).

Per quanto riguarda la PCR condotta con le combinazioni di primer 1.VPS8- 4.VPS8 e outVPS8_F - outVPS8_R i risultati ottenuti sono poco informativi in quanto, essendo la porzione del gene *VPS8* da rimpiazzare (1756 bp) poco più piccola di quella del gene *URA5* (1766 bp) (Fig 35 D), non è stata ottenuta un'evidente differenza tra le bande ottenute (dati non mostrati).

Riassumendo, seguendo la procedura della *Double Joint PCR*, apparentemente in un trasformante ottenuto la ricombinazione omologa è avvenuta solo a carico della porzione 5' del gene *VPS8* (Fig. 35 G, *lane* 4); in un altro, probabilmente tra le regioni 3' del gene *VPS8* e del gene *URA5* sono avvenuti eventi di ricombinazione omologa difficilmente interpretabili (Fig. 35 E, *lane* 3). Nel caso dei trasformanti ottenuti con il costrutto amplificato dal plasmide pRS426 di *S. cerevisiae* FY834*,* come conseguenza dell'avvenuta ricombinazione omologa nel locus *VPS8*, è possibile notare in corrispondenza delle *lanes* 7 e 10 (Fig. 35 E- G) la presenza di prodotti di amplificazione della grandezza attesa, come conseguenza dell'avvenuta ricombinazione omologa nel locus *VPS8*.

Per i due trasformanti (Fig. 35 E-G, *lanes* 7 e 10) risultati positivi alle PCR, i prodotti di amplificazione ottenuti con i prime outVPS8_F – DoubleJoint URA5_R e outVPS8_R - ALID0563 sono stati sequenziati presso il DNA Core Facility dell'*University of Missouri, Columbia.* Per i trasformanti 6 e 9 (cosi come indicati in figura 36 e corrispondenti rispettivamente alle *lanes* 7 e 10 di figura 35 E-G) le sequenze ottenute con i primer outVPS8_F e outVPS8_R corrispondono perfettamente a quelle riportate nel database [Fig. 25 A (box a) – B (box c)]; ciò conferma l'integrazione del costrutto *vps8::URA5* nel *locus target*; in A e C (box b) sono riportate le giunzioni in 5' tra il gene *VPS8* e il gene *URA5* ottenute dal sequenziamento effettuato con il primer DoubleJoint URA5_R. Mancano le giunzioni in 3' tra il gene *URA5* e il gene *VPS8* a causa della cattiva qualità della sequenza ottenuta con il primer ALID0563.

Per l'analisi *Southern blot* dei dieci trasformanti ottenuti, i DNA genomici sono stati digeriti con HindIII (Fig 35 H), mentre come sonda è stata utilizzata la porzione del gene

VPS8 ottenuta mediante PCR dal DNA genomico di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 utilizzando i primer 1.VPS8 - 4.VPS8. Dato che l'enzima HindIII non taglia in corrispondenza della regione del gene *VPS8* coperto dalla sonda, sulla base delle sequenze riportate sul database di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481, si dovrebbe ottenere una banda di 19822 bp per il ceppo WT e 2 bande di 17612 e 2211 bp per i mutanti *vps8*Δ. In figura 35 D è riportato uno schema che mostra il locus *VPS8* (in alto), il costrutto *vps8::URA5* (al centro) e l'integrazione di questo nel gene *VPS8* dopo gli eventi di ricombinazione omologa (in basso); è indicata inoltre, la posizione dei primer, della sonda e la posizione dei siti di riconoscimento degli enzimi di restrizione

La figura 35 H mostra che è stata ottenuta una banda di ibridazione maggiore di 12000 bp in tutti i campioni analizzati, ceppo WT incluso; queste potrebbero corrispondere alle bande attese (19822 bp per il ceppo WT e 17612 bp per i mutanti *vps8*Δ) ma, a causa delle grosse dimensioni, non sono state riscontrate appezzabili differenze. Inoltre, in tutti i campioni analizzati sono stati ottenuti *pattern* di ibridazione simili tra loro, il che può essere dovuto a una digestione parziale dei DNA genomici oppure ad ibridazioni aspecifiche. In corrispondenza delle *lanes* 3, 7 e 10 (l'ordine dei campioni corrisponde con quello riportato per le PCR precedenti, fig. 35 E -G) è presente la banda attesa di 2211 bp, anche se nella *lane* 7 si notano delle bande di ibridazioni dovute, probabilmente, alla presenza di più inserzioni del costrutto; per il trasformante corrispondente alla *lane* 3, non c'è corrispondenza tra i risultati delle PCR e quelli del *Southern blot*. Riepilogando, il trasformante corrispondente alla *lane* 10 è l'unico che potrebbe presentare una sola inserzione del costrutto nel locus *VPS8* anche se, nella figura 35 H, la banda di ibridazione di 2211 bp non è ben visibile a causa del forte segnale di ibridazione ottenuto nella *lane* 11.

Per accertare quale fosse effettivamente il mutante *vps8*Δ, è stato effettuato un altro *Southern blot* digerendo i DNA genomici con gli enzimi di restrizione PstI (che non taglia all'interno del gene *URA5*) e SpeI (di cui è presente un solo sito di riconoscimento nel gene *URA5*) (Fig. 35 D, I). Sulla base delle sequenze riportate sul database, per il ceppo IAM 13481 le bande attese dovrebbero essere due ,di 5349 e 4590 bp, mentre per i mutanti *vps8*Δ si dovrebbero ottenere tre bande di ibridazione di 4590, 3318 e 2035 bp. Come si può notare in figura 35 I per il ceppo IAM 13481 non trasformato (*lane* 1) sono state ottenute le due bande attese di 5349 e 4590 bp; le stesse però, sono state ottenute anche per i trasformanti originati utilizzando la *Double Joint* PCR (*lanes* 3 - 5) in corrispondenza dei quali, sono presenti anche altre bande di ibridazione aspecifiche di grandezza compresa tra

12000 e 7000 bp. Nella *lane* 6 sono state ottenute 4 bande di ibridazione di circa 9000, 6000, 5500 e 4000 bp, mentre nelle *lanes* 7 e 8 sono state ottenute due bande di circa 5500 e 4000 bp. Nella *lane* 11 si ha un *pattern* di ibridazione di difficile interpretazione, mentre in corrispondenza della *lane* 10 sono state ottenute le tre bande di ibridazione della grandezza attesa (circa 4600 bp, 3300 e 2000 bp) e un'altra banda di circa 5300 bp comune anche agli altri campioni. Nelle *lanes* 2 e 9 non è stata ottenuta alcuna banda di ibridazione probabilmente a causa della non adeguata quantità iniziale di DNA utilizzata.
Analizzando nel complesso i risultati ottenuti (PCR, sequenziamento e *Southern blot*), il trasformante corrispondente alla *lane* 10 delle PCR e dei Southern blot (Fig. 35; trasformante 9 in figura. 36,) è un possibile mutante *vps8*Δ recante una sola inserzione del costrutto *vps8::URA5* all'interno del locus *target*. Il trasformante corrispondente alla *lane* 7 delle PCR e dei *Southern blot* (Fig. 35; trasformante 6 in figura 36,) invece, potrebbe essere un mutante *vps8*Δ ma apparentemente presenta anche altre inserzioni del costrutto *vps8::URA5*. Per questa ragione è stato preso in considerazione per gli esperimenti successivi solo il trasformante 9 (Fig. 35 I, *lane* 10 delle PCR e dei *Southern blot*) indicato appunto come *vps8*Δ(9).

8.5.3 - Analisi fenotipica del mutante *vps8*Δ(9) ottenuto

Sono condotti diversi test per la valutazione fenotipica del mutante *vps8*Δ(9). Inizialmente sono stati condotti dei saggi di degradazione della patulina per confermare che la più lenta cinetica di degradazione della micotossina osservata per il trasformante Pink5 sia dovuta alla disattivazione del gene *VPS8*; la comparazione mediante analisi TLC è stata effettuata tra il trasformante Pink5 (*vps8::T-DNA*), il mutante *vps8*Δ(9) e il ceppo WT IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. Dopo 3 giorni di incubazione (Fig. 37 A), la minor intensità dello *spot* della patulina e la presenza di quello del DPA indica che il ceppo WT (Fig. 37 A, *lane* 1) degrada la patulina più rapidamente dei mutanti *vps8*. Inoltre, anche in corrispondenza del mutante *vps8*Δ(9) (Fig. 37 A, *lane* 4) sono visibili sia lo *spot* del DPA che quello della micotossina, sebbene quest'ultimo di intensità maggiore rispetto a quello del WT. Dopo 6 giorni di incubazione, la patulina è quasi completamente degradata dal ceppo WT di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481; in corrispondenza dei due putativi mutanti *vps8* [*vps8::T-DNA* e *vps8*Δ(9)] (Fig. 37 A, *lanes* 3 e 4, rispettivamente) è ben visibile lo *spot* della patulina e appena visibile quello del DPA, sebbene l'intensità di questo sia maggiore nel caso del putativo mutante *vps8*Δ(9) (Fig. 37 A, *lane* 4). Per confermare

questi dati è attualmente in corso il monitoraggio della degradazione della patulina da parte dei due mutanti *vps8* mediante analisi quantitativa HPLC.

Per quanto riguarda i test di sensibilità, invece, (Fig 37 B), per il mutante *vps8::T-DNA* generato mediante AMT sono stati confermati i risultati degli esperimenti precedenti discussi nel paragrafo 8.4.2 (Fig. 33, 34), mentre per il mutante *vps8*Δ(9) è stata osservata sensibilità solo all'SDS e in misura minore rispetto al rispettivo mutante inserzionale (Fig 37 B). Una risposta fenotipica simile a quella del mutante *vps8*Δ(9) è stata ottenuta in tutti i casi anche dal putativo mutante *vps8*Δ(6) (dati non mostrati).

In conclusione, i due mutanti *vps8* generati con tecniche di mutagenesi differenti non mostrano lo stesso fenotipo sia per quanto riguarda la cinetica di degradazione della patulina che i test di sensibilità.

8.5.4 - Generazione dei costrutti e trasformazione per la mutagenesi mirata dei geni *DLH* e *rDLH*

La ragione per la quale è stato deciso di generare dei mutanti per i geni codificanti due diverse proteine dotate di attività lattone idrolasica risiede nei meccanismi enzimatici della degradazione della patulina. In base al *pathway* degradativo della patulina ipotizzato dalla prof.ssa Rebecca Goss dell'Università di East Anglia (UK) e confermato dal gruppo della prof.ssa Rosa Duran Patron dell'Università di Cadice (Spagna) (dati non pubblicati), il primo *step* della degradazione della patulina consiste nell'idrolisi dell'anello lattonico della micotossina che potrebbe essere operata da un enzima con attività lattone idrolasica . (Fig. 38). Dalla ricerca effettuata sul database di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (http://genome.jgi-psf.org/Sporo1/Sporo1.home.html), è emerso che solo due geni codificano per enzimi requisiti con tali attività. Questi sono il gene *DLH,* localizzato sullo scaffold 2 (898177-899582) e classificato nel KOG *database* (*euKaryotic Orthologous Groups*) come "*Dienelactone hydrolase*" e il gene *rDLH* localizzato sullo scaffold 1 (391835-392101) e classificato nel KOG *database* come "*predicted hydrolase related to dienelactone hydrolase*" (*protein* ID 6066).

Per la generazione di costrutti per il *gene replacement* di questi due geni, è stata utilizzata solo la procedura che prevede la ricombinazione *in vivo* in *S. cerevisiae* FY834. Come è possibile notare in figura 39 A, per il gene *DLH* è stato generato un costrutto (*dlh::URA5*) di 4480 bp (*lane* 4) a partire dalle porzioni 5' (1384 bp) e 3' (1366 bp) del suddetto gene e dal gene *URA5* (1802 bp) (Fig. 39 A, *lanes* 1, 2 e 3, rispettivamente). Nello stesso modo, a partire dalle porzioni 5' (1293 bp) e 3' (1231 bp) del gene *rDLH* e dal gene *URA5* (1802 bp) (Fig. 39 B, *lanes* 1, 2 e 3, rispettivamente) è stato generato il costrutto *rdlh::URA5* (4290 bp) (Fig. 39 B, *lane* 4).

Per i geni *DHL* e *rDHL* l'integrazione dei rispettivi costrutti dovrebbe rimpiazzare una porzione di 241 bp e 134 bp al centro delle ORF dei due geni, rispettivamente.

I costrutti cosi ottenuti sono stati precipitati su microparticelle d'oro di 0,8 μm per la trasformazione biolistica dell'auxotrofo *ura5* AIS2 previamente disperso su terreno agarizzato YNB contenente sorbitolo 1M. I trasformanti sono stati ottenuti dopo 4-5 giorni di incubazione a 24°C.

8.5.5 - Analisi genetico-molecolare dei putativi mutanti *dlh*Δ

Per confermare l'integrazione del costrutto *dlh::URA5* nel locus *target*, 56 trasformanti sono stati sottoposti ad analisi PCR.

Utilizzando la combinazione di primer 7.DienelactoHydro_F–8.DienelactoHydro_R, disegnati rispettivamente nelle regioni 5' e 3' del costrutto *dlh::URA5,* sono state ottenute bande di 2385 bp per il ceppo WT non trasformato (Fig. 40 A *lane* 1) e per i trasformanti nei quali il costrutto si è integrato in un locus diverso da quello *target* (Fig. 40 A *lanes* 3, 8, 10, 11, 12 ecc.). Per i putativi mutanti *dlh*Δ, la banda di 2385 bp è stata rimpiazzata da una sola banda di 3910 bp (Fig. 40 A *lanes* 4, 14, 19, 31 e 56) indicante l'avvenuta ricombinazione omologa a carico del gene *target.* In molti altri casi (Fig. 40 A *lanes* 5, 6 , 7, 17, 25 ecc.) oltre alla banda di 3910 bp, è stata ottenuta anche una banda di 2385 bp e per questa ragione i corrispondenti trasformanti sono stati scartati. Per l'analisi *Southern blot* sono stati testati solo i trasformanti corrispondenti alle *lanes* 4, 14, 19, 31 e 56.

Al fine di confermare l'integrazione di una singola copia di costrutto nel *locus DLH*, i DNA genomici dei cinque trasformanti/putativi mutanti sono stati digeriti con KpnI e sottoposti ad analisi *Southern blot*. Dato che l'enzima KpnI non taglia in corrispondenza della regione del gene *DLH* coperto dalla sonda, sulla base delle sequenze riportate sul database di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 si dovrebbe ottenere una banda di 23000 bp per il ceppo WT e 3 bande di 20000 bp, 3677 bp e 340 bp per i mutanti *dlh*Δ.

Come si può notare dalla figura 40 B, è stata ottenuta una banda di ibridazione maggiore di 12000 bp in tutti i campioni analizzati, ceppo WT incluso; queste potrebbero corrispondere alle bande attese (23000 bp per il ceppo WT e 20000 bp per i mutanti *dlh*Δ). Tuttavia, a causa delle grosse dimensioni non sono appezzabili differenze nella loro grandezza. Inoltre, per i campioni corrispondenti alle *lanes* 2 e 6 (*lanes* 4 e 56 della PCR) sono state ottenute rispettivamente bande di circa 3700 e 4500 bp, mentre per quelli corrispondenti alle *lanes* 4 e 5 (*lanes* 19 e 31 della PCR) sono stati ottenuti *pattern* di ibridazione di difficile interpretazione. In nessun caso è stata ottenuta la banda attesa di 340 bp probabilmente a causa della bassa concentrazione del frammento di DNA e/o della bassa sensibilità del sistema di marcatura utilizzato. Tuttavia, i *pattern* di ibridazione più simili a quello atteso sono stati ottenuti per i campioni corrispondenti alla *lane* 2 e 6 del *Southern blot* (*lanes* 4 e 56 della PCR); di conseguenza, per i successivi esperimenti sono stati utilizzati il trasformante *dlh*Δ(3) [*lane* 4 della PCR (Fig. 40 A) e *lane* 2 del *Southern blot*

(Fig. 40 B)] e il trasformante *dlh*Δ(55) [*lane* 56 della PCR (Fig. 40 A) e *lane* 6 del *Southern blot* (Fig. 40 B)].

Per affermare con assoluta certezza l'integrazione del costrutto *dlh::URA5* nel gene *DLH* sarà necessario ripetere un altro *Southern blot* utilizzando un altro enzima per la digestione dei DNA genomici e un sistema più sensibile per la marcatura della sonda (i.e. P^{32}).

8.5.6 - Analisi genetico-molecolare dei putativi mutanti *rdlh*Δ

Mediante trasformazione biolistica condotta con il costrutto *rdlh::URA5* sono stati ottenuti circa 30 trasformanti; undici sono stati analizzati mediante PCR utilizzando i primer 1.7.OutDienelactoHydro_F e 1.8.OutDienelactoHydro_R (Tab. 14). Questi primer, come per l'analisi dei mutanti *vps8*Δ, sono stati disegnati circa 200 bp al di fuori della regione del gene *rDLH* compresa nel costrutto *rdlh::URA5*. Come si può notare dalla figura 40 C, è stata ottenuta la banda attesa di 3019 bp in corrispondenza del ceppo WT IAM 13481 (*lane* 1) e di alcuni trasformanti (*lanes* 8, 9, 10, 11 e 12). In corrispondenza delle *lanes* 4 e 7 la banda ottenuta per il ceppo WT è stata rimpiazzata da una banda di circa 6000; questa è stata ottenuta anche nella *lane* 2, dove però è presente anche la banda attesa di 4857 bp. In corrispondenza delle *lanes* 3 e 6 sono state ottenute entrambe le bande di 3019 bp e 6000 bp, mentre in corrispondenza della *lane* 5 sono state ottenute due ulteriori bande di circa 4000 e 5000 bp. I tre trasformanti/putativi mutanti *rdlh*Δ (Fig. 40 C, *lanes* 2, 4 e 7) che, come possibile conseguenza dell'avvenuta ricombinazione omologa a carico del gene *target* non presentano la stessa banda di amplificazione del WT, sono stati sottoposti ad analisi *Southern blot*.

A tal fine, i DNA genomici sono stati digeriti con l'enzima KpnI che non taglia in corrispondenza della regione del gene *rDLH* coperto dalla sonda; sulla base delle sequenze riportate sul database di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481, si dovrebbe ottenere una banda di 7000 bp per il ceppo WT e 3 bande di 4700 bp, 3500 bp e 340 bp per i mutanti *rdlh*Δ. In tutti i campioni, incluso il WT, è stata ottenuta la banda di 7000 bp; in più, per i trasformanti sono stati ottenuti *pattern* di ibridazione diversi da quello atteso (dati non mostrati). Per individuare i mutanti delezionali *rdlh*Δ è necessario quindi ripetere altre analisi PCR e/o *Southern blot*. Ciò nonostante, i trasformanti corrispondenti alle *lanes* 2 e 7 della PCR (Fig. 40 C), rispettivamente indicati come putativi *rdlh*Δ(7) e *rdlh*Δ(17), sono stati utilizzati nei successivi esperimenti di caratterizzazione fenotipica.

8.5.7 - Analisi fenotipica dei putativi mutanti *dlh*Δ e *rdlh*Δ

Dai saggi di degradazione della patulina effettuati (Fig. 41 A), è emerso che dopo tre giorni di incubazione, il ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. è stato leggermente più veloce di tutti e quattro i mutanti nella fase iniziale di degradazione. Infatti, lo *spot* di Rf pari a 0.58 corrispondente alla patulina è presente in tutti i campioni analizzati, ma è meno intenso in corrispondenza del ceppo WT; lo *spot* del DPA (Rf 0.46) è evidente sia in corrispondenza del WT che dei putativi mutanti *dlh*Δ(3), *dlh*Δ(55) e *rdlh*Δ(7) (*lanes* 3, 4 e 5), mentre per *rdlh*Δ(17) (*lane* 6) è presente solo lo *spot* della patulina. Dopo sei giorni di incubazione (Fig. 41 A), non sembrano esserci significative differenze tra la cinetica di degradazione della patulina osservata per il ceppo WT (*lane* 2) e quella osservata per i due putativi mutanti *dlh*Δ (*lanes* 3 e 4). Per i due putativi mutanti *rdlh*Δ invece (*lanes* 5 e 6), la presenza dello *spot* della patulina di intensità simile a quella dello standard (100 μg/ml) (*lane* 1) indica chiaramente che l'andamento della degradazione della tossina è molto più lento rispetto a quello del ceppo WT; inoltre, per il mutante *rdlh*Δ(17) (*lane* 6) lo *spot* del DPA è appena visibile. Nei test di sensibilità invece, (Fig. 41 B), il putativo mutante *dlh*Δ(3) è l'unico sensibile al perossido di idrogeno ed è il più sensibile all'SDS; gli altri tre mostrano sensibilità solo al detergente SDS e esibiscono la stessa risposta fenotipica del ceppo WT nelle altre condizioni testate (Fig. 41 B).

DISCUSSIONE

La micotossina patulina (Fig. 1), oggetto di studio in questa tesi, è prodotta principalmente da *Penicillium expansum*, agente del marciume verde azzurro delle pomacee in post-raccolta. La patulina è stata riscontrata in una vasta gamma di alimenti, principalmente frutta, e le pomacee e i prodotti derivati rappresentano l'alimento che è più soggetto a questo tipo di contaminazione. La IARC ha classificato la patulina nel *gruppo 3*, ovvero non classificabile come carcinogeno per l'uomo a causa della mancanza di dati certi. L'Unione Europea ha stabilito con il *Reg. CE 455-2004* i limiti massimi ammissibili di patulina in alcuni alimenti, tra cui succhi di frutta (50 μg/kg) e alimenti per l'infanzia (10 μg/kg) (Tab. 4) I limiti abbastanza restrittivi mirano a ridurre il rischio legato all'assunzione di derrate contaminate soprattutto da parte dei bambini, categoria più a rischio in caso di assunzione della micotossina.

Anche se l'utilizzo di fungicidi abbinato ad una adeguata conservazione delle pomacee riduce l'incidenza dei marciumi causati da *P. expansum*, una pur bassa percentuale di frutti viene infettata dal fungo. L'assenza di validi metodi di detossificazione relativi alla patulina (Avantaggiato *et al*., 2002) e l'utilizzo di frutti infetti da parte di alcune industrie di trasformazione, costituiscono le cause della contaminazione dei succhi di frutta e dei prodotti a base di pomacee con questa micotossina.

Soffermando l'attenzione sulla detossificazione biologica della patulina, in letteratura sono presenti esempi di degradazione microbica della micotossina. Il lievito *S. cerevisiae* in condizioni anaerobiche è in grado di degradare la patulina producendo due metaboliti, E-Ascladiolo (che è anche immediato precursore della micotossina nel suo *pathway* biosintetico in *P. expansum*, Moake *et al.,* 2005), e il suo isomero, Z-Ascladiolo (Fig. 2). (Moss e Long ,2002) Gli stessi due metaboliti vengono prodotti in seguito alla degradazione della patulina ad opera del batterio *Gluconobacter oxydans* (Ricelli *et al.*, 2007). Secondo Suzuki e collaboratori (1971) anche l'E-Ascladiolo è tossico, sebbene la sua tossicità sia quattro volte inferiore a quella della patulina, ma non è chiaro come questo livello di tossicità sia determinato dagli autori del lavoro.

Castoria *et al.* (2005) hanno dimostrato che il BCA *R. kratochvilovae* ceppo LS11, precedentemente selezionato per la sua capacità di prevenire le infezioni da *P. expansum* su pomacee (Castoria *et al.,* 1997; Lima *et al*., 1998), è in grado di sopravvivere in presenza di diverse concentrazioni di patulina e di degradare questa micotossina in aerobiosi, formando due metaboliti principali, il più stabile dei quali è il DPA (Fig. 3) (Castoria *et al.,* in preparazione). Il gruppo della prof.ssa Rosa Duran Patron dell'Università di Cadice (Spagna) ha caratterizzato il *pathway* degradativo (Fig. 38) della

patulina da parte di *R. kratochvilovae* LS11 (dati non pubblicati), confermando la capacità di questo lievito BCA di produrre in condizioni di aerobiosi un prodotto finale (i.e. DPA) caratterizzato da una tossicità di gran lunga inferiore a quella del composto di partenza (i.e. patulina) (Scott *et al.,* 1972; Wright *et al.,* 2008; Castoria *et al.,* in preparazione). Questo suggerisce una possibile applicazione pratica di questo processo di metabolizzazione che non implicherebbe i costi legati alla rimozione dell'ossigeno necessari per i processi di degradazione condotti in condizioni di anaerobiosi. Da qui l'importanza e la necessità di identificare i geni responsabili della degradazione della patulina da parte di *R. kratochvilovae* LS11.

A tal fine è stata utilizzata la trasformazione mediata da *A. tumefaciens*, la cui grande versatilità nel generare *pool* di mutanti inserzionali è ampiamente documentata (Hooykaas *et al.,* 2005; Michielse *et al.*, 2005); l'obiettivo era quello di identificare mediante il biosaggio ad alta efficienza messo a punto da Wright *et al.* (2008) mutanti inserzionali che avessero perso la capacità di degradare la patulina come conseguenza della disattivazione genica verificatasi in seguito all'inserzione del T-DNA nel putativo gene (o geni) responsabile della degradazione della micotossina.

Per la AMT di LS11 sono stati testati diversi vettori (Fig. 16 - 19) utilizzati con successo nel lievito basidiomicete *C. neoformans* (Idnurm *et al.,* 2004; Walton *et al.,* 2005), filogeneticamente correlato a *R. kratochvilovae.* In tutti i casi, i putativi trasformanti ottenuti mostrano un fenotipo in grado di svilupparsi sui diversi terreni selettivi contenenti l'antibiotico appropriato, ma l'analisi genetico-molecolare condotta non corrobora i dati fenotipici osservati. In particolare, pur avendo ottenuto il prodotto di amplificazione con le dimensioni attese nelle analisi PCR, l'avvenuta trasformazione non è stata confermata né dai *Southern blot* né dalle osservazioni al microscopio a fluorescenza per la valutazione dell'espressione della GFP (Fig. 21-24).

L'ottenimento di prodotti di amplificazione anche con i ceppi LS11 di *R. kratochvilovae* e JEC 21 di *C. neoformans* non trasformati (rispettivamente *lanes* 2 e 12 di figura 22 A e B, e *lane* 2 di figura 23 A e B) potrebbe essere stata conseguenza della bassa specificità dei primer *inside* e *outside* utilizzati. Infatti, utilizzando i primer M13_F e M13_R (complementari alle sequenze contigue ai bordi dei vettori binari e quindi specifici per i soli trasformanti) è stata ottenuta amplificazione solo per i trasformanti di *C. neoformans* JEC 21, indipendentemente dal vettore utilizzato per la trasformazione (dati non mostrati). Questi risultati dimostrano che le analisi PCR condotte con i primer M13_F e M13_R e le

analisi *Southern blot* sono i metodi più sicuri e efficaci per accertare l'esito positivo delle trasformazioni effettuate utilizzando vettori binari generati a partire dal pPZP-201-BK.
Partendo da queste osservazioni, si può affermare che al momento non si dispone di strumenti molecolari efficaci per la trasformazione del BCA *R. kratochvilovae* LS11.
L'impossibilità di trasformare il BCA *R. kratochvilovae* LS11 non appare legata né ai *marker* utilizzati (resistenza ad antibiotici, il ripristino della prototrofia in auxotrofi per l'uracile) né al metodo di trasformazione di cui sono riportati i risultati in questa tesi (AMT), poiché la mancanza di trasformazione è stata riscontrata anche con l'impiego di elettroporazione e trasformazione biolistica (dati non mostrati). Il successo della trasformazione di lieviti basidiomiceti appartenenti al genere *Rhodosporidium* è stato riportato in un solo caso da Tully e Gilbert (1985) anche se con bassa efficienza e bassa stabilità dei trasformanti ottenuti, utilizzando una metodo di trasformazione laborioso e ormai superato da tecniche più moderne, efficaci e applicabili su larga scala per uno studio di mutagenesi inserzionale (Michielse *et al.,* 2005; Weld *et al.,* 2006; Meyer, 2008).

L'impossibilità di disporre di un metodo di mutagenesi inserzionale per LS11 ha reso necessario individuare microrganismi alternativi filogeneticamente correlati al BCA di interesse che fossero in grado di metabolizzare la patulina secondo lo stesso *pathway* degradativo di *R. kratochvilovae* LS11. A tale scopo sono stati saggiati diversi ceppi di lieviti rosa appartenenti alla nuova collezione del laboratorio di Patologia Vegetale dell'Università del Molise collocati, in seguito ad analisi RFLP delle regioni ITS, nel genere *Sporobolomyces* (dati non mostrati). Tra i ceppi di *Sporobolomyces* in grado metabolizzare la patulina è stato utilizzato il ceppo di riferimento *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 per il quale è disponibile *on line* una bozza della sequenza dell'intero genoma (http://genome.jgi-psf.org/Sporo1/Sporo1.home.html); ciò ha reso molto più semplice l'identificazione delle sequenze geniche disattivate dalle inserzioni di T-DNA in seguito ad AMT (par. 8.4.2).

Il confronto tra le analisi TLC e HPLC dei filtrati colturali di colture di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 e *R. kratochvilovae* LS11 incubati con 100 µg/ml di patulina (Fig. 26), mostra che anche nel caso di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 uno dei prodotti, probabilmente quello finale, della degradazione della patulina è il DPA (stesso Rf in TLC e stesso Rt in HPLC). La produzione di DPA è stata confermata mediante analisi NMR dal gruppo della prof.ssa Rosa Duran Patron (dati non pubblicati). Ciò suggerisce che la micotossina viene degradata secondo lo stesso *pathway* metabolico e, presumibilmente, con il coinvolgimento di geni omologhi. È attualmente in corso la

caratterizzazione del *pathway* metabolico di degradazione della patulina anche per *Sporobolomyces* sp. IAM 13481.

Tuttavia, ci sono delle differenze nella cinetica di degradazione della patulina tra *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 e *R. kratochvilovae* LS11 in quanto, in tutti gli esperimenti condotti e in tutte le condizioni testate, il BCA è risultato sempre più veloce nel degradare la micotossina (Fig. 26). Le curve di crescita dei due lieviti in assenza di patulina, riportate in figura 27 A, mostrano un andamento di crescita molto simile. In presenza di patulina, invece (Fig. 27 B), nel caso di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 si osserva una fase di "latenza" iniziale che si traduce in un ritardo nella degradazione della micotossina. Superata la iniziale fase di stress, presumibilmente dovuta alla tossicità della patulina, anche per *Sporobolomyces* sp. IAM 13481, così come per LS11, la degradazione della patulina procede in parallelo all'aumentare del numero di cellule in coltura. Quando gli esperimenti di degradazione sono stati condotti in piastre a 96 pozzetti, sia per LS11 che per *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 è stato registrato un rallentamento della degradazione della patulina; questo fenomeno potrebbe essere dovuto ad una minor ossigenazione dei pozzetti rispetto ai tubi Falcon da 15 ml.

Alla base dell'attività antagonistica esercitata dal BCA LS11 c'è la tempestiva colonizzazione delle ferite dei tessuti vegetali (*wound competence*), principale sito di penetrazione dei patogeni fungini. Castoria *et al.* (2003) riportano che la *wound competence* è legata anche alla capacità dello stesso BCA di resistere alle specie reattive dell'ossigeno (perossido di idrogeno e anione superossido) che si generano nei tessuti vegetali danneggiati. Partendo da queste considerazioni, si era inizialmente ipotizzato che la più rapida cinetica di degradazione della patulina osservata per il BCA LS11 fosse dovuta ad una maggiore resistenza, nella fase iniziale di incubazione, allo stress ossidativo causato dalla micotossina (Liu *et al.,* 2007; Ferrer *et al.,* 2009). Tuttavia, il ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. mostra una tolleranza al perossido di idrogeno maggiore di quella di LS11 (dati non mostrati); è possibile che, come risposta alla presenza di patulina, vengano messi in atto dei meccanismi di regolazione genetica e/o biochimica diversi tra LS11 e il ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. In LS11 i geni coinvolti direttamente nella degradazione della micotossina potrebbero essere costitutivamente attivi oppure essere indotti dalla presenza di patulina, mentre in *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 la loro attivazione sia preceduta dall'azione di prodotti di induzione di geni coinvolti nella resistenza agli effetti tossici della micotossina. Come discusso in seguito, i dati ottenuti in questa tesi con *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 suggeriscono che di questi geni

principalmente fanno parte quelli responsabili del corretto funzionamento della membrana plasmatica e/o della parete cellulare e nella resistenza allo stress ossidativo.

I primi esperimenti di trasformazione di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 sono stati effettuati con gli stessi vettori descritti nel paragrafo 7.3.3 e utilizzati per LS11, recanti come *marker* selezionabili geni codificanti per la resistenza agli antibiotici aminoglicosidici igromicina, neomicina e nourseotricina. Questo approccio, tuttavia, non è risultato applicabile per la trasformazione di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 a causa della comparsa di fenomeni di resistenza spontanea ai tre antibiotici testati (Ianiri *et al.,* inviato per la pubblicazione). L'acquisizione di resistenza è stata riscontrata anche per *R. kratochvilovae* LS11, *C. laurentii* LS28 e diversi ceppi di *Sporobolomyces* spp. (dati non mostrati) ed è stato uno dei principali problemi incontrati durante tutti gli esperimenti di trasformazione effettuati. In particolare, è ipotizzabile che le colonie inizialmente considerate trasformanti siano state il risultato di un adattamento fisiologico agli antibiotici utilizzati per la selezione. Ciò spiegherebbe perché le indagini genetico-molecolari condotte sui putativi trasformanti di LS11 (di cui si è discusso in precedenza), di *C. laurentii* LS28 e di alcuni ceppi di *Sporobolomyces* non abbiano dimostrato la effettiva trasformazione di questi ceppi (dati non mostrati).

Sanglard *et al.* (2009) mostrano che i meccanismi di resistenza agli antibiotici sono riconducibili ad una sovra-espressione di geni codificanti per gli *ABC transporter* e gli MFS (*major facilitator superfamily*) *transporter,* all'utilizzazione di *pathway* catabolici compensatori e alla sovra-espressione di geni *target* degli antibiotici. A tal proposito, Sionov *et al.* (2010) riportano che in *C. neoformans* l'acquisizione di resistenza al fluconazolo, inibitore della sintesi degli steroli, è associata con la duplicazione di cromosomi, in particolare del cromosoma 1, su cui sono localizzati il gene *ERG11*, codificante l'enzima *target* del fluconazolo lanosterol 14-α-demetilase, e il gene *AFR1*, il più importante trasportatore di composti azolici in *C. neoformans.* E' possibile che uno o più meccanismi simili a quelli descritti possano intervenire nella resistenza ai tre antibiotici aminoglicosidici utilizzati negli esperimenti di trasformazione dei lieviti basidiomiceti appartenenti ai generi *Rhodosporidium*, *Sporobolomyces* e *Cryptococcus.*

Sulla base di quanto esposto, è stato deciso di utilizzare un sistema di trasformazione in cui la selezione fosse basata sull'auxotrofia all'uracile. Uno dei principali vantaggi di questo diverso sistema è che può essere utilizzato come gene *marker* il gene nativo del microrganismo WT*,* dopo clonaggio nei vettori per la trasformazione. Ciò aumenta sensibilmente la possibilità di espressione del gene *marker* nel ceppo auxotrofo derivato

dallo stesso microrganismo, quindi del ripristino della prototrofia e di una efficace selezione dei trasformanti.

Tra i metodi di trasformazione attualmente disponibili (par 5.3.1), anche in questo caso è stata utilizzata la trasformazione mediata da *A. tumefaciens* poiché questa tecnica assicura un'elevata efficienza di trasformazione (oltre 5000 trasformanti per piastra di coincubazione) e i trasformanti ottenuti presentano principalmente singole inserzioni di T-DNA, il che rende più semplice la correlazione tra gene disattivato e fenotipo mutante. Con la biolistica invece, l'efficienza di trasformazione osservata è stata di gran lunga inferiore [circa 10-15 trasformanti per µg di DNA (dati non mostrati)]; inoltre, sebbene questi trasformanti presentassero nella maggior parte dei casi singole inserzioni di DNA esogeno, questa metodica, a differenza della AMT, non poteva assicurare l'alto numero di trasformanti necessario per un studio di mutagenesi inserzionale su larga scala. Queste osservazioni sono in accordo con quanto riportato da numerosi autori per altre specie fungine e non (*review* di Michielse *et al.,* 2005 e Weld *et al.,* 2006).

In questa tesi l'auxotrofo *ura5* AIS2 recante una delezione di 129 bp tra il promotore e la ORF del gene *URA5* (Fig. 28 A, mutazione B1a) è stato trasformato con successo mediante AMT utilizzando il vettore binario pPZP-URA5 (Fig. 20) generato clonando nel T-DNA del pPZP-201BK il gene *URA5* ottenuto mediante amplificazione PCR dal DNA genomico di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (par. 7.5.3). L'efficacia del metodo di trasformazione nel generare mutanti inserzionali è stata accertata mediante analisi PCR e *Southern blot* (Fig. 28 B, C; Fig. 29 D, F).

Lo stesso vettore è stato anche testato per trasformare il putativo auxotrofo *ura5* Rgpo1 derivato da LS11, ma anche in questo, come nei precedenti esperimenti di trasformazione del BCA LS11, le analisi molecolari condotte sui putativi trasformanti selezionati non hanno confermato che la trasformazione fosse avvenuta (Fig. 29 B, F).

Circa 3200 trasformanti prototrofi generati a partire dall'auxotrofo AIS2 sono stati saggiati per la loro capacità di degradare la patulina mediante il biosaggio ad alta efficienza con *E. coli* DH5α (Wright *et al.,* 2008) (Fig. 11). Quindici trasformanti prototrofi hanno mostrato una più lenta cinetica di degradazione della patulina rispetto al ceppo *wild type* IAM 13481 e sono perciò stati denominati *slower patulin degraders*.

Le sequenze dei geni disattivati dalle inserzioni di T-DNA nei mutanti *slower patulin degraders* sono state ottenute mediante *inverse* PCR e *plasmid rescue* (par. 5.3.1; Fig. 8); dall'analisi delle inserzioni (Fig. 32) si evince che il bordo destro del T-DNA si è integrato nella maggior parte di casi con tre basi (TCA o TGA a seconda dell'orientamento), mentre

la sequenza di basi del bordo sinistro è risultata molto più variabile; queste modalità di integrazione del T-DNA sono in accordo con quanto riscontrato per la maggior parte dei funghi, incluso *C. neoformans* (Idnurm *et al.,* 2004, 2009) e *Magnaporthe oryzae* (Meng *et al.,* 2007).

La funzione prevista degli omologhi dei geni disattivati dalle inserzioni di T-DNA, individuata sui vari database disponibili (http://genome.jgi-psf.org/Sporo1/Sporo1.home.html, http://www.yeastgenome.org/ e http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Tab. 14), è stata accertata mediante opportuni test di sensibilità (Fig. 33, 34). Per valutare le conseguenze fenotipiche delle mutazioni di geni ipoteticamente coinvolti nella resistenza allo stress ossidativo sono stati usati il perossido di idrogeno e il perossido organico *tert-butyl hydroperoxide* (tBOOH) (Maeng *et al.,* 2010) (Fig. 33). L'SDS è stato utilizzato per testare il corretto funzionamento di parete cellulare e membrana plasmatica; questo detergente infatti, ha un'azione distruttiva sulla membrana plasmatica e causa la lisi di cellule con difetti nell'organizzazione della membrana e della parete cellulare (Gerik *et al.,* 2005). Il fungicida tiabenzadolo è stato utilizzato per accertare il coinvolgimento di geni coinvolti con il corretto assemblaggio dei microtubuli in quanto il suo meccanismo di azione consiste nel legare i gruppi tiolici della β-tubulina dei microtubuli con conseguente mancanza di polimerizzazione (Agrios, 2005). Infine, per identificare geni che codificano per proteine richieste per la crescita a temperature non permissive, è stata valutata la capacità di recupero della crescita dei trasformanti dopo 16 ore di incubazione a 37°C.

Un limite legato all'interpretazione del fenotipo dei mutanti inserzionali di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 è rappresentato dall'assenza di un sistema di segregazione genetica che permetterebbe di assegnare in modo inequivocabile, mediante analisi fenotipica della progenie ottenuta in seguito ad incrocio, il legame tra fenotipo mutante e inserzione di T-DNA.

Tuttavia, per i trasformanti 34a, 40a, 596a, 938a e 958b l'inserzione singola di T-DNA (Fig. 31, *lanes* 6, 7, 9, 11 e 14, rispettivamente) nella ORF dei geni *CYB5, YCK2, PAC2, ECM38* e del gene che codifica per la proteina con ID 28891(Fig. 32) ha permesso di stabilire con certezza il legame tra gene disattivato e fenotipo mutante.

Il trasformante 34a (Fig. 31, *lane* 6) presenta un'inserzione di T-DNA nel gene *CYB5*, coinvolto nel *pathway* biosintetico di steroli e lipidi (Tab. 14); la delezione di questo gene causa in *C. albicans* una maggior sensibilità ai composti azolici, i cui *target* sono i prodotti dei geni coinvolti nel *pathway* biosintetico dell'ergosterolo (Rogers *et al.,*

2004). Il trasformante 34a (mutante *cyb5::T-DNA*) mostra sensibilità all'SDS (Fig. 34) e non risulta sensibile al perossido di idrogeno (Fig. 33) e allo stress causato dall'esposizione a 37°C; questi risultati sono in accordo con quanto riportato da Ianiri *et al.* (inviato per la pubblicazione) per un mutante *erg3::T-DNA* di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481, poichè i geni *ERG3* e *CYB5* sono coinvolti nello stesso processo biologico. Il fenotipo osservato è conseguenza di una membrana difettiva in ergosterolo e quindi maggiormente sensibile rispetto a quella del WT all'azione del detergente SDS. Inoltre, Thorpe *et al.* (2004) riportano anche che geni coinvolti nella sintesi degli steroli sono importanti anche nella resistenza allo stress ossidativo; questo potrebbe essere messo in relazione con la leggera sensibilità del trasformante 34a al tBOOH (Fig. 33).

Il trasformante 40a presenta un'inserzione di T-DNA (Fig. 31, *lane* 7) nel gene *YCK2* che codifica per la protein kinase (PK) Yck2, proteina associata con la membrana plasmatica (*Palmitoylated plasma membrane-bound casein kinase I isoform*). Regolate dal MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) *pathway,* le protein kinase ricoprono in *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. neoformans* un ruolo fondamentale sia nella biogenesi che nell'integrità della parete cellulare (CWR, *cell wall regulation*) (Levin 2005; Gerik *et al*., 2005; Blankenship *et al.,* 2010) (Tab. 14). Il MAPK *pathway* è attivato essenzialmente da danni a carico della parete cellulare o da segnali cellulari indotti dallo stress ossidativo, dallo shock osmotico, da esposizione a temperature elevate e dalla differenziazione di strutture riproduttive (Blankenship *et al.,* 2010). Gli stessi autori riportano che in specie di lieviti differenti, omologhi codificanti per la stessa PK ricoprono un ruolo differente nella CWR; considerando il gene *YCK2*, reso inattivo da un'inserzione di T-DNA nel trasformante 40a selezionato in questo studio, Blankenship *et al.* (2010) mostrano che mutanti *yck2*Δ di *C. albicans*, a differenza di mutanti *yck2*Δ di *S. cerevisiae e S. pombe,* non sono in grado di svilupparsi su *caspofungin,* che, poiché inibisce la sintesi dell'1-3 β-glucano (uno dei più importanti costituenti della parete cellulare fungina), é utilizzato come l'SDS per accertare la funzione di geni coinvolti nell'integrità della parete cellulare. La sensibilità del trasformante 40a (mutante *yck2::T-DNA*) all'SDS (Fig. 34) indica che la proteina Yck2 è coinvolta anche in *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 nella CWR probabilmente secondo lo stesso ruolo indiretto descritto per *C. albicans*. Inoltre, la sensibilità del trasformante 40a al perossido di idrogeno (Fig. 33), indica che Yck2 è implicata anche nella resistenza allo stress ossidativo; questa funzione, comune per alcune PK *protein* come Hog1, Pbs2 ecc. (Blankenship *et al.,* 2010), non è stata mai riportata per la proteina Yck2.

Il trasformante 596a (Fig. 31, *lane* 9) presenta un'inserzione di T-DNA nel gene *PAC2* (Fig. 32), gene richiesto per la normale funzione dei microtubuli (Tab. 14). Mutanti *pac2*Δ di *S. cerevisiae* sono caratterizzati da un'elevata sensibilità al benomyl (Tian *et al.*, 1997), che agisce come tutti i benzimidazolici depolimerizzando i microtubuli. La sensibilità del trasformante 596a (mutante *pac2::T-DNA*) al tiabendazolo (Fig. 34 B) conferma la funzione del gene *PAC2* nel corretto funzionamento dei microtubuli anche in *Sporobolomyces* sp. IAM 13481; inoltre, questo trasformante, come possibile conseguenza del danno ai microtubuli e/o del ruolo pleiotropico di questo gene (Dudley *et al.*, 2005), mostra sensibilità alle specie ossidanti testate (Fig. 33), all'SDS, e limitata capacità di recupero dopo esposizione a 37°C per 16 ore (Fig. 34).

Nel caso del trasformante 938a (Fig. 31, *lane* 11), il T-DNA si è inserito nel gene *ECM38* che codifica per l'enzima *gamma-glutamyl transpeptidase* coinvolto nel *turnover* del glutatione (Kumar *et al.,* 2003). Il glutatione è il più abbondante tiolo a basso peso molecolare presente nelle cellule eucariotiche ed è coinvolto in molti processi cellulari, come la resistenza ad agenti carcinogeni, agli xenobiotici e allo stress ossidativo causato dalle specie reattive dell'ossigeno. I livelli ottimali di GSH all'interno delle cellule sono mantenuti stabili da una serie di complesse reazioni che bilanciano la sua velocità di sintesi o di degradazione (Grant, 2001).

Il glutatione ridotto (GSH) è sintetizzato a partire da acido glutammico e cisteina attraverso due step enzimatici ATP-dipendenti catalizzati dagli enzimi *gamma-glutamylcysteine* sintetasi, codificato dal gene *GSH1*, e glutatione sintetasi, codificato dal gene *GSH2*. La sua azione protettiva coinvolge la reazione dei gruppi SH del glutatione GSH con i radicali liberi prodotti da specie reattive dell'ossigeno, portando la formazione di glutatione disolfuro GSSG; da questo, attraverso una reazione NADPH-dipendente catalizzata dall'enzima glutatione riduttasi, viene rigenerato GSH. (Grant e Dawes, 1996). Il catabolismo del glutatione invece, passa attraverso il ciclo proposto da Orlowski e Meister, 1970. La prima reazione di questo ciclo è catalizzata dall'enzima *gamma-glutamyl transpeptidase*, codificato dal gene *ECM38*, che idrolizza il legame gamma-glutammilico tra glutammato e cisteina; in questo modo viene rilasciato il dipeptide cisteinil-glicina, che è successivamente scisso in cisteina e glicina dall'attività delle dipeptidasi di membrana. Questi aminoacidi vengono utilizzati dalle cellule per la sintesi di nuovo glutatione GSH.

Il glutatione è anche uno *scavenger* della patulina e ne riduce la tossicità (Moake *et al.,* 2005). Iwahashi *et al.* (2006) mostrano che la presenza di glutatione in coltura limita l'inibizione di crescita di *S. cerevisiae* causata dalla micotossina. L'assenza di crescita su

perossido di idrogeno e al tBOOH (Fig. 33) osservata per il trasformante 938a (mutante *ecm38::T-DNA*) può essere attribuita alla mancata rigenerazione di glutatione ridotto GSH con conseguente incremento di sensibilità allo stress ossidativo causato dalle specie reattive dell'ossigeno, compresa la patulina (Liu *et al.,* 2007; Ferrer *et al.,* 2009). Queste osservazioni sono in accordo con quanto riportato da Grant *et al*. (1996) per mutanti *gsh1*Δ e *gsh2*Δ di *S. cerevisiae*. Inoltre, la sensibilità del trasformante 938a all'SDS e la limitata capacità di recupero dopo esposizione a 37°C per 16 ore (Fig. 34) indicano che il gene *ECM38* in *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 potrebbe avere un ruolo pleiotropico con un coinvolgimento nel corretto funzionamento della membrana plasmatica e/o della parete cellulare e con la crescita a temperature non permissive.

Il trasformante 958b reca un'inserzione di T-DNA nel terzo esone del gene che codifica per la proteina con ID 28891 (Fig. 32). Tuttavia la carenza di informazioni riscontrate nei diversi database disponibili rende difficoltosa l'assegnazione di una specifica funzione a questo gene. Sul database di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 è riportato che il gene in questione codifica per una chitinasi coinvolta nel trasporto e metabolismo dei carboidrati (Tab. 14); considerando la sensibilità del trasformante 958b all'SDS (Fig. 34), sulla base di quanto riportato da Blankenship *et al.* (2010) per alcune protein kinase, si potrebbe ipotizzare un ruolo indiretto di questo gene nella biogenesi della parete cellulare in quanto regolatore del flusso di carboidrati nel corrispettivo *pathway* biosintetico.

La necessità di un sistema di segregazione genetica per l'assegnazione inequivocabile della funzione genica è emersa nel caso dei trasformanti 123a, 164c, Pink5,e 685c, caratterizzati da una sola inserzione di T-DNA, ma tra due geni adiacenti (trasformanti 123a e 164c), o dall'inserzione dei due bordi del T-DNA in posizioni diverse del genoma (trasformanti Pink5 e 685c). Per questi trasformanti, la risposta fenotipica osservata fa fornito indicazioni su quale dei due geni potenzialmente "colpiti" dal T-DNA fosse stato reso inattivo.

Nel trasformante 123a (Fig. 31, *lane* 8) il bordo destro del T-DNA (l'unico ottenuto con la *inverse* PCR, fig. 32), si è inserito 91 basi a valle del codone di stop (TAA) del gene *TPK2* e 380 basi a monte del codone di inizio (ATG) del gene *CDC24*. Data la maggiore importanza che riveste il promotore nell'espressione genica, in questo caso è ipotizzabile che il T-DNA interferisca con il corretto funzionamento del promotore del gene *CDC24,* fattore di scambio di guanine (GEF *protein*) per il gene *CDC42* nel Ras *signaling pathway.* I dati fenotipici ottenuti (Fig. 33, 34) e le evidenze bibliografiche discusse in seguito

sembrano sostenere questa ipotesi. Maeng *et al.,* (2010) riportano che in *C. neoformans* il Ras *signaling pathway* interviene sia nella resistenza a stress ambientali come lo shock osmotico, lo stress ossidativo e genotossico e la resistenza a temperature non permissive, sia nella resistenza ad alcuni fungicidi mediante il mantenimento dell'integrità della parete e della membrana cellulare (Tab. 14). Il trasformante 123a mostra sensibilità al perossido di idrogeno, al tBOOH (Fig. 33) e all'SDS (Fig. 34); questi risultati fenotipici sono in pieno accordo con i risultati fenotipici ottenuti da Maeng *et al.* (2010) per il mutante *cdc24*Δ di *C. neoformans*. Si può affermare che le risposte fenotipiche osservate sono dovute all'inserzione del T-DNA nel promotore del gene *CDC24* con conseguente blocco del Ras *signaling pathway.* Tuttavia, la certezza assoluta che il fenotipo osservato sia dovuto alla disattivazione del gene *CDC24* e non a quella del gene *TPK2* si potrà avere solo in seguito all'analisi fenotipica di mutanti delezionali generati separatamente per ciascuno dei due geni.

Anche il trasformante 164c (Fig. 31, *lane* 15) presenta un'inserzione di T-DNA tra i codoni di inizio del gene *NAR1,* coinvolto nella resistenza allo stress ossidativo (Fujii *et al,* 2009), e del gene *GYP7* (Fig. 21), un attivatore delle Rab *protein*, in particolare della Ypt7, coinvolte nel trasporto vescicolare dal citosol alla membrana plasmatica (Vollmer *et al.*, 1999; Eitzen *et al.,* 2000) (Tab. 14). Per questi due geni non sono disponibili molti riferimenti bibliografici. Sul database di *S. cerevisiae* (SGD) è riportato che mutanti *nar1*Δ sono caratterizzati da sensibilità allo stress ossidativo (Fujii *et al.* , 2009), mentre per il gene *GYP7* non ci sono evidenze interessanti. Tuttavia, sono state trovati riferimenti bibliografici sull'effetto fenotipico di mutazioni funzionali a carico dei geni *YPT* (*Yeast Protein Two*) codificanti le Rab *protein,* attivate appunto dal gene *GYP7*. Diversi autori riportano che mutanti *ypt7*Δ mostrano elevata sensibilità alla caffeina, un composto utilizzato di routine per la valutazione dell'integrità della membrana plasmatica e/o della parete cellulare (Tedrick *et al.* 2004; Parsons *et al.,* 2004; Dudley *et al.*, 2005). Sulla base di queste informazioni, è possibile che la risposta fenotipica osservata per il trasformante 164c [(i.e. resistenza comparabile a quella del ceppo WT su perossido di idrogeno e tBOOH (Fig. 33) e elevata sensibilità all'SDS (Fig. 34)] sia dovuta all'inserzione del T-DNA nel promotore del gene *GYT7*; nel caso l'inserzione di T-DNA fosse avvenuta nel promotore del gene *NAR1,* poiché questo gene è coinvolto nella resistenza allo stress ossidativo, ci si sarebbe aspettati sensibilità da parte del trasformante 164c al perossido di idrogeno e/o al tBOOH. Anche in questo caso l'analisi fenotipica di singoli mutanti

delezionali *nar1*Δ e *gyp7*Δ potrà fornire indicazioni su quale di questi due geni non è funzionale nel trasformante 164c.

Per i trasformanti Pink5 e 985c, come conseguenza di possibili riarrangiamenti della molecola di T-DNA in seguito all'integrazione nel DNA genomico, i due bordi si sono inseriti separatamente in porzioni diverse del genoma (Fig. 32).

In Pink5 il bordo destro del T-DNA si è inserito nel gene che codifica per la proteina vacuolare Vps8, mentre il bordo sinistro si è inserito a circa 155 Kb dal precedente in una parte del genoma dove non sono presenti regioni codificanti (Fig. 32). Si presume quindi, che l'inserzione nel gene *VPS8* sia causa del fenotipo mutante osservato. Martinez M. *et al.* (2003) e G. W. Thorpe *et al.* (2004) riportano che vps8, al pari di altre proteine vacuolari coinvolte nei processi di traffico vescicolare (Vps3, Pep7, Vps9, Tlg2 ecc.), gioca un ruolo importante nella resistenza allo stress ossidativo poiché potrebbe regolare il traffico di proteine di risposta a questo stress e la rimozione delle proteine danneggiate. Questi autori ipotizzano anche il coinvolgimento delle *vps proteins* nel mantenimento dell'integrità della membrana plasmatica in quanto intervengono nella sintesi e nel trasporto delle proteine che la costituiscono (Thorpe *et al.,* 2004) (Tab. 14). I risultati ottenuti dai test di sensibilità col trasformante Pink5 sono in accordo con quanto su esposto. L'inserzione del T-DNA nel gene *VPS8* causa un'elevata sensibilità del trasformante Pink5 al perossido di idrogeno e al tBOOH (Fig. 33); inoltre, a conferma del ruolo di questo gene nel mantenimento dell'integrità della membrana plasmatica, il trasformante Pink5 mostra un'elevata sensibilità all'SDS e una limitata capacità di recupero da temperature non permissive (Fig. 34).

Nel trasformante 685c i due bordi del T-DNA si sono inseriti separatamente nell'omologo *IML1* di *S. cerevisiae*, coinvolto nella crescita filamentosa di questo lievito (Kang e Jiang, 2005), e nell'omologo di *S. cerevisiae SSO1* che fa parte del complesso t-SNARE della membrana plasmatica ed è coinvolto in processi di trasporto vescicolare (Aalto *et al.*, 1993) (Tab. 14). La sensibilità del trasformante 685c solo al detergente SDS (Fig. 34) potrebbe essere dovuta ad un'alterata funzionalità del processo di trasporto delle proteine sulla membrana plasmatica conseguente alla disattivazione del gene *SSO1,* come descritto da Jäntti *et al.* (2001) per mutanti *temperature-sensitive sso1*Δ di *S. cerevisiae.* Inoltre, appare evidente che i geni *SSO1* di *S. cerevisiae* e *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 ricoprono un ruolo differente nella crescita a temperature non permissive (37°C) in quanto il trasformante 685c mostra una capacità di recupero della crescita dopo esposizione a 37°C comparabile a quella del ceppo WT IAM 13481 (Fig. 34). Tuttavia, come descritto

per i trasformanti Pink5, 123a e 164c, per confermare quanto ipotizzato è necessario generare dei mutanti *sso1*Δ e valutarne il comportamento fenotipico in presenza di altri composti utilizzati per comprendere la funzione di geni coinvolti nel mantenimento dell'integrità della membrana plasmatica e della parete cellulare (i.e. caffeina, Congo red, caspofungin, ecc.) (Gerik *et al*., 2005; Blankenship *et al.,* 2010; Maeng *et al.,* 2010).

Per il trasformante 18a, recante anch'esso una sola inserzione di T-DNA (Fig. 31, lane 5), non è stato possibile risalire al gene disattivato mediante *inverse* PCR. Tuttavia, l'elevata sensibilità a entrambe le specie reattive dell'ossigeno utilizzate (Fig. 33), all'SDS e la scarsa capacità di recupero della crescita dopo esposizione a 37°C (Fig. 34) indicano che il fenotipo mutante osservato è dovuto alla disattivazione di un gene più o meno direttamente coinvolto con la resistenza allo stress ossidativo, nel il corretto funzionamento della membrana plasmatica e/o della parete cellulare e nel recupero dopo esposizione a temperature non permissive.

I trasformanti 5a, 870a, 954a, 630b e 523c presentano inserzioni multiple di T-DNA (Fig. 31, *lanes* 4, 10, 12, 13 e 16, rispettivamente) e di conseguenza risulta molto problematico stabilire quale dei geni disattivati dalle inserzioni di T-DNA è responsabile del fenotipo mutante osservato.

I trasformanti 5a, 870a e 630b presentano due inserzioni di T-DNA (Fig. 31, *lanes* 4, 10 e 13). Per i trasformanti 5a e 630b non sono stati ottenuti prodotti di amplificazione corrispondenti ai geni recanti l'inserzione di T-DNA, mentre per il trasformante 870a, il prodotto di amplificazione della *inverse* PCR ottenuto corrisponde ad una porzione dello *scaffold* 9 dove non sono presenti regioni codificanti (Fig. 32). Poiché la risposta fenotipica dei trasformanti 5a e 870a è la stessa del ceppo IAM 13481 WT su tutti i composti utilizzati (Fig. 33, 34), risulta difficile assegnare una funzione a questi geni. È evidente comunque che i geni recanti l'inserzione di T-DNA non sono coinvolti con la resistenza allo stress ossidativo e con il corretto funzionamento della parete cellulare o della membrana plasmatica e dei microtubuli. Per il trasformante 630b invece, la limitata sensibilità all'SDS (Fig. 34) indica che almeno uno dei geni recanti l'inserzione del T-DNA possa essere coinvolto nel mantenimento dell'integrità della membrana plasmatica e/o della parete cellulare.

Il trasformante 954a presenta tre inserzioni di T-DNA (Fig. 31, *lanes* 12 e 16). Uno dei tre geni disattivati è stato ottenuto mediante *inverse* PCR. L'analisi della sequenza mostra che in questo caso l'inserzione non è limitata solo ai bordi del T-DNA ma comprende anche la porzione del plasmide pPZP-URA5 oltre il bordo sinistro. La

sequenza ottenuta corrisponde all'omologo *MCM1* di *S. cerevisiae,* un gene essenziale in *S. cerevisiae* e *C. albicans* che ricopre un ruolo pleiotropico nelle cellule perché coinvolto in molte funzioni cellulari, incluso il controllo del ciclo cellulare, il mantenimento dell'integrità della membrana plasmatica e della parete cellulare, il *mating*, l'osmotolleranza e la resistenza agli stress esterni, incluso lo stress ossidativo (Kuo *et al.,* 1994; Messenguy e Dubois 2003, Shapira *et al.* 2004) (Tab. 14). Fenotipicamente il trasformante 954a mostra elevata sensibilità al perossido di idrogeno, al tBOOH (Fig. 33), all'SDS e anche una limitata capacità di recupero dopo esposizione a temperature non permissive (Fig. 34); in accordo con quanto riportato da Kuo *et al.* (1994), Messenguy e Dubois (2003) e Shapira *et al.,* (2004), il fenotipo mutante osservato potrebbe essere causato dalla disattivazione del gene *MCM1*. Tuttavia, poiché per questo trasformante sono presenti tre inserzioni di T-DNA (Fig. 31, *lanes* 12), non è da escludere che le risposte fenotipiche ottenute possono essere dovute al non corretto funzionamento di uno o tutti i geni (considerati singolarmente o nel complesso) recanti l'inserzione di T-DNA.

Il trasformante 523c anche è caratterizzato da 3 inserzioni di T-DNA (Fig. 31, *lane* 16). Una delle inserzioni di T-DNA, ottenuta mediante *inverse* PCR, si trova a 842 basi a monte dell'omologo *HMN1* di *S.cerevisiae* e a 1220 basi a monte dell'omologo *RPS19A.*
Poiché fenotipicamente il trasformante 523c è sensibile solo all'SDS (Fig. 34) si potrebbe ipotizzare che l'inserzione di T-DNA interferisca con l'espressione del gene *HMN1*; questo gene infatti è coinvolto nel *pathway* biosintetico di fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, principali componenti dei fosfolipidi di membrana (Nikawa *et al.,* 1986, 1990). Tuttavia, essendo questo trasformante caratterizzato da tre inserzioni di T-DNA, non si può escludere che il fenotipo osservato sia determinato da uno degli altri due geni recanti l'inserzione che, in base alla risposta fenotipica ottenuta per il trasformante 523c (Fig. 33, 34), potrebbe/ro essere coinvolto/i più o meno direttamente nel corretto funzionamento della parete cellulare e/o della membrana plasmatica.
Mettendo in relazione gli effetti tossici esplicati dalla patulina sulle cellule (par 4.1) e la sensibilità dei mutanti *slower patulin degraders* alle specie reattive dell'ossigeno (Fig. 33), all'SDS e allo stress da temperature non permissive (Fig. 34), è possibile comprendere il ruolo dei geni disattivati dalle inserzioni di T-DNA nella degradazione della patulina da parte di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481. Geni implicati direttamente o indirettamente nella resistenza allo stress ossidativo (*YCK2, PAC2, ECM38, CDC24, VPS8 e probabilmente MCM1*) (Fig. 33) e nel mantenimento dell'integrità della membrana plasmatica e/o della parete cellulare (*CYB5, YCK2, PAC2, ECM38,* gene che codifica per

la proteina con ID 28891, *CDC24, GYP7, VPS8, SSO1 e probabilmente MCM1*) (Fig. 34) sono coinvolti nelle cellule nella risposta ad alcuni dei principali effetti tossici della patulina sui sistemi cellulari, quali lo stress ossidativo dovuto all'induzione di specie reattive dell'ossigeno ed alla deplezione dell'antiossidante GSH con conseguente perossidazione dei lipidi della membrana plasmatica (Liu *et al.,* 2007; Ferrer *et al.,* 2009), e il *cross link* a carico delle proteine di membrana e parete cellulare con conseguente perdita di funzionalità (Moake *et al.,* 2005; Horváth *et al.,* 2010). Per il gene *PAC2*, inoltre, sebbene i dati ottenuti mostrano che questo gene è coinvolto anche nella resistenza allo stress ossidativo e nel mantenimento dell'integrità della membrana plasmatica e/o della parete cellulare (Fig. 33, 34), è possibile che il fenotipo *slower patulin degrader* osservato per il trasformante 596a (*pac2::T-DNA*) sia dovuto principalmente all'effetto della micotossina a carico dei microtubuli. Kiso *et al.* (2004) infatti, riportano che la patulina similarmente al benomyl, inibisce l'assemblaggio dei microtubuli a causa del legame coi gruppi tiolici della β-tubulina.

Queste osservazioni, correlate con la capacità di tutti i mutanti *slower patulin degraders* di formare DPA quando inoculati con uno stuzzicadenti sterile (i.e. elevata concentrazione iniziale di cellule) (Fig 19), suggeriscono che la più lenta cinetica di degradazione osservata non è dovuta alla disattivazione di geni implicati direttamente nella metabolizzazione enzimatica della micotossina, bensì al *knockout* di geni coinvolti nella risposta ad uno o più effetti tossici esercitati dalla patulina sulle cellule. Per questo motivo i trasformanti, essendo più sensibili alla patulina, non sono in grado di svilupparsi in presenza della micotossina quanto il ceppo WT IAM 13481, e ciò rallenta il processo di degradazione.

In questa tesi, oltre a esperimenti di mutagenesi inserzionale, sono stati condotti anche esperimenti di mutagenesi mirata (*gene replacement*) a carico dei geni *VPS8*, *DLH* e *rDLH*.

Come riportato in dettaglio nel paragrafo 8.5.1, la mutagenesi mirata del gene *VPS8* è stata condotta per confermare che il fenotipo osservato per il trasformante Pink5 fosse dovuto inequivocabilmente dalla disattivazione di questo gene causata dall'inserzione del T-DNA. I tre metodi per la generazione di costrutti per la mutagenesi mirata descritti nel paragrafo 5.1.1 sono stati messi a confronto; la tecnica biolistica è stata utilizzata come metodo di trasformazione.

Applicando la procedura per l'*overlap* PCR non è stato ottenuto il prodotto di amplificazione atteso (par 8.5.1).

Per la *Double Joint* PCR invece, l'analisi molecolare di quattro trasformanti ottenuti (Fig 35 E – I, *lanes* 2-5) mostra che in nessun caso è stata ottenuta ricombinazione omologa a carico delle regioni fiancheggianti il gene *target*; inoltre, i due frammenti *Double Joint* (Fig 35 B) hanno mostrato una tendenza a integrarsi separatamente nel genoma (Fig 35 E, *lane* 3; Fig 35 G, *lane* 4); probabilmente, generando una regione complementare dello *split-marker URA5* maggiore di 200 bp si sarebbe potuta ottenere ricombinazione omologa anche a carico delle regioni 5' e 3' del gene *URA5* con conseguente *knockout* del gene *VPS8*.

La ricombinazione *in vivo* in *S. cerevisiae*, anche se più laboriosa rispetto alle tecniche precedenti, è risultata essere il metodo più efficace per la generazione di elevate quantità di costrutto (Fig 35 C, *lane* 4) da inserire nell'auxotrofo AIS2 mediante trasformazione biolistica; per questa ragione questa tecnica è stata utilizzata anche per generare i costrutti per gli esperimenti di mutagenesi mirata a carico dei geni *DLH* e *rDLH* (Fig 39 A, B).

La lunghezza delle regioni fiancheggianti 5' e 3' dei costrutti generati, è apparsa essere un fattore fondamentale per gli eventi di ricombinazione omologa. Costrutti aventi regioni fiancheggianti di circa 700 – 800 bp non hanno mai mostrato capacità di inserirsi nel locus *target* (dati non mostrati); di conseguenza, in tutti gli esperimenti condotti sono stati generati costrutti aventi regioni fiancheggianti 5' e 3' maggiori di 1 kb (Fig. 35 C, 39 A, B, *lanes* 1 e 2).

Di 10 putativi mutanti delezionali *vps8*Δ ottenuti, apparentemente solo per il putativo trasformante *VPS8*Δ(9) (Fig 35 E -I, *lane* 10; Fig 36, trasformante 9) si è inserita una sola copia del costrutto *vps8::URA5* nel locus *target*.

Per i due mutanti *vps8* [Pink5_*vps8::T-DNA* e *VPS8*Δ(9)] è stata confrontata la cinetica di degradazione della patulina (Fig. 37 A) e la risposta fenotipica al perossido di idrogeno, all'SDS e allo stress causato dall'esposizione a 37°C (Fig. 37 B).

L'andamento della degradazione della patulina (100 µg/ml), monitorato mediante analisi qualitativa TLC, mostra che entrambi i mutanti *vps8* [Pink5_*vps8::T-DNA* e *VPS8*Δ(9)] (Fig. 37 A, *lanes* 3 e 4, rispettivamente) presentano una cinetica di degradazione della micotossina più lenta di quella riscontrata per il ceppo WT IAM 13481 (Fig. 37 A, *lane* 1). Analizzando la cinetica di formazione del DPA, in corrispondenza dei mutanti *vps8,* si evince che *VPS8*Δ(9) (Fig 37 A, *lane* 4) degrada la patulina più rapidamente di *vps8::T-DNA* (Fig 37 A, *lane* 3). Infatti, dopo tre giorni di incubazione lo *spot* del DPA è presente solo in corrispondenza del mutante *VPS8*Δ(9) (Fig 37 A, *lane* 4); dopo sei giorni invece, lo stesso *spot* è presente in corrispondenza di entrambi i mutanti *vps8*, ma è più intenso in

corrispondenza del mutante *VPS8*Δ(9) (Fig 37 A, *lane* 4). Tuttavia, per confermare quanto esposto, è attualmente in corso il monitoraggio della degradazione della patulina da parte dei due mutanti *vps8* mediante analisi quantitativa HPLC. I dati ottenuti dalla degradazione della patulina sono strettamente correlati alla risposta fenotipica dei due mutanti *vps8*. Mentre il trasformante Pink5 (*vps8::T-DNA*) mostra elevata sensibilità al perossido di idrogeno, all'SDS e limitata capacità di recupero dopo esposizione a 37°C, il mutante *VPS8*Δ(9) mostra solo una limitata sensibilità all'SDS (Fig. 37 B). Dai dati ottenuti si evince che entrambi i mutanti *vps8* sono più lenti del ceppo WT nel degradare la patulina.
Una possibile spiegazione del diverso comportamento fenotipico osservato per i due mutanti *vps8* (Fig. 37 A, B) potrebbe risiedere nella modalità di inserzione del T-DNA riscontrata per il trasformante Pink5 (par. 8.4.2; Fig. 32) in quanto, il possibile riarrangiamento verificatosi a carico del T-DNA in seguito ad integrazione nel genoma di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481, potrebbe interferire con l'espressione di altri geni ed essere responsabile della diversità fenotipica osservata.

Successivi esperimenti di mutagenesi mirata sono stati effettuati a carico di due geni di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 codificanti per due enzimi (*protein* ID 34178 e 6066) dotati di attività diene lattone idrolasica, che potrebbero rivestire un ruolo diretto nella degradazione della patulina. Sulla base di risultati ottenuti in collaborazione con il gruppo della prof.ssa Rosa Duran Patron dell'Università di Cadice (Spagna), il primo step del *pathway* degradativo della patulina consiste infatti nell'idrolisi enzimatica dell'anello lattonico della micotossina operata da un enzima con attività idrolasica di lattoni (Fig. 38). Utilizzando le informazioni riportate sul database di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481, gli unici due enzimi aventi tali requisiti sono due diverse diene lattone idrolasi.
In bibliografia è riportato che enzimi dotati di attività diene lattone idrolasica sono in grado di detossificare la protoanemonina (Brückmann *et al.*, 1998), un lattone insaturo (come la patulina) che si forma durante la degradazione enzimatica di alcuni importanti inquinanti del suolo, quali i bifenili policlorinati (PCB) (Blasco *et al.,* 1997). A causa della sua tossicità su diverse classi di organismi (Mares, 1987), la persistenza della protoanemonina è considerata essere responsabile anche dell'impoverimento della flora microbica in grado di degradare naturalmente i PCB (Havel e Reineke, 1992). Di conseguenza, organismi secernenti enzimi dotati di attività diene lattone idrolasica, come lo stesso *Sporobolomyces* sp. IAM 13481, potrebbero anche essere presi in considerazione per strategie di *bioremediation* (utilizzo del metabolismo microbico per ridurre il livello di inquinanti).

Per quanto riguarda il gene *DLH,* l'analisi PCR di 56 trasformanti ottenuti ha permesso di identificare 5 putativi mutanti *dlh*Δ (Fig. 40 A *lanes* 4, 14, 19, 31 e 56). L'analisi *Southern blot* di questi trasformanti/putativi mutanti mostra che probabilmente solo due (Fig. 40 C, *lanes* 2 e 6) presentano una copia del costrutto *dlh::URA5* integrato nel locus *target.* Tuttavia, poiché non è stata ottenuta la banda attesa di 340 bp, per affermare con assoluta certezza l'integrazione del costrutto *dlh::URA5* nel gene *DLH* sarà necessario ripetere un altro *Southern blot* utilizzando un altro enzima per la digestione dei DNA genomici e un sistema più sensibile per la marcatura della sonda (i.e. P^{32}).

Per il gene *rDLH* invece, mediante analisi PCR sono stati identificati tre putativi mutanti *rdlh*Δ (Fig. 40 C, *lanes* 2, 4 e 7); tuttavia, l'analisi *Southern blot* mostra che in nessun caso è stato ottenuto il *pattern* di ibridazione atteso (dati non mostrati). Per questo, al fine individuare i mutanti delezionali *rdlh*Δ è necessario quindi ripetere altre analisi molecolari (PCR e/o *Southern blot*).

Nonostante la necessità di ulteriori indagini molecolari, due putativi mutanti per il gene *DLH* [*dlh*Δ(3) (Fig. 40 A, lane 3; Fig. 40 B, *lane* 2) e *dlh*Δ(55) (Fig. 40 A, *lane* 56; Fig. 40 B, *lane* 6)] e due per il gene *rDLH* [*rdlh*Δ(7) (Fig. 40 C, *lane* 2) e *rdlh*Δ(17) (Fig. 40 C, *lane* 7)] sono stati utilizzati per esperimenti di degradazione della patulina (Fig. 41 A) e per i saggi di sensibilità al perossido di idrogeno, all'SDS e allo stress causato dall'esposizione a temperatura non permissive (Fig. 41 B).

Per quanto riguarda la cinetica di degradazione della patulina, entrambi i putativi mutanti *rdlh*Δ mostrano una minore velocità di degradazione della patulina (Fig. 41 A, *lanes* 5 e 6) rispetto ai due putativi mutanti *dlh*Δ (Fig. 41 A, *lanes* 3 e 4) e al ceppo WT di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (Fig. 41 A, *lanes* 2). Nei test di sensibilità invece, (Fig 41 B), il putativo mutante *dlh*Δ(3) è l'unico sensibile al perossido di idrogeno ed è il più sensibile all'SDS; gli altri tre mostrano sensibilità solo al detergente SDS e esibiscono la stessa risposta fenotipica del ceppo WT nelle altre condizioni testate (Fig. 41 B).

Diversamente dai trasformanti *slower patulin degraders*, la diversa sensibilità fenotipica mostrata dai putativi mutanti *dlh*Δ e *rdlh*Δ rispetto al ceppo WT non è correlabile con la cinetica di degradazione osservata. Basandosi sui test di sensibilità, ci si sarebbe aspettati che il putativo mutante *dlh*Δ(3), l'unico sensibile al perossido di idrogeno e all'SDS (Fig. 41 B), fosse stato il più lento nella degradazione della patulina (Fig. 41 A, *lane* 3); in modo inverso, ci si sarebbe aspettati che il mutante *rdlh*Δ(17), risultato il più lento nella degradazione della patulina (Fig. 41 A, *lane* 6), fosse stato il più sensibile ad uno dei composti utilizzati (Fig. 41 B).

Partendo da queste osservazioni, è possibile ipotizzare che la cinetica di degradazione osservata per i mutanti *rdlh*Δ possa essere dovuta all'inattivazione del gene codificante l'enzima *predicted hydrolase related to dienelactone hydrolase* (*protein* ID 6066) e che questo sia effettivamente coinvolto nel processo di degradazione. Tuttavia, i dati ottenuti sono del tutto preliminari ed è necessario prima di tutto accertare i genotipi *dlh*Δ e *rdlh*Δ mediante ulteriori analisi molecolari. In seguito, analisi dettagliate del *time course* della degradazione della patulina da parte dei mutanti *dlh*Δ e *rdlh*Δ, combinate con le informazioni relative alla natura dei metaboliti intermedi attualmente in fase di caratterizzazione, forniranno indicazioni per la comprensione del ruolo dei due enzimi dotati di attività diene lattone idrolasica nel processo degradativo di questa micotossina da parte dei lieviti basidiomiceti appartenenti al sub-phylum dei Pucciniomicotina.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

La possibilità di disporre di un microrganismo che associa all'attività antagonistica contro *P. expansum* la capacità di ridurre la contaminazione da patulina, ne incoraggia lo studio e l'ottimizzazione dei meccanismi di azione per un impiego più efficace nella lotta biologica.

In questo lavoro di tesi è stato effettuato uno studio approfondito sull'applicabilità di diverse tecniche molecolari per la comprensione dei meccanismi genetici alla base della degradazione della patulina da parte del BCA *R. kratochvilovae* LS11.

Gli esperimenti condotti utilizzando diversi metodi di trasformazione (AMT, biolistica e elettroporazione) e diversi vettori plasmidici, portano alla conclusione che allo stato attuale non si dispone di uno strumento efficace di mutagenesi inserzionale *random* e di mutagenesi mirata (*gene replacement*) per lo studio della funzione genica nel BCA *R. kratochvilovae* LS11.

L'individuazione di lieviti del genere *Sporobolomyces* in grado di degradare la patulina apparentemente secondo lo stesso *pathway* metabolico identificato per LS11, ha fornito una valida alternativa per l'individuazione dei geni coinvolti nella degradazione di questa micotossina da parte dei lieviti appartenenti al sub-phylum dei Pucciniomycotina.

Gli studi si sono focalizzati sull'organismo rappresentativo del genere *Sporobolomyces,* il ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. Anche se la cinetica di degradazione della patulina è risultata leggermente differente da quella osservata per LS11 a causa di meccanismi endogeni ipotizzati e discussi nella tesi, la disponibilità *on line* di una bozza della sequenza dell'intero genoma (http://genome.jgi-psf.org/Sporo1/Sporo1.home.html) e la consapevolezza di disporre di strumenti efficaci per la mutagenesi inserzionale *random* e la mutagenesi mirata (Ianiri *et al.,* inviato per la pubblicazione), hanno fatto del ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. l'organismo modello più adatto, tra quelli selezionati e esaminati, per lo studio genetico-molecolare sui meccanismi alla base della degradazione della patulina.

Lo screening di circa 3200 trasformanti prototrofi recanti inserzioni *random* di T-DNA nel genoma, ha permesso di individuare di 15 trasformanti con ridotte capacità di degradare la patulina rispetto al ceppo IAM 13481 non trasformato; per questo sono stati denominati *slower patulin degraders.*

Nonostante la mancanza di un sistema di segregazione genetica per l'assegnazione inequivocabile della funzione genica, l'analisi fenotipica dei trasformanti *slower patulin degraders*, correlata con i meccanismi di tossicità della patulina, ha permesso di assegnare la funzione dei geni disattivati dalle inserzioni di T-DNA. È stato possibile inoltre,

formulare nuove ipotesi riguardanti la degradazione della patulina da parte dei lieviti del *sub-phylum* Pucciniomycotina, in particolare *Sporobolomyces* sp. IAM 13481. La disattivazione nei trasformanti *slower patulin degraders* di geni coinvolti nella resistenza allo stress ossidativo e/o nel corretto funzionamento della membrana plasmatica e/o della parete cellulare, suggerisce che, oltre alla ipotizzata azione diretta di geni codificanti per enzimi che intervengono direttamente nel processo degradativo, esiste un ruolo indiretto esplicato dai geni identificati che permette inizialmente alle cellule di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 di resistere all'azione tossica della patulina, presumibilmente propedeutico alla degradazione della micotossina.

Nel complesso, la caratterizzazione genotipica e fenotipica dei mutanti inserzionali ottenuti mediante AMT in questo studio, indica che il T-DNA di *A. tumefaciens* può essere utilizzato con successo per creare mutazioni funzionali nel genoma del lievito basidiomicete *Sporbolomyces* sp. IAM 13481 al fine di comprendere le basi genetiche della degradazione della patulina. La continuazione del lavoro di *screening* di nuovi trasformanti permetterà di individuare nuovi geni coinvolti direttamente o indirettamente nel processo di degradazione della patulina e quindi di confermare le ipotesi formulate anche per quando riguarda un eventuale coinvolgimento delle diene lattone idrolasi nella degradazione della tossina.

Oltre a quanto esposto, sono attualmente in corso diversi esperimenti per cercare di aggirare i limiti incontrati per lo studio della funzione genica in LS11.

A livello molecolare, la strategia più promettente è quella di generare una genoteca di LS11 in un ospite filogeneticamente correlato. L'ospite della *library* deve essere in grado di tollerare la tossicità della patulina ma allo stesso tempo non deve essere in grado di metabolizzarla; da prove preliminari effettuate, l'auxotrofo JEC 43 (*ura5*) di *C. neoformans* è sembrato essere l'organismo più adatto a questo scopo. Per la generazione della *library*, frammenti di genoma di LS11 verranno generati mediante digestione con enzimi di restrizione, clonati in un vettore plasmidico episomico recante come *marker* il gene *URA5* di *C. neoformans* (i.e. pPM8) e inseriti mediante elettroporazione in JEC 43. La fase preliminare di *screening* dei trasformanti verrà effettuata utilizzando il biosaggio ad alta efficienza messo a punto da Wright *et al.* (2008). Diversamente da quanto riportato in questa tesi per lo *screening* dei mutanti inserzionali, nel caso della *library* verrà ricercato il trasformante che, come conseguenza dell'inserimento della porzione di genoma di LS11 recante il gene (o i geni) codificante per l'enzima (o gli enzimi) responsabile della

degradazione della tossina, avrà acquisito *ex novo* la capacità di metabolizzare la micotossina.

Un approccio biochimico complementare alla generazione della *library* è quello di identificare le proteine eventualmente prodotte in maniera differenziale da LS11 allevato in presenza di patulina; la loro sequenza aminoacidica permetterà di risalire alle rispettive sequenze codificanti che potranno essere amplificate, clonate e caratterizzate mediante espressione nello stesso organismo ospite della *library*.

Questo differenti approcci, inclusi i metodi di mutagenesi riportati nella presente ricerca, sono complementari tra loro e forniranno le informazione necessarie per tracciare un quadro completo sui meccanismi molecolari e biochimici che intervengono direttamente e indirettamente nella degradazione della patulina da parte lieviti del *sub-phylum* Pucciniomycotina; consentiranno inoltre, di comprendere le diverse cinetiche di degradazione osservate per i lieviti del genere *Sporobolomyces* e *R. kratochvilovae* LS11.

Infine, i diversi sistemi per lo studio della funzione genica descritti in questa tesi, abbinati a quelli in fase sperimentale, potrebbero rivelarsi anche un eccellente strumento per colmare la carenza di informazioni sui meccanismi genetico-molecolari che caratterizzano l'efficacia dell'attività di biocontrollo dei lieviti basidiomiceti studiati da tempo presso il laboratorio di patologia vegetale dell'Università degli Studi del Molise. La mancanza di un efficace sistema per lo studio della funzione genica, ha infatti permesso finora lo studio dei meccanismi d'azione degli antagonisti solo a livello fenotipico e biochimico (Castoria *et al.*, 1997, 2003).

TABELLE

Tabella 11: Ceppi utilizzati in questo studio. (ND: non determinato/non disponibile)		
Nome	**Caratteristiche genotipiche**	**Scopo/commento**
Ceppi		
R. kratochvilovae LS11	Wild type	degrada la patulina; utilizzato per gli esperimenti di trasformazione per identificare i geni coinvolti nella degradazione della patulina
IAM 13481 (Yamazaki and Komagata, 1983)	Wild type	Ceppo sequenziato (indicato come *Sporobolomyces* sp. IAM 13481); degrada la patulina
AIS2	*ura5*	Utilizzato per gli esperimenti di trasformazione per identificare i geni coinvolti nella degradazione della patulina
Pink5	*ura5 vps8::T-DNA-URA5*	Mutante inserzionale
5a	Inserzioni multiple	Mutante inserzionale
18a	ND	Mutante inserzionale
34a	*ura5 cyb5::T-DNA-URA5*	Mutante inserzionale
40a	*ura5 yck2::T-DNA-URA5*	Mutante inserzionale
123a	*ura5 cdc24::T-DNA-URA5*	Mutante inserzionale
596a	*ura5 pac2::T-DNA-URA5*	Mutante inserzionale
870a	Inserzioni multiple	Mutante inserzionale
938a	*ura5 ecm38::T-DNA-URA5*	Mutante inserzionale
954a	Inserzioni multiple	Mutante inserzionale
630b	Inserzioni multiple	Mutante inserzionale
958b	Omologo non identificato	Mutante inserzionale
164c	*ura5 gyp7::T-DNA-URA5*	Mutante inserzionale
523c	Inserzioni multiple	Mutante inserzionale
685c	*ura5 sso1::T-DNA-URA5*	Mutante inserzionale
Saccharomyces cerevisiae FY834(Winston *et al.,* 1995)	*MATα his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63*	Generazione di costrutti per la mutagenesi mirata
*vps8*Δ(9)	*ura5 vps8::URA5*	Delezione del gene *VPS8*
*dhl*Δ(3)	Non accertato	Possibile delezione del gene *DHL* (protein ID: 34178)
*dhl*Δ(55)	Non accertato	Possibile delezione del gene *DHL* (protein ID: 34178)

*rdhl*Δ(7)	Non accertato	Possibile delezione del gene *rDHL* (protein ID: 6066)
*rdhl*Δ(17)	Non accertato	Possibile delezione del gene *rDHL* (protein ID: 6066)

Tabella 12: Plasmidi utilizzati in questo studio.

Nome	Caratteristiche	Scopo
pPZP-HYG2 (Walton *et al.,* 2005)	*HPH* in pPZP-201BK	Trasformazione con *A. tumefaciens* EHA105
pPZP-NEO1 (Walton *et al.,* 2005)	*NEO* in pPZP-201BK	Trasformazione con *A. tumefaciens* EHA105
pPZP-NATcc (Walton *et al.,* 2005)	*NAT* in pPZP-201BK	Trasformazione con *A. tumefaciens* EHA105
pPZP-GFP-NATcc (Idnurm *et al.,* 2007)	*GFP* in pPZP-NATcc	Trasformazione con *A. tumefaciens* EHA105
pPZP-Hxk2.GFP-NATcc (Idnurm *et al.,* 2007)	Fusione della proteina dell'esochinasi Hxk2 nel pPZP-GFP-NATcc	Trasformazione con *A. tumefaciens* EHA105
pPZP-URA5 (questo studio)	*URA5* in pPZP-201BK	Trasformazione con *A. tumefaciens* EHA105
pRS426	ND	Sede della ricombinazione omologa in *S. cerevisae* FY834 per la generazione dei costrutti per la mutagenesi mirata

Tabella 13: Primer utilizzati in questo studio. Le basi sottolineate riportate in maiuscolo sono omologhe del gene *URA5*. Le basi sottolineate riportate in minuscolo sono omologhe a sequenze del plasmide pRS426 e corrispondono ai primer ALID0917e ALID0918

Nome	Sequenza (5'-3')	Scopo
M13_F	GTAAAACGACGGCCAG	Amplificazione del T-DNA dai vettori binari costruiti a partire dal pPZP-201BK
M13_R	ACAGGAAACAGCTATGAC	Amplificazione del T-DNA dai vettori binari costruiti a partire dal pPZP-201BK
InNAT_F	CCACTCTTGACGATACGGCTTAC	Amplificazione nella ORF del gene *NAT*
InNAT_R	TTAGTGACTTCCAACCAGAGG	Amplificazione nella ORF del gene *NAT*
outNAT_F	CATCCCCCACCCACTGC	Amplificazione nella cassetta del gene *NAT*
outNAT_R	TCGCCCTTGAAGAGATGTAGAAA	Amplificazione nella cassetta del gene *NAT*
InHYG_F	GCTTCTGCGGGCGATTTGTGTA	Amplificazione nella ORF del gene *HPH*
InHYG_R	CTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATA	Amplificazione nella ORF del gene *HPH*
outHYG_F	ACCCCTTACCGCCTTCACCTATTC	Amplificazione nella cassetta del gene *HPH*
outHYG_R	CTTATCGCACCCACCGCCTATCG	Amplificazione nella cassetta del gene *HPH*
invHYG_F	GGACATATCCACGCCCTCCTA	*inverse* PCR dei putativi trasformanti ottenuti con il vettore pPZP-HYG2
invHYG_R	CGTACACAAATCGCCCGCAGAAGC	*inverse* PCR dei putativi trasformanti ottenuti con il vettore pPZP-HYG2
InNEO_F	GCCAACGCTATGTCCTG	Amplificazione nella ORF del gene *NEO*
InNEO_R	GGGCGCCCGGTTCTTTTTGTC	Amplificazione nella ORF del gene *NEO*

outNEO_F	AACCCCTTACCGCCTTCACTCAG	Amplificazione nella cassetta del gene *NEO*
outNEO_R	TCCTCCGCCAGCATCCACATACAT	Amplificazione nella cassetta del gene *NEO*
inGFP_F	GTGAGCAAGGGCGAGGAG	Amplificazione nella ORF del gene *GFP*
inGFP_R	CATGATATAGACGTTGTGGCTGTT	Amplificazione nella ORF del gene *GFP*
ai76	AACAGTTGCGCAGCCTGAATG	*inverse* PCR per i trasfromanti ottenuti con i plasmidi costruiti a partire dal pPZP-201BK
ai77	AGAGGCGGTTTGCGTATTGG	*inverse* PCR per i trasfromanti ottenuti con i plasmidi costruiti a partire dal pPZP-201BK
ALID0562	TCTCTCCCTGGAAAGACC	Amplificazione e sequenziamento del gene *URA5*
ALID0563	AGCGTGTACGAAGGACTG	Sequenziamento del gene *URA5, Double Joint PCR* e conferma *gene replacemnet*
ALID0564	AACCCTTCGTTCTACTTG	Amplificazione e sequenziamento del gene *URA5*
DoubleJoint URA5_R (DJ URA5 R)	GAGATGAGGGACGCCGCAT	*Double Joint PCR* e conferma *gene replacemnet*
1.VPS8	GCGATCTCCCAGGATCACACTTTC	Amplificazione della regione 5' del gene *VPS8*
2.VPS8	GGTCTTTCCAGGGAGAGAGGCATAGAAATCATTCGA	Amplificazione della regione 5' del gene *VPS8*
3.VPS8	CAAGTAGAACGAAGGGTTCAAGAACTCGCCGCAACG	Amplificazione della regione 3' del gene *VPS8*
4.VPS8	CTTGGAAGAGAGCGAGAG	Amplificazione della regione 3' del gene *VPS8*
5.VPS8	gttttcccagtcacgacgGCGATCTCCCAGGATCACAC	Amplificazione della regione 5' del gene *VPS8*

6.VPS8	tttcacacaggaaacagcCTTGGAAGAGAGCGAGAG	Amplificazione della regione 3' del gene *VPS8*
ALID0917	gttttcccagtcacgacg	Amplificazione da *S. cerevisae* FY834dei costrutti per il *gene replacement*
ALID0918	tttcacacaggaaacagc	Amplificazione da *S. cerevisae* FY834dei costrutti per il *gene replacement*
outVPS8_F	GAAACTTCTGCGGCAGCTTC	Conferma del *gene replacemnet* nei mutanti *vps8Δ*
outVPS8_R	GGTTGCAAACATTCTGCGCAT	Conferma del *gene replacemnet* nei mutanti *vps8Δ*
1. DienelactoHydro_F	GGCGATCAACGGAGTCGACC	Ottenimento della sonda per il Southern Blot dei mutanti *dhlΔ*
4. DienelactoHydro_F	GGCGAAGTATCGACTGCCG	Ottenimento della sonda per il Southern Blot dei mutanti *dhlΔ*
7. DienelactoHydro_F	GGAAGACCTGCGAAGGAAG	Conferma *gene replacement* nei mutanti *dlhΔ*
8. DienelactoHydro_R	GTCGTTCGAGCCGAAAGTTG	Conferma *gene replacement* nei mutanti *dlhΔ*
9.DienelactoHydro_F	gttttcccagtcacgacgCGTGATTTACAACTGTCAGG	Amplificazione della regione 5' del gene *DLH*
10.DienelactoHydro_R	GGTCTTTCCAGGGAGAGAGGAATCAGTCGCCGAGAC	Amplificazione della regione 5' del gene *DLH*
11.DienelactoHydro_F	CAAGTAGAACGAAGGGTTGGAGACGACACTCTCGTT	Amplificazione della regione 3' del gene *DLH*
12.DienelactoHydro_R	tttcacacaggaaacagcGGAGCTCTCGCTTGACCAC	Amplificazione della regione 3' del gene *DLH*
1.7.OutDienelactoHydro_F	GGCAGGTTACTCGGAGGCGTG	Conferma *gene replacement* nei mutanti *rdlhΔ*
1.8.OutDienelactoHydro_R	GGAGGCCAACAAGTCAGTTC	Conferma *gene replacement* nei mutanti *rdlhΔ*
1.9.DienelactoHydro_F	gttttcccagtcacgacgGGAGAAATGTACGAGCAAG	Amplificazione della regione 5' del gene *rDLH*

1.10.DienelactoHydro_R	GGTCTTTCCAGGGAGAGAGGTAGTCGACGACGTAAG	Amplificazione della regione 5' del gene *rDLH*
1.11.DienelactoHydro_F	CAAGTAGAACGAAGGGTTGGTGTCAAGCGATTCGGC	Amplificazione della regione 3' del gene *rDLH*
1.12.DienelactoHydro_R	tttcacacaggaaacagccCCTACAAGACGAGTGCCC	Amplificazione della regione 3' del gene *rDLH*

Tabella 14: Funzione dei geni disattivati dalle inserzioni di T-DNA nei mutanti *slower patulin degraders*

Gene	Descrizione	Processo biologico	ID della proteina
CYB5	Citocromo b5. Agisce come donatori di elettroni nel processo di desaturazione dello sterolo tra il carbonio 5 e 6	Coinvolto nel pathway biosintetico di steroli e lipidi	25510
YCK2	Yeast casein Kinase. Proteina di membrana associata con la proteina yck1	Coinvolto nella morfogenesi, nel traffico endocitico e indirettamente nella biogenesi della parete cellulare	3129
PAC2	Effettore dei microtubuli richiesto per la formazione di eterodimeri con la alfa-tubulina	Richiesto per la normale funzione dei microtubuli	29097
ECM38	*Gamma-glutamyltranspeptidase*	Coinvolto nel *turnover* del glutatione	11574
Omologo non identificato	Chitinasi	Coinvolto nel trasporto e nel metabolismo dei carboidrati	28891
CDC24	Fattore di scambio di guanine (*GEF = Guanine nucleotide exchange factor*) per la proteina Cdc42 nel *Ras signaling pathway*.	Coinvolto nella resistenza allo stress ossidativo e nel mantenimento dell'integrità della parete cellulare e della membrana plasmatica	31953
GYP7	*GTPase-activating protein* per le proteina della Rab *family* (Ypt7p, Ypt1p, Ypt31p e Ypt32p);	Attivazione di proteine Rab coinvolte nel traffico vescicolare di proteine verso la membrana plasmatica	31394
VPS8	Proteina vacuolare di membrana necessaria per il traffico vescicolare tra il Golgi e gli endosomi e tra gli endosomi e i vacuoli	Coinvolto nella resistenza allo stress ossidativo e nel mantenimento dell'integrità della membrana cellulare	72
SSO1	Proteina del complesso t-SNARE della membrana plasmatica	Coinvolto nel trasporto e nella fusione delle vescicole sulla membrana plasmatica e nella fusione delle vescicole durante la sporulazione	25176
MCM1	Fattore di trascrizione	Ruolo pleiotropico nella cellula (mantenimento dell'integrità della membrana cellulare e resistenza a stress ossidativo)	28951

FIGURE

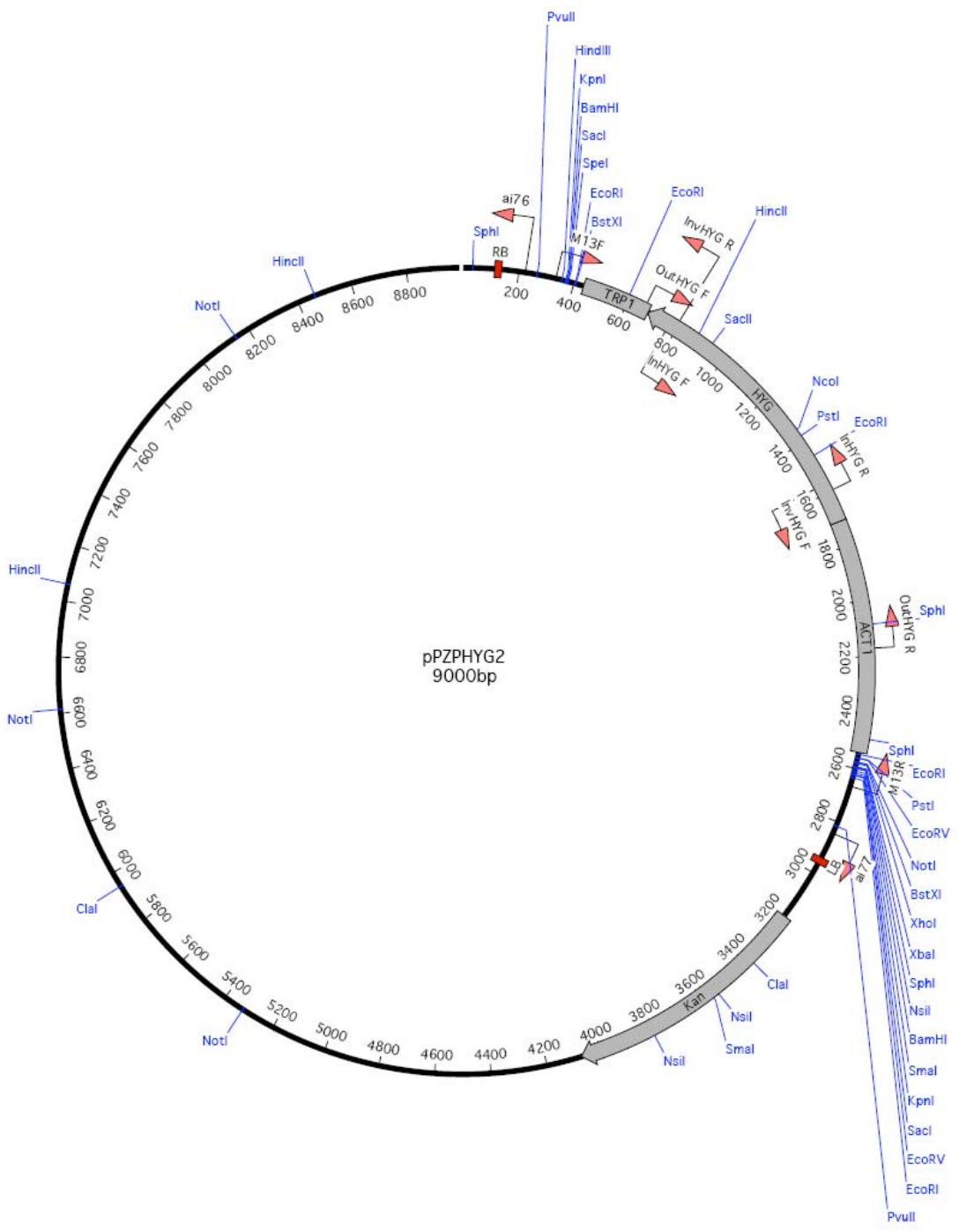


Figura 16: Mappa del plasmide pPZP-HYG2 dove sono riportati il gene che conferisce resistenza all'igromicina B (con relativi promotore e terminatore) e il gene che conferisce resistenza alla kanamicina; inoltre sono riportati i *border* destro e sinistro del T-DNA (*box* rossi), i principali siti di restrizione e i *primer* (frecce arancioni) utilizzati negli esperimenti di PCR. La mappa del plasmide è stata creata utilizzando il programma "MacVector versione 10".

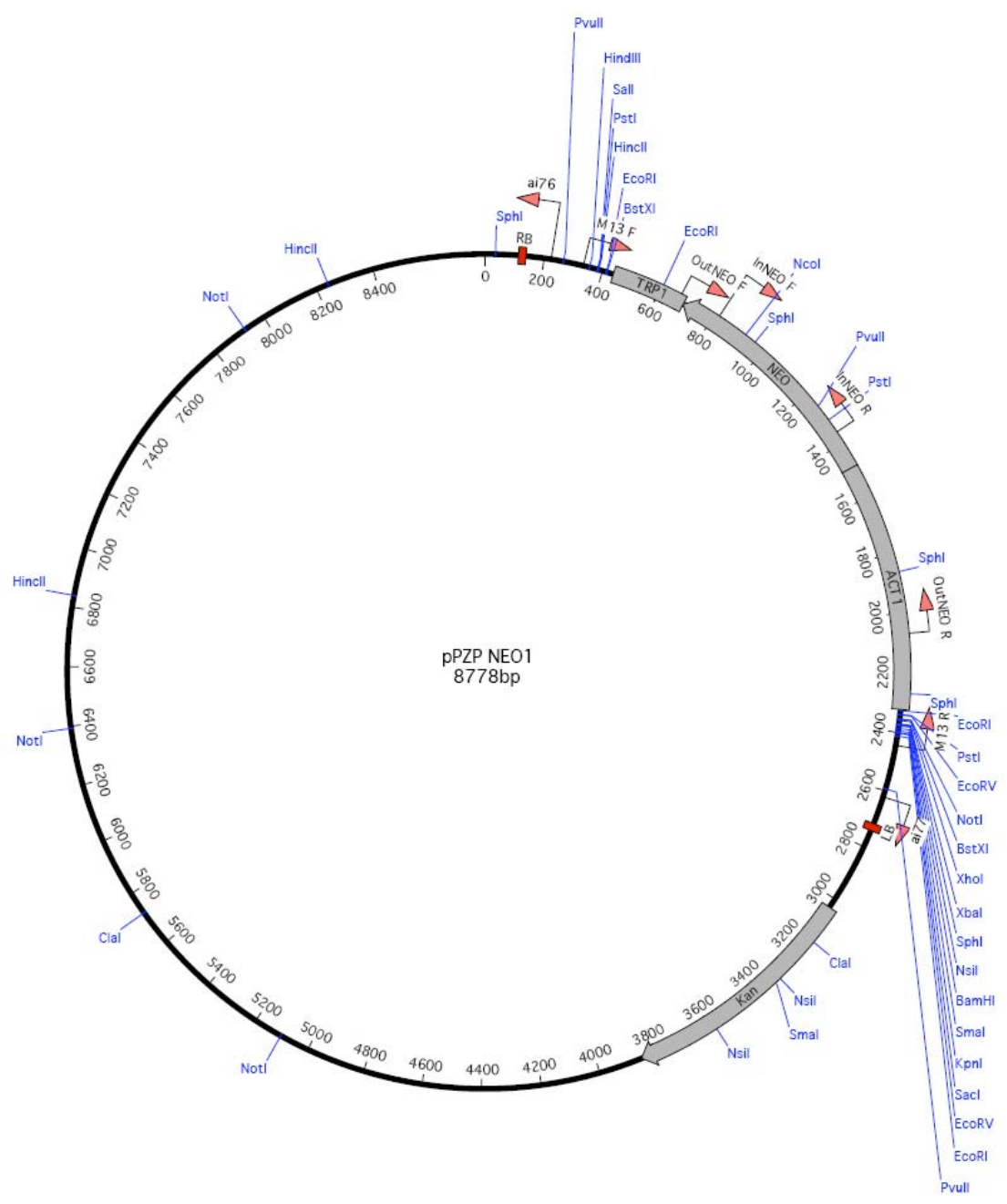


Figura 17: Mappa del plasmide pPZP-NEO1 dove sono riportati il gene che conferisce resistenza alla neomicina G418 (con relativi promotore e terminatore) e il gene che conferisce resistenza alla kanamicina; inoltre sono riportati i *border* destro e sinistro del T-DNA (*box* rossi), i principali siti di restrizione e i *primer* (frecce arancioni) utilizzati negli esperimenti di PCR. La mappa del plasmide è stata creata utilizzando il programma "MacVector versione 10".

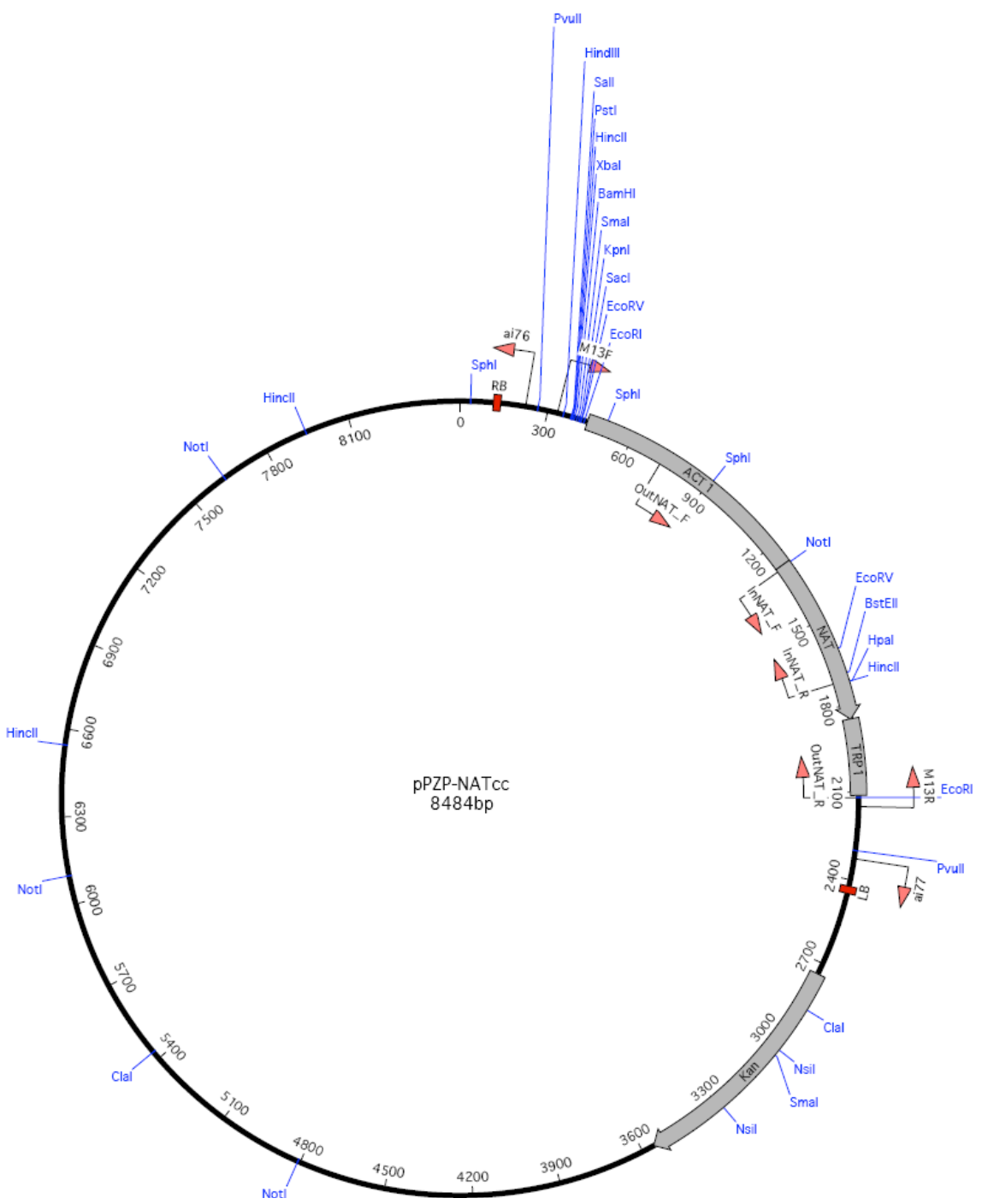


Figura 18: Mappa del plasmide pPZP-NATcc dove sono riportati il gene che conferisce resistenza alla nourseotricina (con relativi promotore e terminatore) e il gene che conferisce resistenza alla kanamicina; inoltre sono riportati i *border* destro e sinistro del T-DNA (*box* rossi), i principali siti di restrizione e i *primer* (frecce arancioni) utilizzati negli esperimenti di PCR. La mappa del plasmide è stata creata utilizzando il programma "MacVector versione 10".

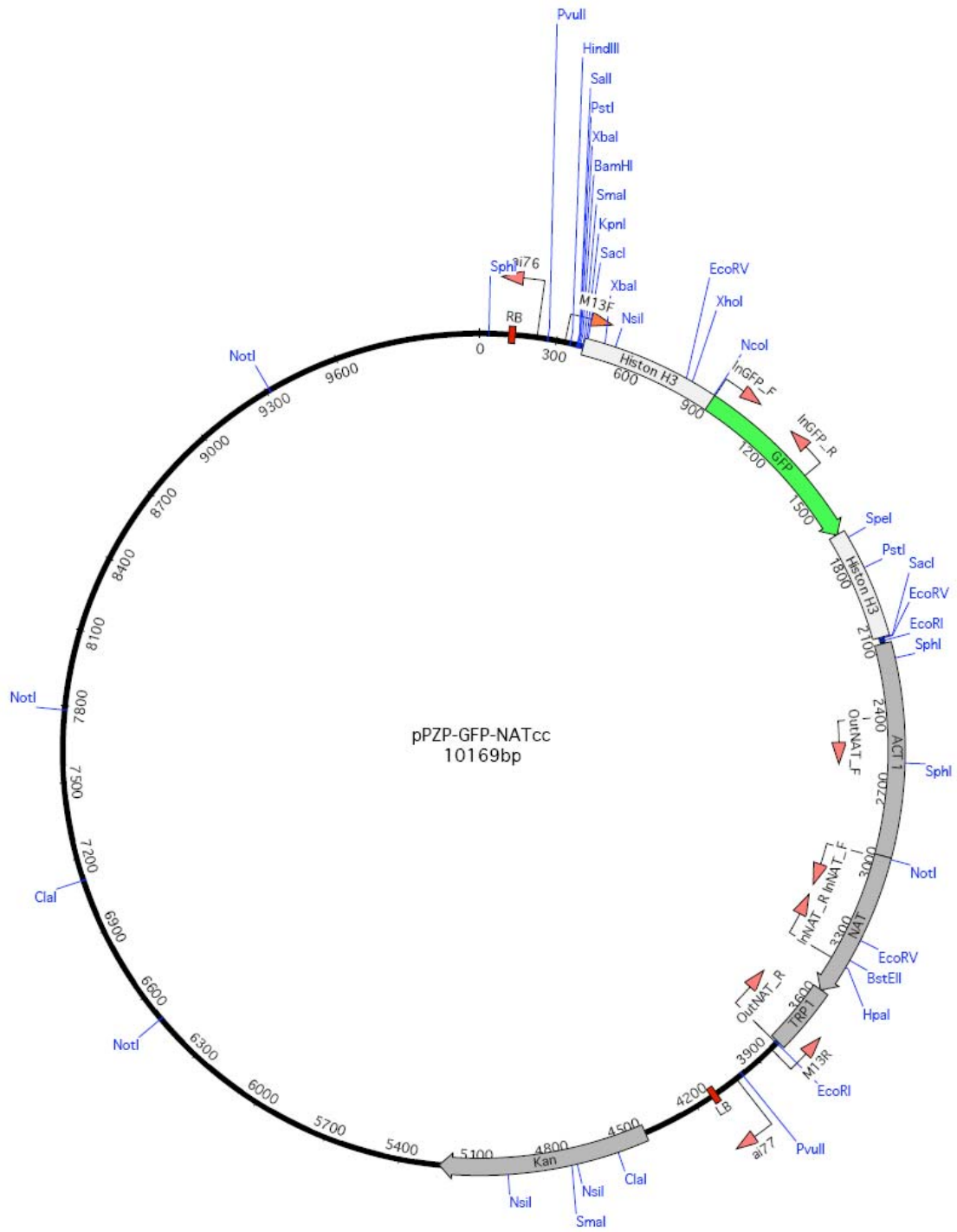


Figura 19: Mappa del plasmide pPZP-GFP-NATcc dove sono riportati il gene che conferisce resistenza alla nourseotricina (con relativi promotore e terminatore), il gene che codifica per la proteina fluorescente GFP (in verde) con relativi promotore e terminatore e il gene che conferisce resistenza alla kanamicina; inoltre sono riportati i *border* destro e sinistro del T-DNA (*box* rossi), i principali siti di restrizione e i *primer* (frecce arancioni) utilizzati negli esperimenti di PCR. La mappa del plasmide è stata creata utilizzando il programma "MacVector versione 10".

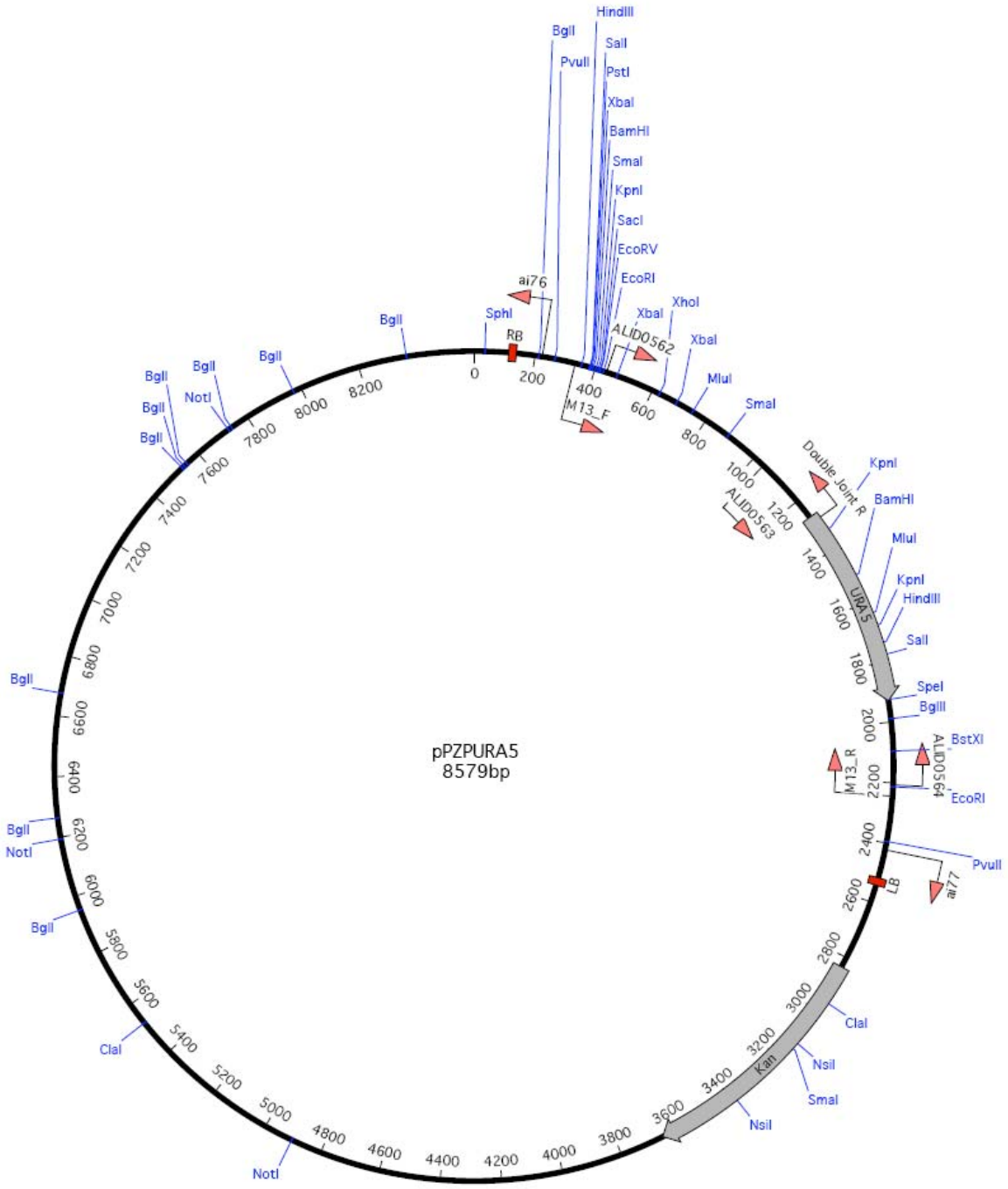


Figura 20: Mappa del plasmide pPZPURA5 dove sono riportati il gene *URA5* e il gene che conferisce resistenza alla kanamicina; inoltre sono riportati i *border* destro e sinistro del T-DNA (*box* rossi), i principali siti di restrizione e i *primer* (frecce arancioni) utilizzati negli esperimenti di PCR. La mappa del plasmide è stata creata utilizzando il programma "MacVector versione 10".

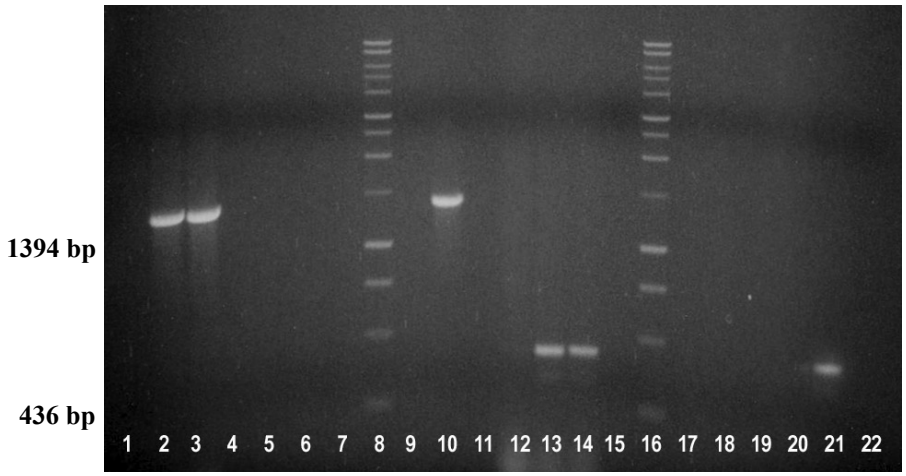


Figura 21: Analisi PCR condotta con i primer OutNAT_F e R (*lanes* 1-11) e InNAT_F e R (*lanes* 12-22) sul DNA genomico di *R. kratochvilovae* LS11 (*lanes* 4 e 15) e relativi trasformanti NAT^r (*lanes* 4-9 e 17 - 20), sul DNA genomico del ceppo JEC 21 di *C. neoformans* (*lanes* 1 e 12) e relativi trasformanti NAT^r (*lanes* 4 - 3 e 13 - 14) e sul vettore binario pPZP-NATcc usato per la AMT (*lanes* 10 e 21); nelle *lanes* 11 e 22 è stato caricato un controllo di reazione PCR senza DNA, mentre in 8 e 16 è stato caricato il DNA ladder (1 Kb ladder, Invitrogen). Il numero riportato in casella indica la grandezza delle bande ottenute

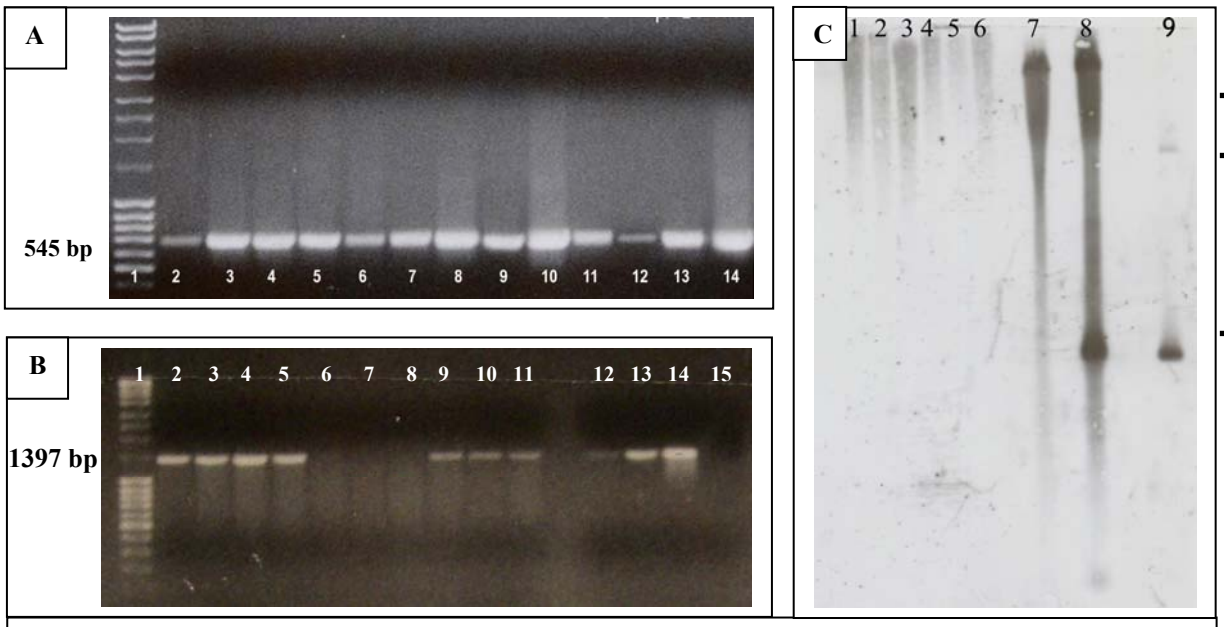


Figura 22: Analisi PCR condotta con i primer InNEO_F e R (A) e OutNEO_F e R (B) sul DNA genomico di *R. kratochvilovae* LS11 (*lane* 2) e relativi trasformanti NEO^r (*lanes* 3-11), del ceppo JEC 21 di *C. neoformans* (*lane* 12) e relativo trasformante NEO^r (*lane* 13), e sul vettore binario pPZP-NEO1 usato per la AMT (*lane* 14); nel pozzetto 15 (B) è stato caricato un controllo di reazione PCR senza DNA, mentre in 1 è stato caricato il DNA ladder (Mass Ruler, Fermentas). Accanto alle figure è riportata in bp la grandezza delle bande ottenute.
Nel box C è riportata un'analisi *Southern blot* condotta sui trasformanti NEO^r di *R. kratochvilovae* LS11 (*lanes* 2-6) e *C. neoformans* (*lane* 8); nelle *lanes* 1 -7 sono stati caricati i DNA genomici dei ceppi LS11 e JEC21 WT non trasformati, mentre nella *lane* 9 è stato caricato il vettore binario pPZP-NEO1 anch'esso digerito con l'enzima di restrizione EcoRI.

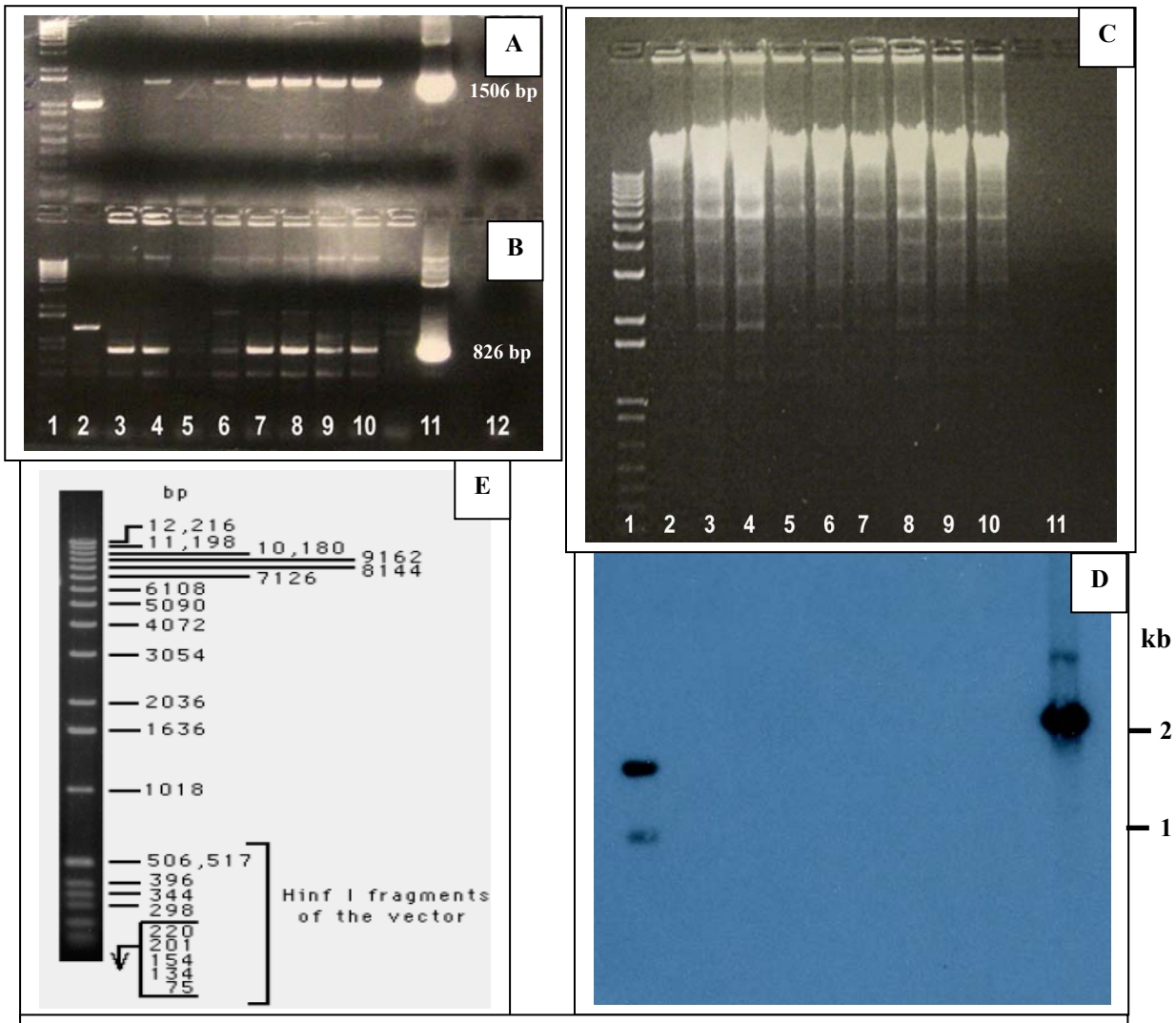


Figura 23: Analisi PCR (A - B) e *Southern blot* (D) condotta sui putativi trasformanti HYG^r di *R. kratochvilovae* LS11. PCR condotta con i primer OutHYG_F e R (A) e InHYG_F e R (B) sul DNA genomico di *R. Kratochvilovae* ceppo LS11 (lane 2), sui relativi trasformanti HYG^r (*lanes* 3-10) e sul vettore binario pPZP-HYG2 (*lane* 11); nel pozzetto 12 è stato caricato un controllo di reazione PCR senza DNA, mentre in 1 è stato caricato il DNA ladder (1Kb, Invitrogen).
Analisi elettroforetica (C) dei DNA genomici, digeriti con ClaI, del ceppo LS11 non trasformato (*lane* 2) e dei relativi trasformanti HYG^r (*lanes* 3-10); nella *lane* 11 sono stati caricati 150 pg dello stesso frammento di DNA utilizzato anche come sonda. In D è riportato il *Southern* eseguito dal trasferimento del gel riportato in C. Nella *lane* 1 è stato caricato il DNA ladder (1Kb, Invitrogen) (E).

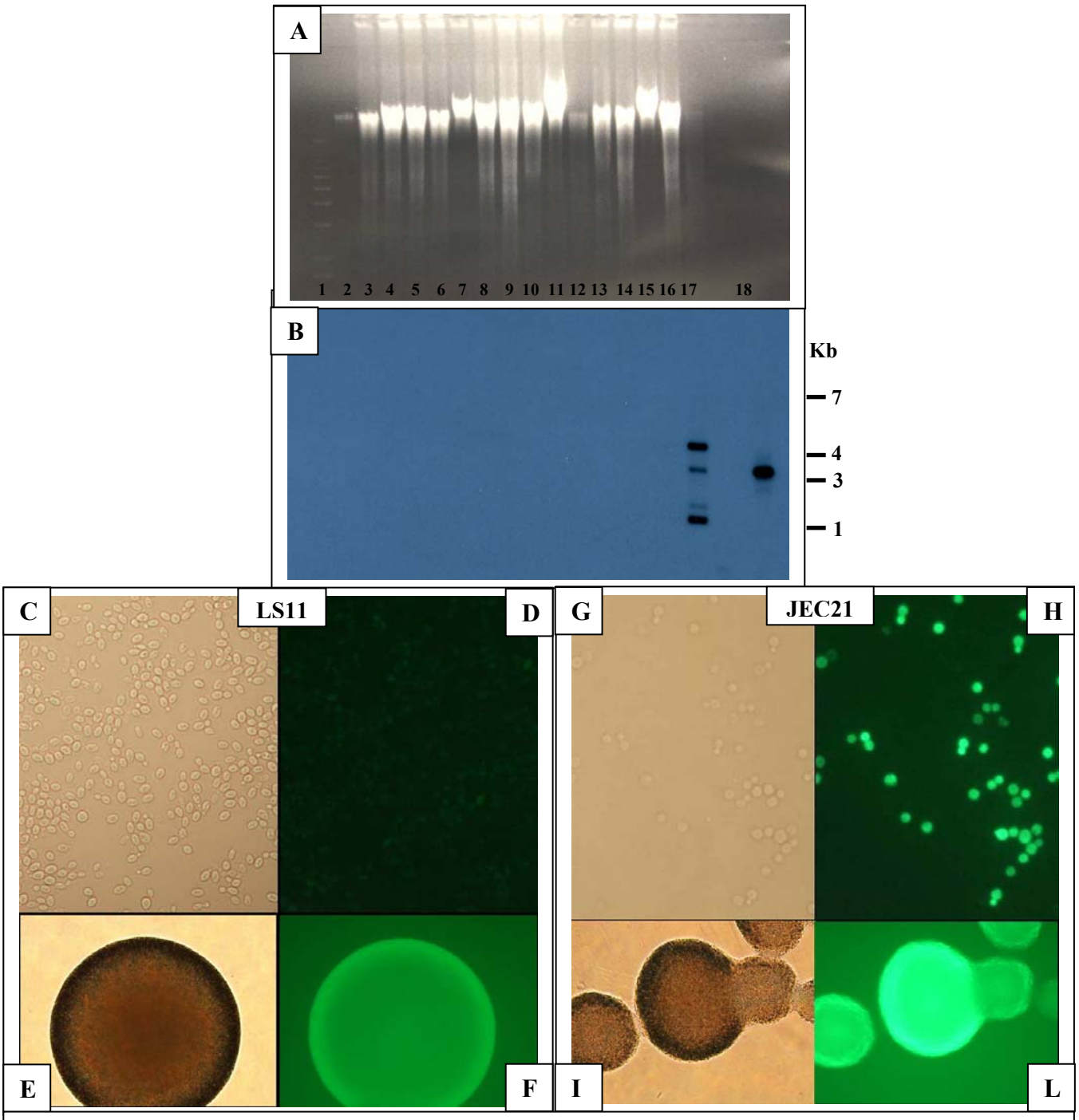
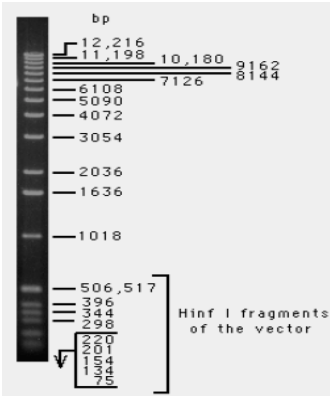


Figura 24: Analisi elettroforetica (A) dei DNA genomici digeriti con EcoRV del ceppo LS11 WT (*lane* 2), dei relativi trasformanti generati coi vettori pPZP-GFP-NATcc (*lanes* 3-8) e pPZP-Hxk2.GFP-NATcc (lanes 9-16), e del trasformante di JEC21 generato col vettore pPZP-Hxk2.GFP-NATcc (*lane* 17). Nella *lane* 18 sono stati caricati 150 pg dello stesso frammento di DNA utilizzato anche come sonda, mentre in 1 è stato caricato il DNA ladder (1Kb, Invitrogen). In (B) è riportato il *Southern blot* ottenuto dal trasferimento del gel riportato in A.
Espressione della GFP da trasformanti di LS11 (C-F) e JEC 21 (G–L), ottenuti con il vettore pPZP-Hxk2.GFP-NATcc, al microscopio ottico (C-D e G-H, rispettivamente) (40 X) e allo stereoscopio (5X) (E-F e I-L, rispettivamente) alla luce normale (C-E e G-I, rispettivamente) e utilizzando filtri con eccitazione di 480/40 nm e emissione di 527/30 nm (D-F e H-L, rispettivamente).



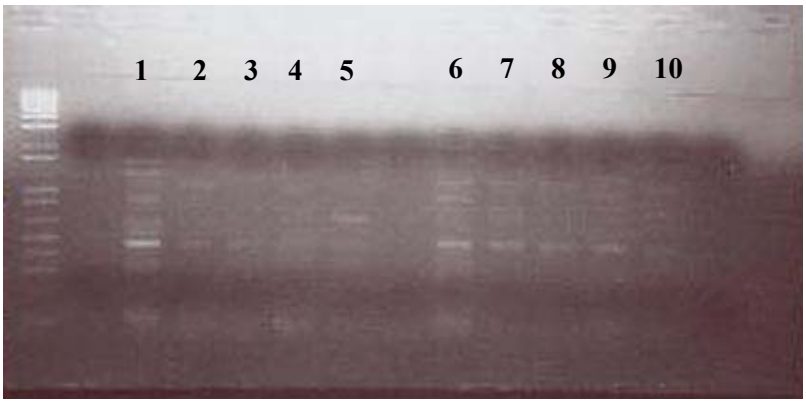


Figura 25: Analisi *inverse* PCR condotta su *R. kratochvilovae* LS11 WT (*lanes* 1 e 6) e sui relativi trasformanti HYG^r (*lanes* 2 – 5 e 7 – 10) precedentemente risultati positivi alle PCR. In 1 – 5 i DNA genomici dei putativi trasformanti sono stati digeriti con l'enzima di restrizione ClaI, mentre in 6 – 10 sono stati digeriti con BglII.

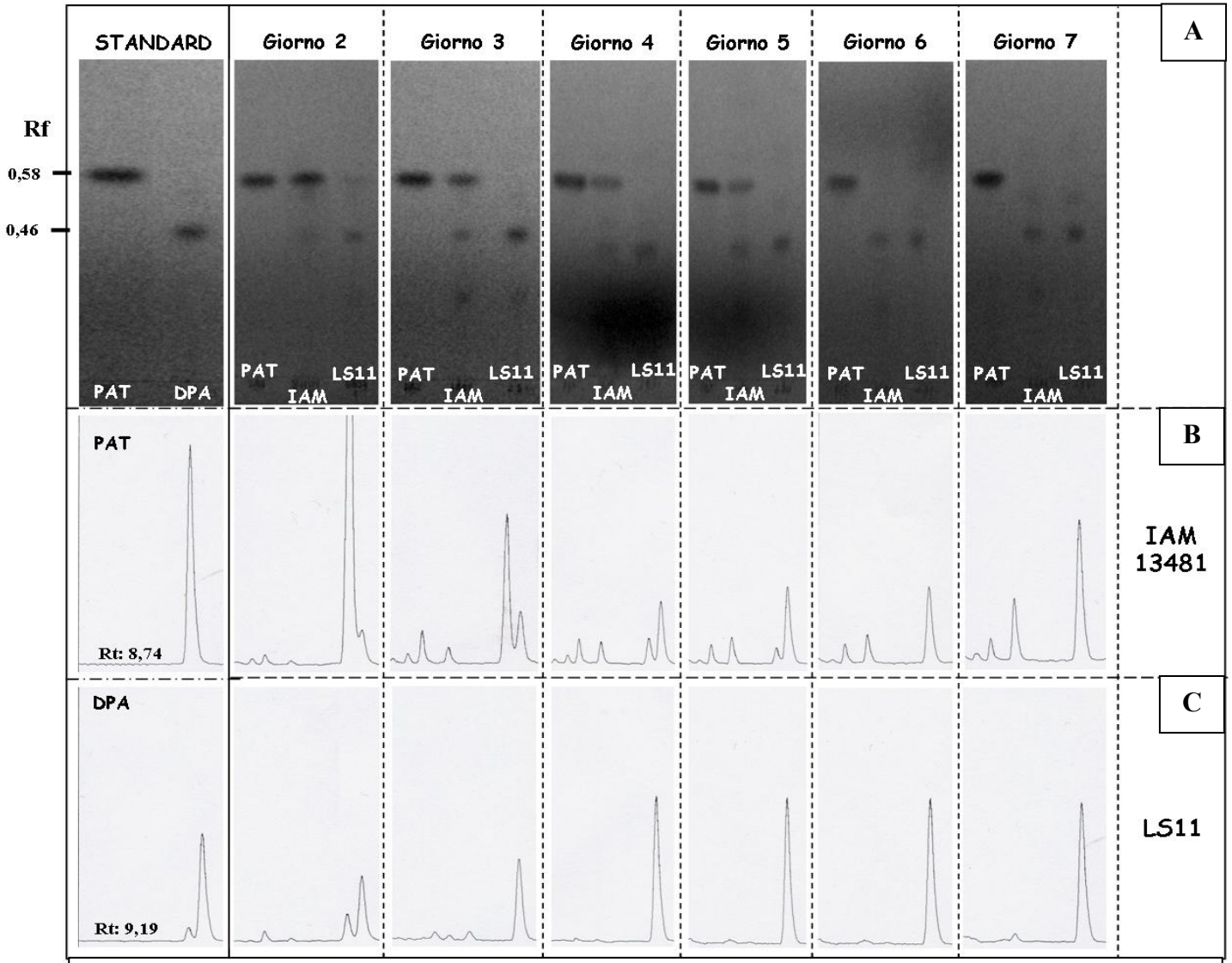


Figura 26: ***Time course*** **della degradazione di 100 µg/ml di patulina in terreno LIlly-Barnett da parte di** ***Sporobolomyces*** **sp. IAM 13481 (A e B) e di** ***R. kratochvilovae*** **LS11 (A e C); i filtrati colturali ottenuti sono stati analizzati mediante TLC (A) e HPLC (B e C); gli** ***spot*** **(per la TLC) e i picchi (per l'HPLC) ottenuti sono stati comparati con quelli relativi agli standard di patulina e DPA (riquadri a sinistra dei box A, B e C).**

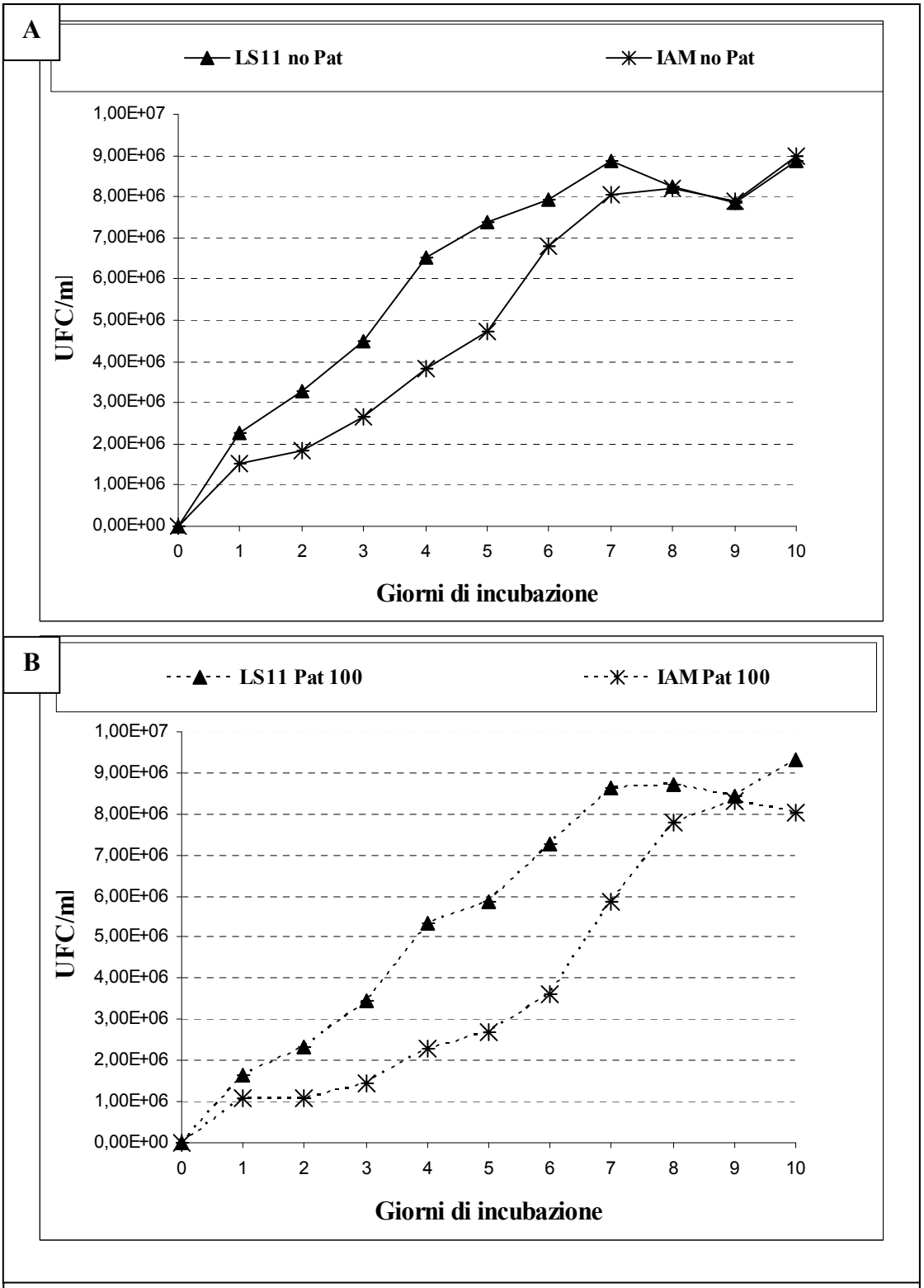


Figura 27: Curve di crescita di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 e *R. kratochvilovae* LS11 in terreno liquido Lilly Barnett in assenza (A) ed in presenza di 100 µg/ml di patulina (B). I dati di UFC sono stati ricavati mediante confronto delle medie delle OD (595 nm) misurate con le curve standard precedentemente calcolate. Ad ogni *time point* i simboli rappresentano la media ± deviazione standard calcolata sui valori ricavati da tre letture spettrofotometriche della OD (595 nm).

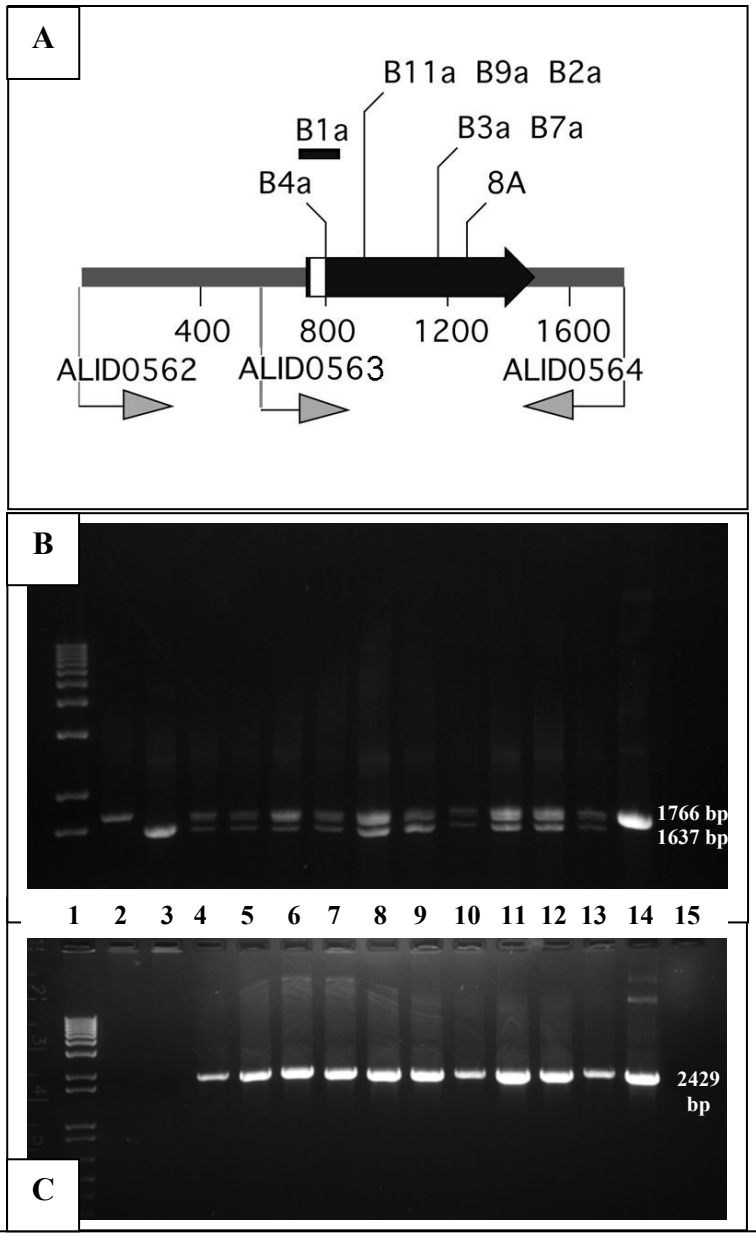


Figura 28 A: Alleli *URA5* identificati negli auxotrofi derivati da *Sporobolomyces* sp. IAM 13481. La regione codificante è in nero, gli introni in bianco. La posizione delle mutazioni negli auxotrofi è riportata in alto. Per l'ottenimento delle sequenze sono stati utilizzati i primer ALID0562, ALID0563 e ALID0564. La mutazione B1a nell'auxotrofo AIS2 consiste in una delezione di 129 bp (AACAGAAT...TCTCTCTC).
Analisi PCR condotta con i primer ALID0562-ALID0564 (B) e M13_F-M13_R (C) sul DNA genomico di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (lane 2), dell'auxotrofo AIS2 (*lane* 3), di 10 trasformati ottenuti mediante AMT selezionati a *random* (*lanes* 4-13) e del vettore pPZP-URA5 (Fig.20) utilizzato per la trasformazione (*lane* 14); nel pozzetto 15 (b) è stato caricato un controllo di reazione senza DNA e in 1 è stato caricato il DNA ladder (1kb Ladder, Invitrogen). Alla destra delle figure è riportata in bp la grandezza delle bande ottenute.

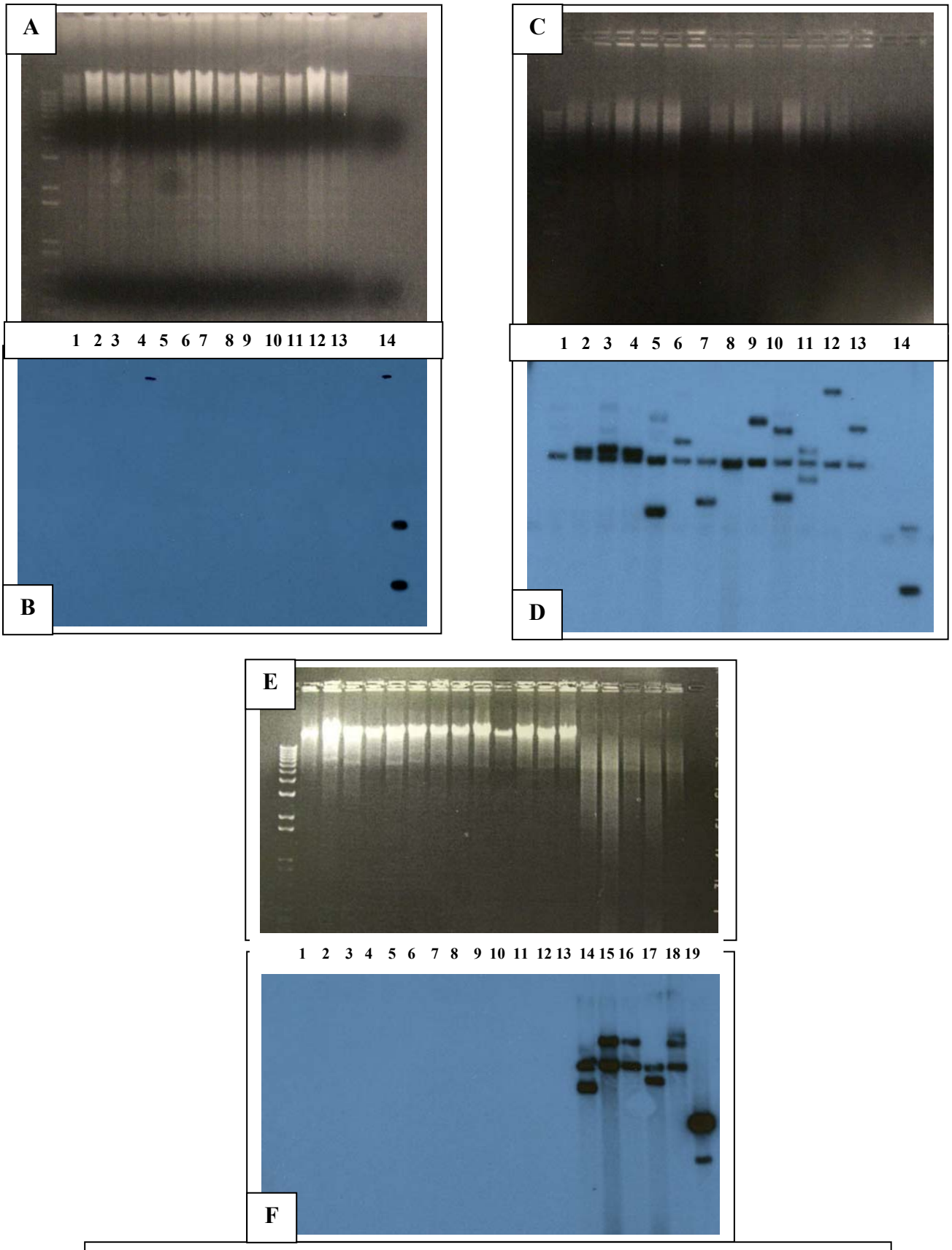


Figura 29: Analisi elettroforetica (A, C, E) dei DNA genomici digeriti con ClaI del putativo auxotrofo di LS11 Rgpo1 (*lane* 1, box A, E) e putativi trasformanti (*lanes* 2-13 box A, E), dell'auxotrofo AIS2 derivato da *Sporobolomyces* Sp. IAM 13481 (*lane* 1, box C) e relativi trasformanti (*lanes* 2-13 del box C e *lanes* 14-18 del box F); in corrispondenza della *lanes* 14 (box A, C) e 19 (box E) sono stati caricati 500 pg dello stesso frammento di DNA utilizzato anche come sonda.

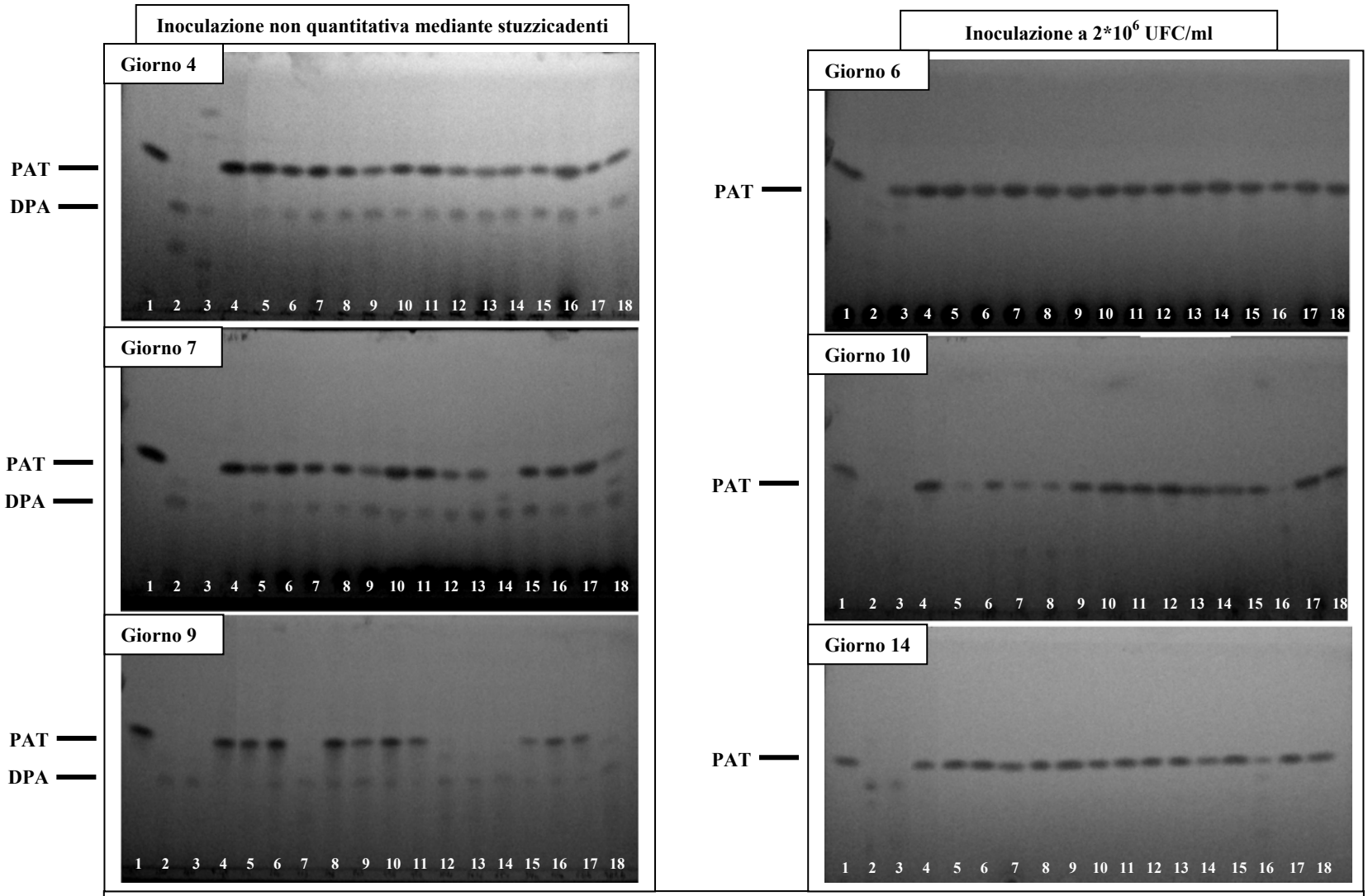
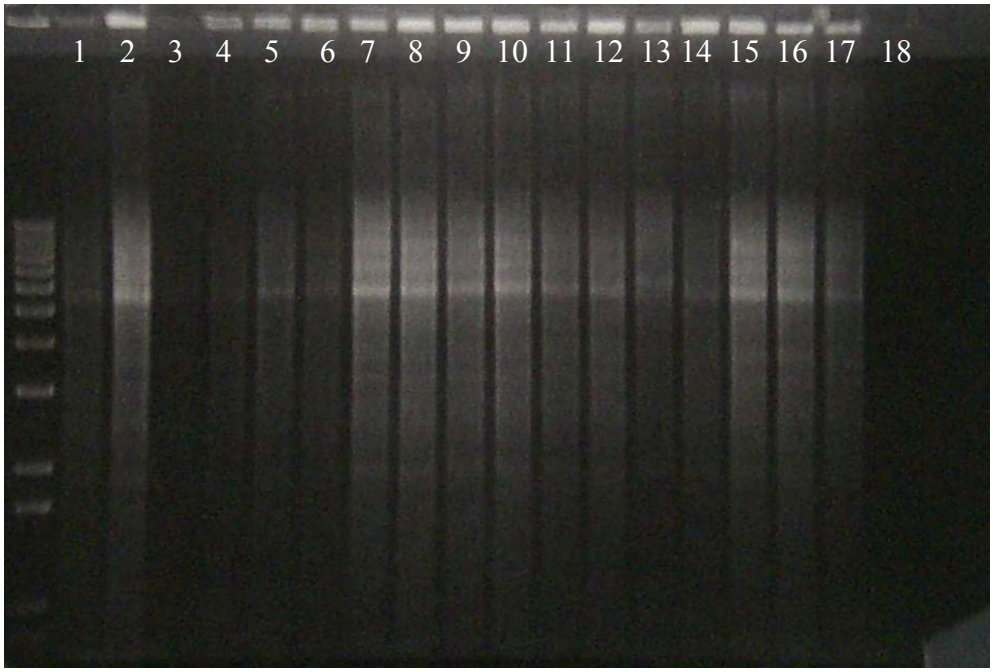


Figura 30: ***Time course*** **della degradazione della patulina [(50 µg/ml),** ***lane*** **1] da parte di LS11 (*lane* 2), *Sporobolomyces* sp. IAM 13481 (*lane* 3) e mutanti inserzionali *slower patulin degraders* (*lanes* 4-18) inoculati mediante uno stuzzicadenti sterile (colonna di sinistra) o ad una concentrazione iniziale di 2*10^6 UFC/ml (colonna di destra). *Slower patulin degraders*: *lanes* 4: Pink5; 5: 5a; 6: 18a; 7: 123a; 8: 596a; 9: 870a; 10: 938a; 11: 954a; 12: 164c; 13: 523c; 14: 685c; 15: 34a; 16: 40a; 17: 630b; 18: 985b.**



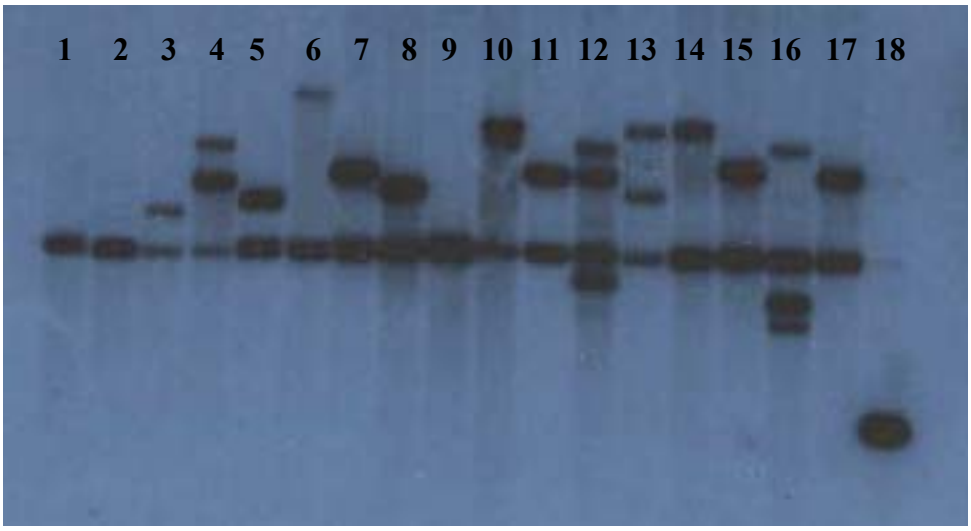


Figura 31: Analisi elettroforetica e *Southern blot* dei DNA genomici digeriti con ClaI del ceppo IAM 13481 *Sporobolomyces* sp. (*lane* 1), dell'auxotrofo AIS2 (*lane* 2) e dei mutanti inserzionali *slower patulin degraders* (*lanes* 3-17). In 18 sono stati caricati 200 pg dello stesso frammento di DNA utilizzato anche come sonda. *Slower patulin degraders*: *lanes* 3: Pink5; 4: 5a; 5: 18a; 6: 34a; 7: 40a; 8: 123a; 9: 596a; 10: 870a; 11: 938a; 12: 954a; 13: 630b; 14: 985b; 15: 164c; 16: 523c; 17: 685c.

```
Cyb5(ID:25510)      R  G  V  A  L  L  R  E
Wild type          CGTGGTGTTGCGCTTCTACGAGAGC----------------------------
34a                CGTGGTGTTGCGCTTCTACGAGAGCAGGATATATTGTGGTGT..T-DNA..
Position:          scaffold_2:1353008-1364757

Yck2(ID:3129)       G  T  S  S  A                S                G  N  N  S  S  S
Wild type          GGAACGAGTTCTGCC --------------AGT------------- GGAAACAACAGTTCGAGT
40a                GGAACGAGTTCTGCCTCA..T-DNA..ACACCACAATATATCCGGAAACAACAGTTCGAGT
Position:          scaffold_6:717091-718643

Pac2(ID:29097)      K  H  S  G  T  Y                                        D  K  T  G  V
Wild type          AAACACAGCGGGACCTAC------------------------------------- GACAAGACGGGAGTC
596a               AAACACAGCGGGACCTACAGGATATATTGTGGTGT..T-DNA..TGAGACCTACGACAAGACGGGAGTC
Position:          scaffold_10:428361-430211

Protein 28891       S  Q  K  I  A  A  R  N  A
Wild type          AGTCAAAAAATCGCAGCTCGGAACGCT----------------------
958b               AGTCAAAAAATCGCAGCTCGGAACGCTTCA..T-DNA..
Position:          scaffold_9:464821-467858

Cdc24(ID:31953)                          Promoter
Wild type          -----------------------TGGTGCTCGGGCGGTGGTGCCTGAAGGCGGAGATGAGGCG
123a                        ..T-DNA..TGATGGTGCTCGGGCGGTGGTGCCTGAAGGCGGAGATGAGGCG
Position:          scaffold_2:2158199-2162841

Gyp7 (ID: 31394)                            Promoter
Wild type          -------------------------------------ACATTTACGGCGCACTCGCCA
164c                      ..T-DNA..CACCACAATATATCCTGCACATTTACGGCGCACTCGCCA
Position:          scaffold_1:2182517-2188733

Vps8(ID:72)         D  W  L  F  D  E  L  Y  E
Wild type          GACTGGCTCTTCGACGAATTGTACGAAC------------------
Pink 5 (RB)        GACTGGCTCTTCGACGAATTGTACGAACTCA..T-DNA..
Position:          scaffold_1:969930-974240

                             No coding region
Wild type          GAGCTCAGAACCAGACCCTC--------------------------
Pink 5 (LB)         GAGCTCAGAACCAGACCCTCGACAACTTAATAA..T-DNA
Position:          scaffold_1:1127749-1127807

Sso1(ID:25176)                              Intron
Wild type          ggagcgaacccagctcaccgttgccttggat-------------------
685c (RB)          ggagcgaacccagctcaccgttgccttggatTTCTCTTAG..T-DNA
Position:          scaffold_2:120398-133167

Ilm1(ID:25175)      T  I  A  R  D  I  S  T
Wild type          ACGATCGCACGAGACATTTCTACGGT---------------------------
685c (LB)          ACGATCGCACGAGACATTTCTACGGTCCGACGACC..T-DNA
Position:          scaffold_2:114304-119976

                                  No coding region
Wild type          GGCGCGTTTTTTTCGAGCATGGCGCAAATGG------------------
870a               GGCGCGTTTTTTTCGAGCATGGCGCAAATGGTCA..T-DNA..
Position:          scaffold_9:735104-735162

                                        No coding region
Wild type          TATTGAGCGCAGTCGGACACGAAA-----TGAGGTAGG----TGGCCACAAGAGGTGAGAGAGGGT
523c               TATTGAGCGCAGTCGGACACGAAAAAAC..T-DNA..TGATGGCCACAAGAGGTGAGAGAGGGT
Position:          scaffold_5:151184-151240
```

Figura 32: Sequenze di tutte le giunzioni di T-DNA identificate nei mutanti inserzionali *slower patulin degraders*. I T-DNA sono in grassetto, con il bordo destro (RB) integrato solitamente con tre bp (TCA o TGA a seconda dell'orientamento) e il sinistro (LB) con più variabilità. I caratteri in grigio corrispondono a sequenze del plasmide (sottolineate le basi non corrispondenti). Nella prima riga è indicata la predetta sequenza aminoacidica, i promotori (ipotizzati), gli introni (minuscolo) o le regioni non codificanti. In diversi casi dalla *inverse* PCR è stato ottenuto solo un bordo del T-DNA inserito.

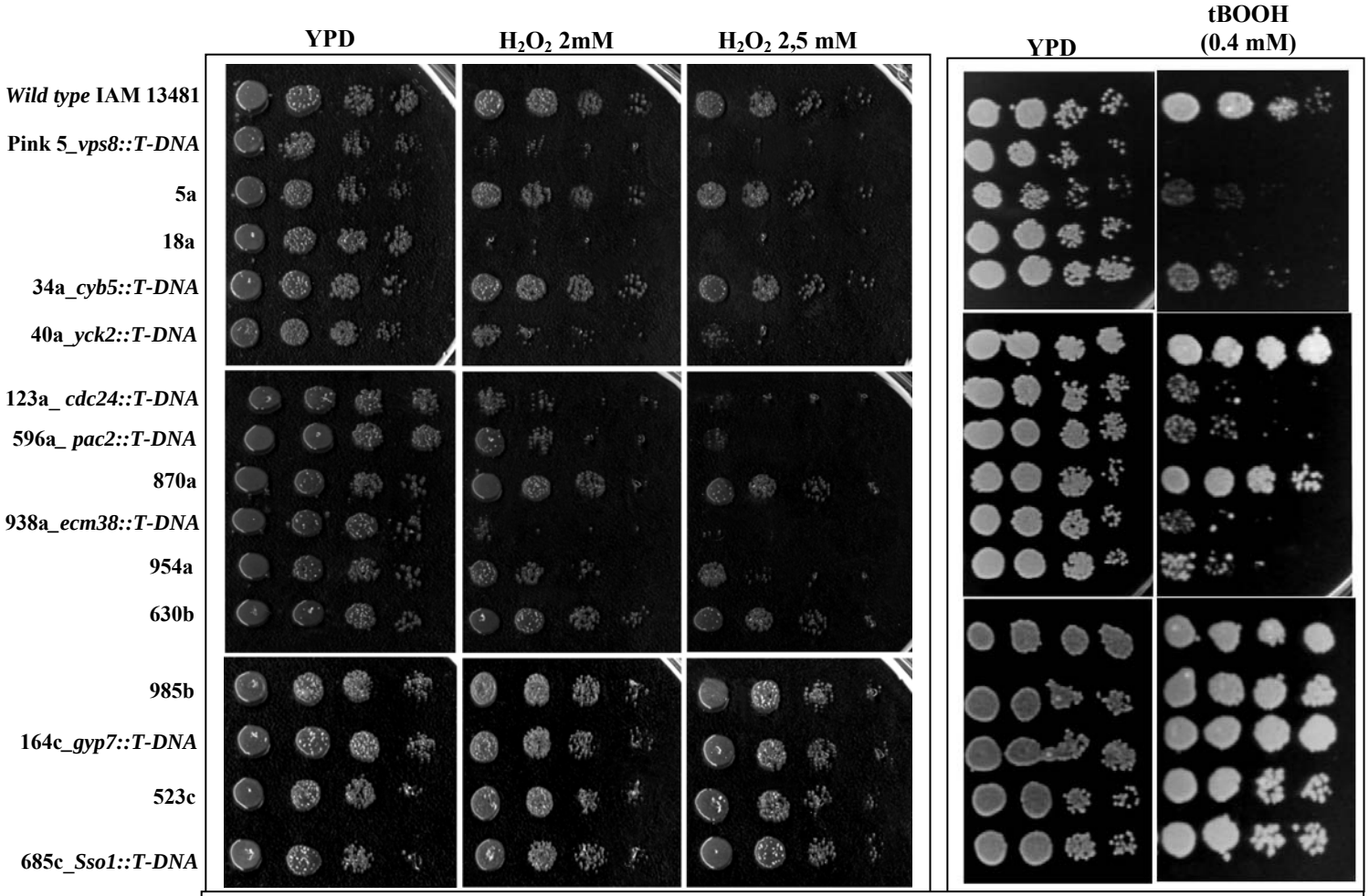


Figura 33: Resistenza allo stress ossidativo causato da perossido di idrogeno (2 e 2,5 mM) e *tert-butyl hydroperoxide* [tBOOH (0,4 mM)] da parte dei mutanti inserzionali *slower patulin degraders*. Foto fatte dopo due giorni di incubazione a 24°C.

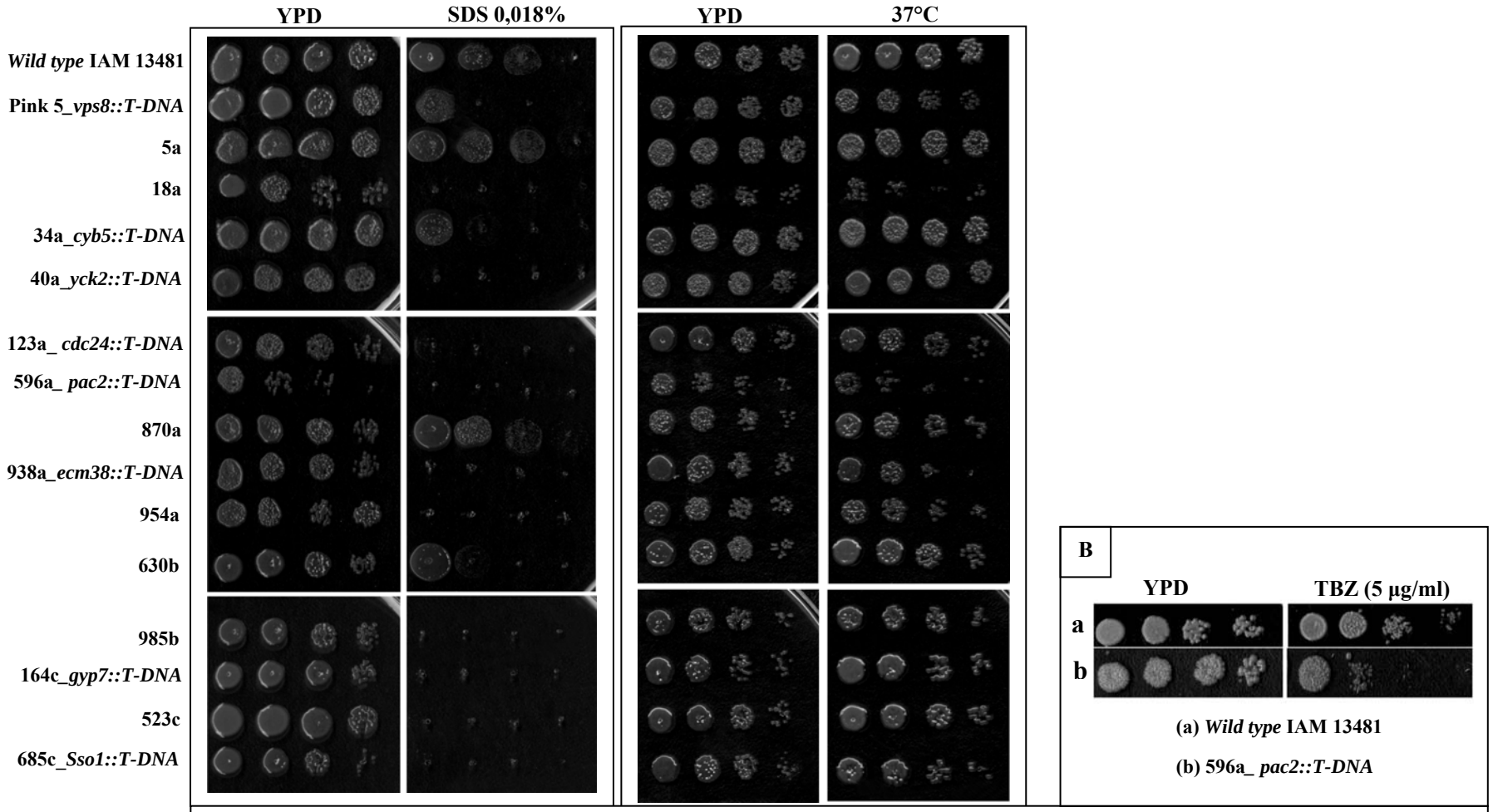


Figura 34: Risposta fenotipica dei mutanti inserzionali *slower patulin degraders* al detergente SDS (0,018% p/v) e allo stress da temperatura non permissiva (37°c per 16 h). Per i controlli su YPD e per i trattamenti con perossido di idrogeno le foto sono state fatte dopo 2 giorni di incubazione a 24°C, mentre per gli altri trattamenti (SDS e 37°C) dopo 4 giorni.
(B): Risposta fenotipica del mutante inserzionale *pac2::T-DNA* al tiabendazolo [TBZ (5 µg/ml)].

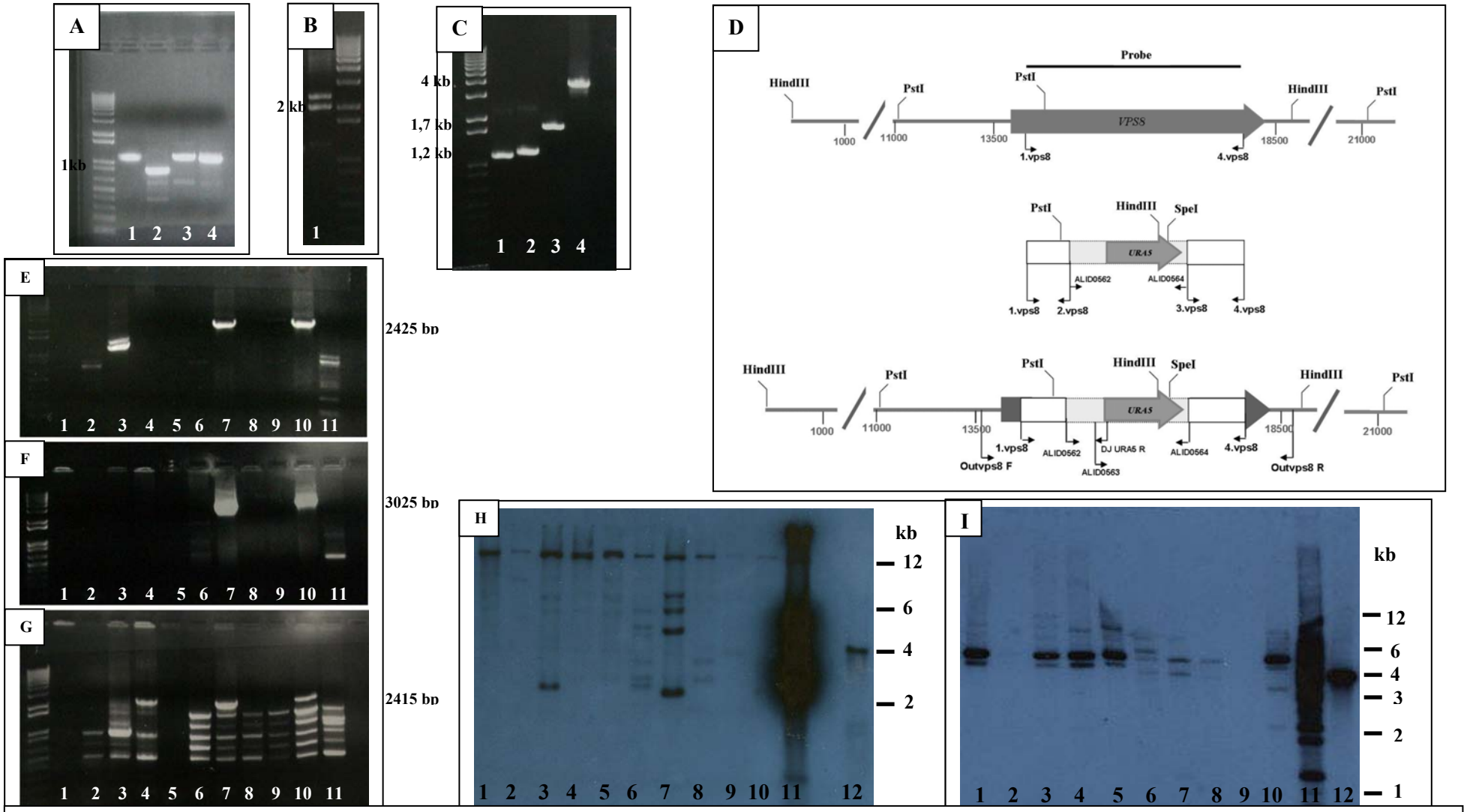


Figura 35: ***gene replacement*** **del gene** ***VPS8*** **di** ***Sporobolomyces*** **sp. IAM 13481. (A) Double Joint PCR: porzioni 5' e 3' dei geni** ***VPS8*** **(*lanes* 1 e 4) e** ***URA5*** **(*lanes* 2 e 3) utilizzate separatamente (5' e 3') come templati per generare i prodotti *Double Joint* 5' e 3' (B, *lane* 1) impiegati per la trasformazione con biolistica dell'auxotrofo AIS2. (C) Prodotti PCR corrispondenti alle regioni 3'e 5' del gene *VPS8* (*lanes* 1 e 2) e al gene *URA5* (*lane* 3) impiegati per la trasformazione di *S. cerevisiae* FY834 dal quale è stato ottenuto il prodotto di 4126 bp (*lane* 4) impiegato per la trasformazione con biolistica dell'auxotrofo AIS2. (D) Mappa del locus *VPS8* (in alto), del costrutto *vps8::URA5* per la mutagenesi mirata (al centro) e integrazione del gene *URA5* nel gene *VPS8* dopo la trasformazione (in basso); in bianco sono rappresentate le regioni fiancheggianti 5' e 3' per la ricombinazione omologa, in grigio chiaro il gene *URA5* e in grigio scuro il gene *target VPS8.* Sono riportati la posizione dei primer utilizzati per generare il costrutto e per l'analisi dei trasformanti, la posizione dei siti di restrizione degli enzimi utilizzati per le analisi Southern blot (H, I) e la sonda utilizzata. (E, F, G) Analisi PCR condotta con i primer OutVps8_R-ALID0653, OutVps8_R-ALID0562 e OutVps8_F-Double Joint URA5_R (DJ URA5_R), rispettivamente; *lane* 1: *Sporobolomyces* sp. IAM 13481; *lanes* 2-11: trasformanti selezionati. A lato è riportata la dimensione delle bande attese. (H, I) Analisi *Southern blot* (*lanes* corrispondenti a quanto riportato per le PCR) sui genomici digeriti con HindIII (H) e PstI + SpeI (I).

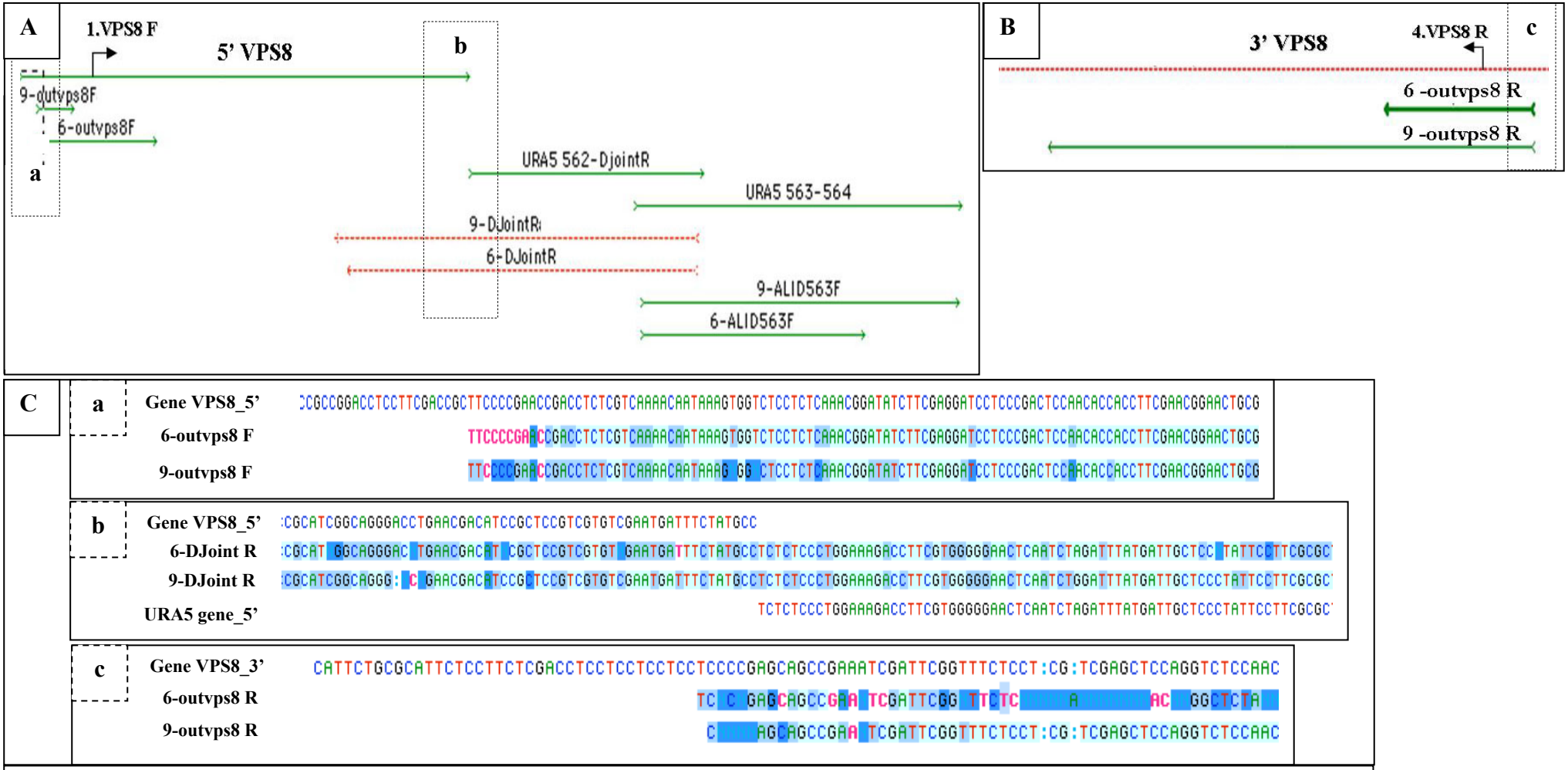
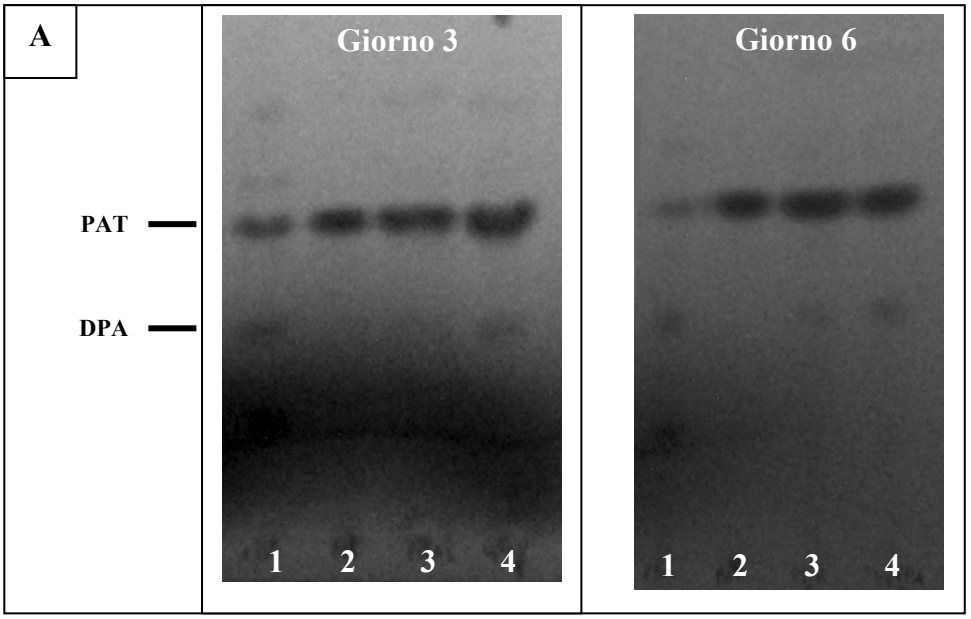


Figura 36: Rappresentazione dei risultati ottenuti dal sequenziamento dei prodotti PCR relativi ai trasformanti 6 e 9, putativi mutanti *vps8*Δ (corrispondenti ai campioni delle *lanes* 7 e 10 nelle PCR e nei Southern blot riportati nella figura 35). In A-B (in alto) è riportato graficamente l'appaiamento tra le sequenze dei geni *VPS8* (5'VPS8 e 3' VPS8) e *URA5* (URA5 562-DjointR e URA5 563 - 564) ottenute dal database http://genome.jgi-psf.org/Sporo1/Sporo1.home.html e le sequenze dei prodotti PCR ottenute con i primer OutVPS8_F (box a) e OutVPS8_R (box c) disegnati fuori dal costrutto *vps8::URA5* (sulle sequenze VPS8 5' e 3' è indicata la posizione dei primer 1.VPS8_F e 4.VPS8_R utilizzati per ottenere il costrutto per la mutagenesi mirata). In C è riportato il risultato dell'appaiamento delle regioni di A e B indicate dai box a, b, c. Per ogni sequenza è indicato il putativo mutante *vps8*Δ corrispondente (6 o 9) e il primer utilizzato per la reazione di sequenziamento.



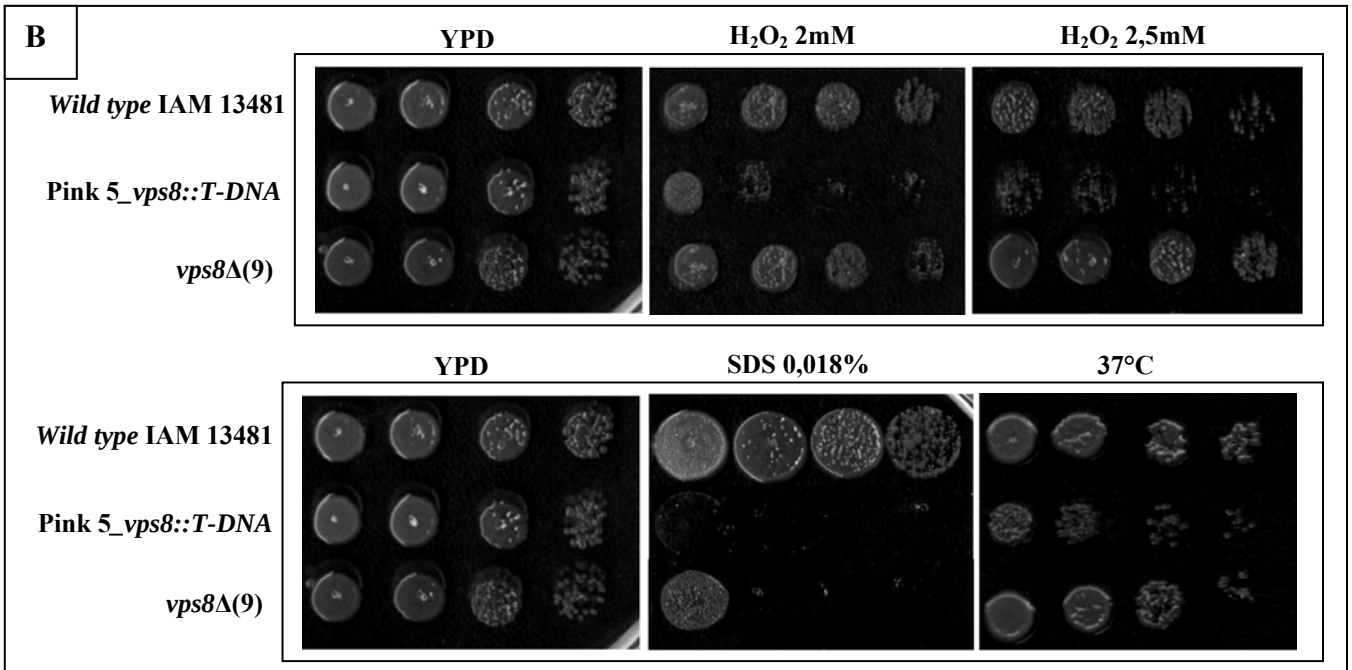


Figura 37: (A) Analsi TLC relativa a filtrati colturali ottenuti dopo 3 e 6 giorni di incubazione di 100 µg/ml di patulina disciolta in Lilly-Barnett (*lane* 2) in presenza del ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. (*lane* 1), del trasformante Pink5 (*vps8::T-DNA*) (*lane* 3) e del mutante *vps8*Δ(9) (*lane* 4).
(B) Risposta fenotipica del ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp., del trasformante Pink5 (*vps8::T-DNA*) e del mutante *vps8*Δ(9) al perossido di idrogeno (2 e 2,5 mM), al detergente SDS (0,018%) e allo stress causato da esposizione a temperatura non permissiva (37°C per 16 h). Per i controlli su YPD e per i trattamenti con perossido di idrogeno le foto sono state fatte dopo 2 giorni di incubazione a 24°C, mentre per gli altri trattamenti (SDS e 37°C) dopo 4 giorni.

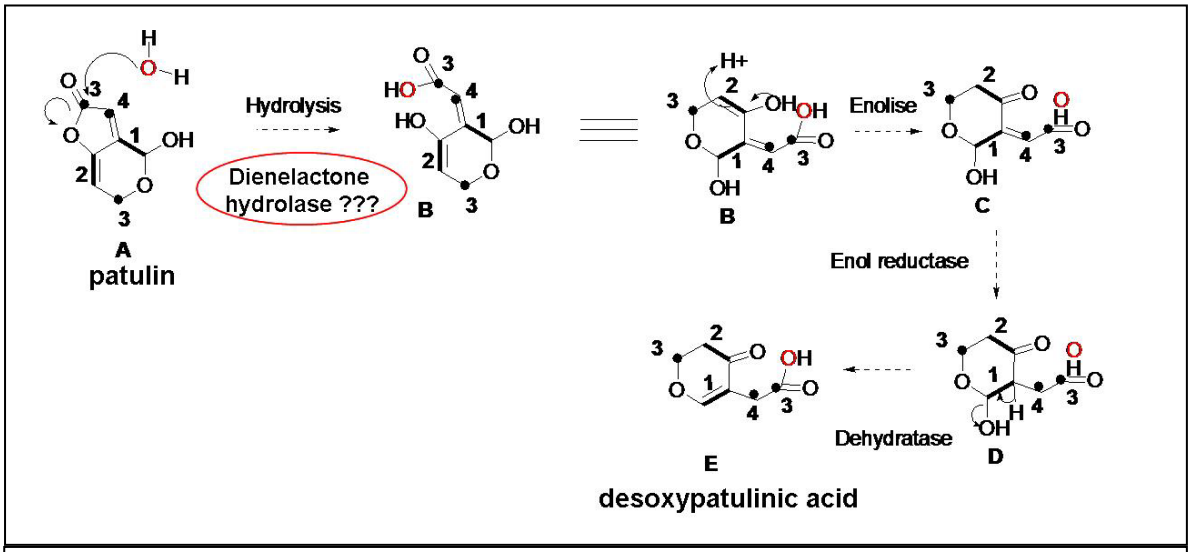


Figura 38: Pathway degradativo della patulina ipotizzato dalla prof.ssa Rebecca Goss dell'Università di East Anglia (UK) e confermato dal gruppo della prof.ssa Rosa Duran Patron dell'Università di Cadice. Sono riportati la patulina (A), il prodotto finale della degradazione acido desossypatulinico (E) e gli enzimi che intervengono nei tre step degradativi. Nel primo step si suppone intervenga un enzima dotato di attività diene lattone idrolasica.

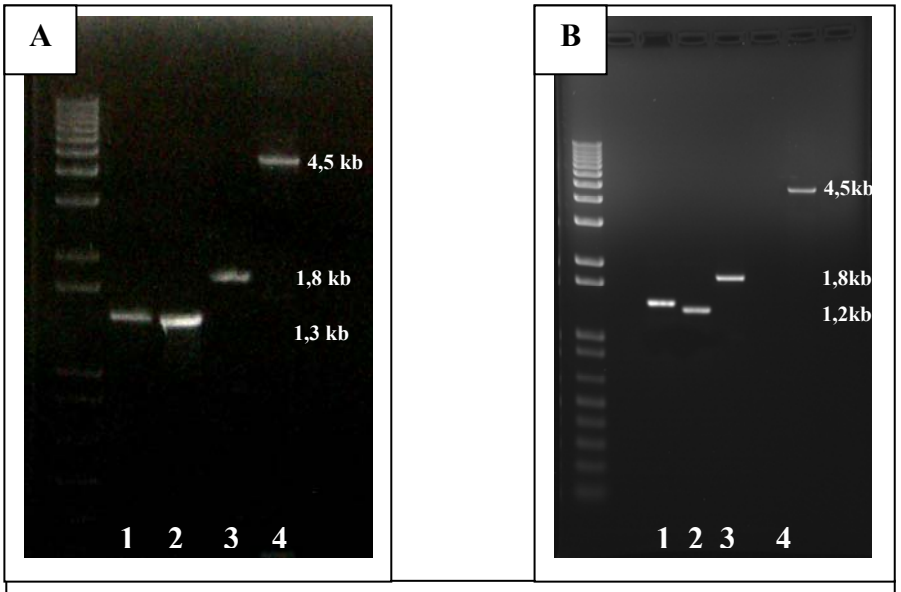


Figura 39: Generazione dei costrutti *dhl::URA5* (lane 4, A) e *rdlh::URA5* (lane 4, B) per la mutagenesi mirata dei geni *DLH* (A) e *rDLH* (B) di *Sporobolomyces* sp. IAM 13481.
Prodotti PCR corrispondenti alle regioni 3'e 5' dei due geni (*lanes* 1 e 2) e al gene *URA5* (*lanes* 3) impiegati per la trasformazione di *S. cerevisiae* FY834 dal quale sono stati ottenuti i costrutti di circa 4500 bp (*lanes* 4) impiegati per la trasformazione biolistica dell'auxotrofo AIS2. A lato è indicata in kb la dimensione delle bande del 1 kb ladder (Invitrogen).

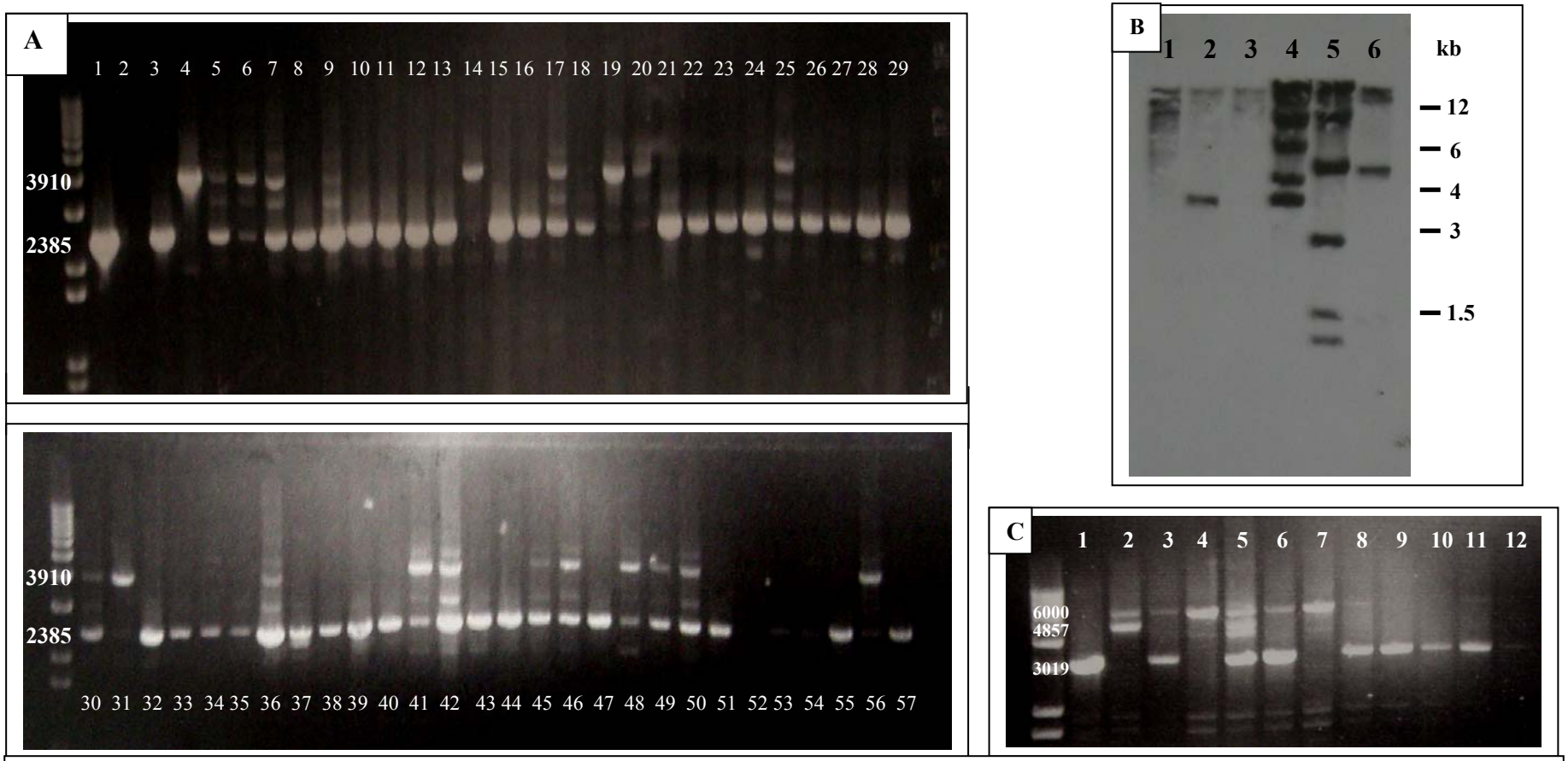


Figura 40: (A) Analisi PCR condotta sul ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. (lane 1) e su 56 trasformanti ottenuti (*lanes* 2-57) in seguito a trasformazione biolistica condotta utilizzando il costrutto *dhl::URA5*; sono riportate le dimensioni delle bande attese (in bp). (B) *Southern blot* dei DNA genomici digeriti con KpnI del ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. (*lane* 1) e di 5 putativi mutanti delezionali *dhl*Δ selezionati in seguito ad analisi PCR (*lanes* 4, 14, 19, 31 e 56 corrispondenti sul *Southern blot* alle *lanes* 2, 3, 4, 5 e 6, rispettivamente). (C) Analisi PCR condotta sul ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. (lane 1) e su 11 trasformanti (*lanes* 2-12) selezionati in seguito a trasformazione biolistica condotta utilizzando il costrutto *rdhl::URA5*; sono riportate le dimensioni delle bande attese (in bp).

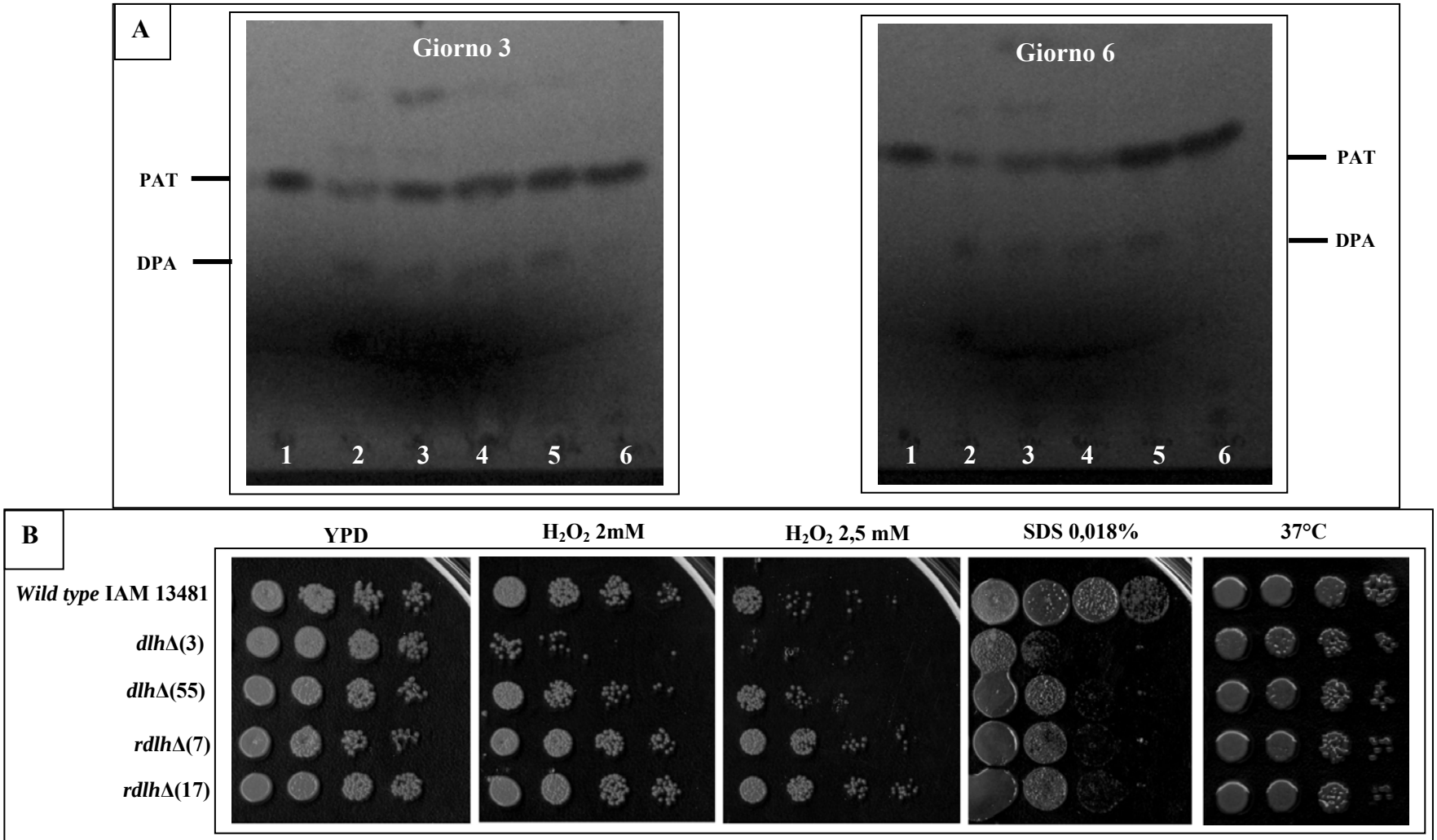


Figura 41: (A) Analsi TLC relativa a filtrati colturali ottenuti dopo 3 e 6 giorni di incubazione di 100 µg/ml di patulina disciolta in Lilly-Barnett (*lane* 1) in presenza del ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp. (*lane* 2), dei putativi mutanti *dlh*Δ(3) e *dlh*Δ(55) (*lanes* 3 e 4, rispettivamente) e dei putativi mutanti *rdlh*Δ(7) e *rdlh*Δ(17) (*lanes* 5 e 6, rispettivamente)
(b) Risposta fenotipica del ceppo IAM 13481 di *Sporobolomyces* sp., dei putativi mutanti *dlh*Δ(3) e *dlh*Δ(55) e dei putativi mutanti *rdlh*Δ(7) e *rdlh*Δ(17) al perossido di idrogeno (2 e 2,5 mM), al detergente SDS (0,018%) e allo stress da temperatura non permissiva (37°c per 16 h). Per i controlli su YPD e per i trattamenti con perossido di idrogeno le foto sono state fatte dopo 2 giorni di incubazione a 24°C, mentre per gli altri trattamenti (SDS e 37°C) dopo 4 giorni.

BIBLIOGRAFIA

Aalto M.K., Ronne H., Keränen S., 1993. Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *EMBO J.,* 12(11): 4095-104.

Abello J, Kelemu S, García C., 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of the endophytic fungus *Acremonium implicatum* associated with *Brachiaria grasses*. *Mycol Res*, 112(Pt 3): 407-13.

Adams PB and Fravel DR (1993) Dynamics of *Sporidesmium*, a naturally occuring fungal mycoparasite. In: Lumsden RD and Vaughn JL (eds.) *Pest Management: Biologically based Technologies* (pp. 189–195) American Chemical Society, Washington, DC.

Agrios G.N., 1998. *Plant Pathology 4th ed.,*. Copyright by Academic Press.

Alabouvette C., Olivain C., and Steinberg C., 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology,* 114 (3): 329-341.

Altmayer B., Eichhorn K.W. and Plapp R., 1982. Patulin content in grape juices and wine. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 175: 172-174.

Altpeter F., Baisakh N., Beachy R., Bock R., Capell T., Christou P., 2005. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding,* 15: 305–327.

Alves I., Oliveira N.G., Laires A., Rodrigues A.S., Rueff J., 2000. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. *Mutagenesis,* 15, 229–23.

Amey R. C., Athey-Pollard A., Burns C., Mills P. R., Bailey A., Foster G. D., 2002. PEG-mediated and *Agrobacterium*-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola*. *Mycol Res*, 106: 4-11.

Amiri A. and Bompeix G., 2005. Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and post-harvest environments: Consequences of decay development. *Plant Pathology,* 54: 74-81.

Andersen L., Smedsgaard J., and Frisvad J. C., 2004. *Penicillium expansum*: Consistent production of patulin, chaetoglobosins and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. *J. of Agricul. Food Chem*., 52: 2421-2428.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) Official Methods of Analysis 2000: Thin-Layer Chromatography; Liquid Chromatographic Method. *Natural Toxins*. 49: 51-53.

Arras G and Arru S., 1997. Mechanism of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. *Ann. Microb. Enzimol*., 47: 97-120.

Arras G, De Cicco V., Arru S. and Lima G., 1998. Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 73 (3): 140-150.

Arras G., 1996. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 8: 191-198.

Avantaggiato G., De Girolamo A., Fanelli C. e Ricelli A., 2002. Funghi tossigeni e micotossine: Metodi di decontaminazione delle derrate. Speciale Micotossine. Estratto da *Informatore Fitopatologico*. Anno LII- n- 12/12.

Backer K. F., 1987. Evaluating concepts of biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*, 25: 66-85.

Bako L., Umeda M., Tiburcio A. F., Schell J., Koncz C., 2003. The *VirD2* pilot protein of *Agrobacterium*-transferred DNA interacts with the TATA box-binding protein and a nuclear protein kinase in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 10108–10113

Barkai-Golan R., 2001. Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables: Development and Control. Elsevier Sciences, Amsterdam, The Netherlands.

Barnett J. A., Payne R. W., Yarrow D. 2000.– YEAST chacteristics and identification THIRD EDITION – Cambrige Uviversity Press: 598-617.

Barreira M. J., Alvito P. C., Almeida C. M. M., 2010. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food Chemistry,* 121 (3): 653-658.

Bar-Shimon M., Yehuda H., Cohen L., Weiss B., Kobeshnikov A., Daus A., Goldway M., Wisniewski M. and Droby S., 2004. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Curr. Genet*., 45: 140-148.

Battilani P., Pietri A., Piva G., 2005; "Micotossine, dal campo alla tavola" in Micotossine, Supplemento n° 1 al numero del 18/24 marzo 2005 de *"L'informatore agrario"*.

Becci P. J.; Hess F. G.; Johnson W. D.; Gallo M. A.; Babish J. G.; Dailey R. E.; Parent R. A, 1981. Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat. *J. Appl. Toxicol.,* 1: 256–261.

Benuzzi M. e Baldoni G., 2000. AQ10, nuovo biofungicida a base di *Ampelomyces quisqualis* contro l'oidio della vite. *Inf.tore fitopatol.,* 5: 33-36.

Beretta B., Gaiaschi A., Galli C. L. e Restani P., 2000. Patulin in apple-based foods: occurence and safety evaluation. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 17, No. 5: 399-406.

Berezikov E., Bargmann C. I., Plasterk R. H., 2004. Homologous gene targeting in *Caenorhabditis elegans* by biolistic transformation. *Nucleic Acids Res*., 32(4):e40.

Betina V., 1984. Biological effects of mycotoxins. In: Betina V (Ed.), *Mycotoxins production, Isolation, Separation and Purification*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 25-26.

Betts M. F., Tucker S. L., Galadima N., Meng Y., Patel G., Li L., Donofrio N., Floyd A., Nolin S., Brown D., Mandel M.A., Mitchell T.K., Xu J.R., Dean R.A., Farman M.L., Orbach M. J., 2007. Development of a high throughput transformation system for insertional mutagenesis in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol.,* 44(10): 1035-1049.

Blankenship J. R., Fanning S., Hamaker J. J., and Mitchell A. P, 2010. An Extensive Circuitry for Cell Wall Regulation in *Candida albicans. PLoS Pathog.* 6(2): e1000752.

Blasco R., Mallavarapu M., Wittich R-M., Timmis K. N., Pieper D. H., 1997. Evidence that formation of protoanemonin from metabolites of 4-chlorobiphenyl degradation negatively affects the survival of 4-chlorobiphenyl-cometabolizing microorganisms. *Appl Environ Microbiol.*, 63:427–434.

Bonnefoy N. and Fox T. D., 2007. Directed alteration of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA by biolistic transformation and homologous recombination. *Methods Mol Biol*., 372: 153-66.

Bottalico A., 2000. Prevenzione e prospettive di lotta e di controllo, cap. 9. In: *Muffe alimenti e micotossicosi*. Ivan Dragoni, Città Studi Edizioni.

Bottalico A., 2002. Funghi tossigeni e micotossine: aspetti generali. Speciale micotossine. Estratto da *Informatore Fitopatologico*. Anno LII – n. 12 Dicembre.

Bourdiol D. and L. Escoula, 1990. Effect of Patulin on microbicidal activity of mouse peritoneal macrophages. *Food Chem. Toxicol*., 28: 29-33.

Bruckmann M., Blasco R., Timmis K. N. and Pieper D. H., 1998. Detoxification of protoanemonin by dienelactone hydrolase. *J. Bacteriol*., 180 (2):400-402.

Bundock P, den Dulk-Ras A., Beijersbergen A., Hooykaas P. J. J., 1995. Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, 14: 3206-3214.

Bundock P., Hooykaas P. J. J., 1996. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* TDNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 15272-15275.

Bundock P., Mroczek K., Winkler A. A., Steensma H. Y., Hooykaas P. J. J., 1999. T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Gen Genet,* 261: 115-121.

Bundock P., van Attikum H., den Dulk-Ras A., Hooykaas P. J. J., 2002. Insertional mutagenesis in yeasts using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. *Yeast,* 19: 529-536.

Campoy S., Perez F., Martin J. F., Gutierrez S., Liras P., 2003. Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Curr Genet,* 43: 447-452.

Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., and De Cicco, V., 1997. β–1,3–glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biol. Technol.*, 12: 293–300.

Castoria R., De Curtis F., Lima G., Caputo L., Pacifico S. and De Cicco V., 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest. Biol. Technol*., 22: 7–17.

Castoria R., Caputo L., De Curtis F., and De Cicco V., 2003. Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: A possible new mechanism of action. *Phytopathology*, 93: 564–572.

Castoria R., Morena V., Caputo L., De Curtis F., Panfili G. and De Cicco V., 2005. Effect of the Biocontrol Yeast *Rhodotorula glutinis* Strain LS11 on Patulin Accumulation in Stored Apples. *Phytopathology*, 95: 1271-1278.

Castoria R., Mannina L., Maiuro L., Sobolev A., Ritieni A., Ferracane R., Spina A., 2007. Nuovi dati sul decremento di patulina causato da un lievito di biocontrollo in mele infettate da *Penicillium Expansum*. Rapporti ISTISAN (Istituto Superiore di Sanità).

Castoria R., Wright S. A. I., Droby S. , 2008. Biological control of mycotoxigenic fungi in fruits. Ch 16, In R. Barkai-Golan and N. Paster (eds), *Mycotoxins in Fruits and Vegetables.* Elsevier, San Diego.

Castoria R., Mannina L., Durán Patrón R., Wright S. A. I., Maffei F., Sobolev A. P., de Felice D. V., Pinedo-Rivilla C., Ritieni A., Ferracane R., 2011. The biocontrol yeast *Rhodosporidium kratochvilovae* strain LS11 converts the mycotoxin patulin to less toxic desoxypatulinic acid. In preparazione.

Chand-Goyal T. and Spott R.A., 1996. Control of postharvest pear diseases using natural saprofytic yeast colonists and their combination with a low dosage of thiabendazole. *Postharvest Biology and Thecnology*, 7: 51-64.

Chet I., 1987. *Trichoderma*. Application, mode of action, and potential as a biological agent of soilborne plant pathogenic fungi. 130-160. In: *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. Chet I., ed. John Wiley & Sons, NewYork.

Church G. M. and Gilbert W., 1984. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 1991–1995.

Ciegler A., Beckwith A. C., Jackson L. K., 1976. Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Appl Environ Microbiol,* 31: 664–667.

Clarke and Carbon, 1976. A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell*, 9: 91-99.

Coelho A. R., Celli M. G., Ono E. Y. S., Wosiacki G., Hoffmann F. L., Pagnocca F. C., Hirooka E. Y., 2007. *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts and patulin degradation in vitro. *Brazilian Archives of Biology and Technology,* 50: 725-733.

Colot H. V., Park G., Turner G. E., Ringelberg C., Crew C. M., Litvinkova L., Weiss R. L., Borkovich K. A., Dunlap J. C., 2006. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*., 103(27): 10352-7.

Combier J. P., Melayah D., Raffier C., Gay G., Marmeisse R., 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiol Lett,* 220: 141-148.

Cook R. J., and Baker K. F., 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. St. Paul, MN: American Phytopathological Society. 539 pages.

Covert S. F., P. Kapoor, M.-H. Lee, A. Briley, and C. J. Nairn. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycol. Res.,* 105: 259–264.

David E. Levin D. E., 2005. Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae. Microbiol Mol Biol Rev.*, 69(2): 262–291.

Davidson R. C., Blankenship J. R., Kraus P. R., de Jesus Berrios M., Hull C. M., D'Souza C., Wang P. and Heitman J., 2002. A PCR-based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology. Microbiology 148: 2607–2615.

De Curtis F., Torriani S., Rossi F. and De Cicco V., 1996. Selection and use of *Metschnikowia pulcherrima* as a biological control agent for postharvest rots of peaches and table grapes. *Ann. Microbiol. Enzimol.*, 46: 45-55.

De Curtis F., L. Caputo, R. Castoria, G. Lima, G. Stea and V. De Cicco, 2004. Use of Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism (fAFLP) for Molecular Characterization of the Biocontrol Agent *Aureobasidium pullulans* strain LS30. *Postharvest Biol. Technol*.,34: 179-186.

de Felice D. V., Solfrizzo M., De Curtis F., Visconti A. and Castoria R., 2008. Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. *Phytopathology*, doi:10.1094/PHYTO-98-12-1261

de Groot M. J., Bundock P., Hooykaas P. J. J., Beijersbergen A. G., 1998 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol,* 16: 839-842.

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

Dickens F. and Jones H.E.H.. 1961. Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances. *Brit J Cancer,* 15: 85–100.

Dragoni I., Cantoni C., Papa A. e Vallone L., 2000. Alimenti, micotossine e micotossicosi. In: *Muffe, alimenti e micotossicosi*. Ivan Dragoni, Città Studi Edizioni, cap. 10.

Droby S., Chalutz E., Wilson C.L. and Wisniewski M.E., 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii*. In: *The control of Penicillium digitatum on grapefruit*. *Canad. J. Microbiol*., 35: 794-800.

Droby S., Chalutz E., Wilson C. L., Wisniewski M. E., 1992. Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides. *Phytoparasitica,* 20: 1495–1503

Droby S. and Chalutz E., 1994. Mode of action of biocontrol agent of postharvest diseases. In: *Biological control of postharvest diseases. Theory and practice*. WilsonC.L. e Wisniewki M.E., coord.-CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A., 63-75.

Droby S., Cohen A., Weiss B., Horev B., Chalutz E., Katz H., Keren-Tzur M., Shachnai A., 1998. Commercial testing of aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biological Control*, 12: 97–100.

Droby S., 2006. Improving quality and safety of fresh fruit and vegetables after harvest by the use of biocontrol agents and natural materials. *Acta Horticulturae,* 709: 45–51.

Dudley A. M., Janse D. M., Tanay A., Shamir R., and McDonald Church G., 2005. A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast. *Mol Syst Biol.*, doi:10.1038/msb4100004. article n° 1: 2005.0001.

Eitzen G., Will E., Gallwitz D., Haas A., Wickner W., 2000. Sequential action of two GTPases to promote vacuole docking and fusion. *EMBO J.,* 19(24): 6713-6720.

El Ghaouth A., Smilanick J., Brown G. E., Ippolito A., Wisniewski M. E. and Wilson C. L., 2000. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Disease*, 84: 243–248.

El-Ghaouth A., Wilson C. L., Wisniewski M. E., 2004. Biologically based alternatives to synthetic fungicides for the postharvest diseases of fruit and vegetables. In: Naqvi, S.A.M.H. (Ed.), *Diseases of Fruit and Vegetables*, vol. 2. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 511–535.

FAO, 1997. Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium. *FAO Paper* n. 64. FAO Food and Nutrition, Roma, pp 43.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organisation of United Nations/World Health Organisation), 2002. Proposed draft code of practice for the prevention of Patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages. *In : Summary Meeting reports, Codex Committee on Food Additives and Contaminants, 34th session Rotterdam,* The Netherlands, 11-15 March.

Ferrer E., Juan-García A., Font G., Ruiz M. J., 2009. Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. *Toxicol In Vitro,* 23(8): 1504-1509.

Filonow A. B., 1998. Role of competition for sugar by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. *Biocontrol Sci. Technology*, 8: 243-256.

Fitzgerald A. M., Mudge A. M., Gleave A. P., Plummer K. M., 2003. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. *Mycol Res*., 107: 803-810.

Fliege R. and Metzler M., 2000. Electrophilic Properties of Patulin. Adduct Structures and Reaction Pathways with 4-Bromothiophenol and Other Model Nucleophiles. *Chem. Res. Toxicol*., 13: 363-372.

Florianowicz T. (2001). Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum. European Food Research and Technology,* 212: 282-286.

Friel D., Gomez Pessoa N. M., Vandenbol M., and Jijakli M. H., 2007. Separate and combined disruptions of two exo-b-1,3-glucanase genes decrease the efficiency of *Pichia anomala* (strain K) biocontrol against *Botrytis cinerea* on apple. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 20: 371–379.

Fu J., Hettler E., Wickes B. L., 2006. Split marker transformation increases homologous integration frequency in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol*., 43(3): 200-212.

Fujii M., Adachi N., Shikatani K., Ayusawa D., 2009. [FeFe]-hydrogenase-like gene is involved in the regulation of sensitivity to oxygen in yeast and nematode. *Genes Cells.,* 14(4): 457-468.

Gelvin S. B., 2003. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying". *Tool Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 67: 16–37.

Gerik K. J., M. J. Donlin, C. E. Soto, A. M. Banks, I. R. Banks, M. A. Maligi, C. P. Selitrennikoff, and J. K. Lodge., 2005. Cell wall integrity is dependent on the *PKC1* signal transduction pathway in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.,* 58: 393–408

Goidanich G., Canarini B. e Ugolini A., 1990. Danni da fitotossicità degli antiparassitari. In : *La difesa delle piante da frutto*. Edizioni agricole.

Grant C. M., 2001. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress condition. *Molecular Microbiology,* 39(3): 533-541.

Grant C.M., and Dawes I.W., 1996. Synthesis and role of glutathione in protection against oxidative stress in yeast. *Redox Report,* 2: 223-229.

Gullino M. L. and Kuijpers L. A. M., 1994. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol*., 32: 559-579.

Gullino M. L., 1994. Lotta biologica a funghi agenti di marciumi della frutta in postraccolta. *Informatore fitopatologico*, 9: 5-13.

Harwing J., Scott P.M., Kennedy B.P.C. e Chen Y.K., 1973. Disappearance of Patulin from apple juice fermented by *Saccharomyces* spp. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 6: 45.

Havel, J., and W. Reineke. 1992. Degradation of Aroclor 1221 and survival of strains in soil microcosms. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 38:129–134.

Hazell B. W., Te'o V. S. J., Bradner J. R., Bergquist P. L., Nevalainen K. M. H., 2000. Rapid transformation of high cellulase-producing mutant strains of *Trichoderma reesei* by microprojectile bombardment. *Letters Applied Microbiology,* 30: 282–286.

Hoffman C. S., 2007. Preparation of yeast DNA, RNA and proteins. *Current Protocols in Molecular Biology*, 13.11.1-13.11.4

Hooykaas P. J., 2005. Transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *In* JS Tkacz, L Lange, eds, Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine. Kluwer Acad./Plenum Publ., New York, pp 41-6.

Horazdovsky B. F., Cowles C. R., Mustol P., Holmes M., Emr S. D., 1996. A novel RING finger protein, Vps8p, functionally interacts with the small GTPase, Vps21p, to facilitate soluble vacuolar protein localization. *J Biol Chem.,* 271(52):33607-15.

Horváth E., Papp G., Belágyi J., Gazdag Z., Vágvölgyi C and Pesti M., 2010. In vivo direct patulin-induced fluidization of the plasma membrane of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe. Food and chemical toxicology*, 48(7): 1898-904.

Hoyt M.A., Macke J.P., Roberts B.T., Geiser J.R., 1997. *Saccharomyces cerevisiae PAC2* functions with *CIN1*, 2 and 4 in a pathway leading to normal microtubule stability. *Genetics*,146(3): 849-57.

Hull C. M and Heitman J., 2002. Genetics Of *Cryptococcus Neoformans. Annu. Rev. Genet.,* 36: 557–615.

Hussein H.S. and Brasel J.M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on human and animals. *Toxicology*, 167: 101-134.

Ianiri G, Wright S. A. I., Castoria R., Idnurm A, 2011. Development of resources for the analysis of gene function in the Puccinomycotina pink yeasts. Inviato per la pubblicazione su *Fungal Genetics and Biology*.

IARC 1986. Patulin. In *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man*. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France, 40: 83-98.

IARC, 1993. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human*. Vol. 56. Some naturally occurring substances food items and costituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer. Lione, pp 397-444, 445-466, 467-488.

Idnurm A., Reedy J. L., Nussbaum J. C. and Heitman J., 2004. *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. *Eukaryotic cell,* 3: 420-429.

Idnurm A., Giles S. S., Perfect J. R., and Heitman J., 2007. Peroxisome function regulates growth on glucose in the basidiomycete fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell,* 6(1): 60-72.

Idnurm A., Walton F. J., Floyd A., Reedy J. L., and Heitman J., 2009. Identification of ENA1 as a Virulence Gene of the Human Pathogenic Fungus *Cryptococcus*

neoformans through Signature-Tagged Insertional Mutagenesis. *Eukaryotic cell*, 8(3): 315-326.

Idnurm A. and Williamson P. R., 2010. Genetic and genomic approaches to *Cryptococcus* environmental and host response. *Ch 10, in J Heitman et al (eds), "Cryptococcus: from human pathogen to model yeast".* ASM press, Washington, DC.

Ikai K., Takesako K., Shiomi K., Moriguchi M., Umeda Y., Yamamoto J., Kato I. and Naganawa H., 1991. Structure of aureobasidin A. *The Journal of Antibiotic*, 44 (9): 925-933.

Ippolito A. and Nigro F., 2000. Impact of postharvest application of biological control agent on postharvest dideases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection*, 19: 715.

Ippolito A., El-Ghaouth A., Wilson C. L., Wisniewski M. A., 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*, 19, 265–272.

Iwahashi Y., Hosoda H., Park J., Lee J., Suzuki Y., Kitagawa E., Murata S., Jwa N., Gu M. and Iwahashi H., 2006. Mechanisms of patulin toxicity under conditions that inhibit yeast growth. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 1936-42.

Janisiewicz W. J. and Korsten L., 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40: 411–41.

Janisiewicz W. J. and Marchi A., 1992. Control of storage rots on various pear cultivars with saprophytic strain of Pseudomonas syringae. *Plant Disease,* 76, 555-560.

Janisiewicz W. J., 1988. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. *Phytopathology*, 78: 194-198.

Janisiewicz W. J., Tworkoski T. J., Sharer C., 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruit with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology,* 90 (11): 1196–1200.

Jäntti J., Aalto M.K., Oyen M., Sundqvist L., Keränen S., Ronne H., 2002. Characterization of temperature-sensitive mutations in the yeast syntaxin 1 homologues Sso1p and Sso2p, and evidence of a distinct function for Sso1p in sporulation. *J Cell Sci.,* 115(Pt 2): 409-20.

Ji L, Jiang Z. D., Liu Y, Koh C. M., Zhang L. H., 2010. A simplified and efficient method for transformation and gene tagging of *Ustilago maydis* using frozen cells. *Fungal Genet Biol.,* 47(4): 279-87.

Jijakli M. H., Grevesse C., Lepoivre P., 2001. Modes of action of biocontrol agents of postharvest diseases: challenges and difficulties. *Bulletin-OILB/SROP* 24(3): 317–318.

Jijakli M.H. and Lepoivre P, 1998. Chatracterization of an exo-β-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology*, 88: 335-343.

Jones E. E., Clarkson J. P., Mead A. and Whipps J. M., 2004. Effect of inoculum type and timing of application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*: influence on apothecial production. *Plant Pathology,* 53: 621–628

Kang C. M., Jiang Y. W., 2005. Genome-wide survey of non-essential genes required for slowed DNA synthesis-induced filamentous growth in yeast. *Yeast*, 22(2): 79-90.

Karabulut O. A., Smilanick J. L., Gabler F. M., Mansour M., Droby S., 2003. Near-harvest applications of *Metschnikowia fructicola*, ethanol, and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in central California. *Plant Dis.,* 87: 1384–1389.

Karabulut O. A., Tezcan H., Daus A., Cohen L., Wiess B., and Droby S., 2004. Biological control of preharvest and postharvest rots in strawberries by *Metschnikowia fructicola*. *Biocontrol Sci. Technol*., 14: 513–21.

Karlovsky P., 1999. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins, Volume 7, Issue1,* Pages 1-23.

Keblys M., Bernhoft A., Höfer C.C., Ellen Morrison E., Larsen H. J. S e Flåøyen A. The effects of the *Penicillium* mycotoxins citrinin, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, penicillic acid, and roquefortine C on *in vitro* proliferation of porcine lymphocytes. *Mycopathologia,* 158: 317–324, 2004.

Kim M. S., Kim S. Y., Yoon J. K., Lee Y. W., Bahn Y.S., 2009. An efficient gene-disruption method in *Cryptococcus neoformans* by double-joint PCR with NAT-split markers. Biochem Biophys Res Commun. 18;390(3): 983-8.

Kiso T., Fujita K., Ping X., Tanaka T. and Taniguchi M., 2004. Screening for microtubule-disrupting antifungal agents by using a mitotic-arrest mutant of *Aspergillus nidulans* and novel action of phenylalanine derivatives accompanying tubulin loss. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1739–1748.

Korsten L., 2006. Advances in control of postharvest diseases in tropical fresh produce. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation.* 1 (1), 48–61.

Kumar C., Sharma R., Bachhawat A. K., 2003. Investigations into the polymorphisms at the ECM38 locus of two widely used *Saccharomyces cerevisiae* S288C strains, YPH499 and BY4742.Yeast. 2003 Jul 30;20(10): 857-63.

Kunik T., Tzfira T., Kapulnik Y., Gafni Y., Dingwall C., and Citovsky V.. 2001. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 98: 1871–1876.

Kuo M.H. and Grayhack E., 1994. A library of yeast genomic *MCM1* binding sites contains genes involved in cell cycle control, cell wall and membrane structure, and metabolism. *Mol Cell Biol.* 14(1): 348–359.

Kurtzman C.P. and Droby S., 2001. *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast effective for biocontrol of postharvest fruit rots. *System. Appl. Microbiol*., 24: 395–9.

Lamb D. C., Kelly D. E., Manning N. J., Kaderbhai M. A., Kelly S. L., 1999. Biodiversity of the P450 catalytic cycle: yeast cytochrome b5/NADH cytochrome b5 reductase complex efficiently drives the entire sterol 14-demethylation (CYP51) reaction. *FEBS Lett.,* 462(3): 283-288.

Larsen T. O., Frisvad J. C., Ravn G. and Skaaning T., 1998. Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on blackcurrant and cherry juice. *Food Additives and Contaminants*, Vol.15, No. 6: 671-675.

Leclerque A., Wan H., Abschutz A., Chen S., Mitina G. V., Zimmermann G., Schairer H. U., 2004. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Curr Genet,* 45: 111-119.

Léger-Silvestre I, Caffrey J. M., Dawaliby R., Alvarez-Arias D. A., Gas N., Bertolone S. J., Gleizes P. E., Ellis S. R.., 2005. Specific Role for Yeast Homologs of the Diamond Blackfan Anemia-associated Rps19 Protein in Ribosome Synthesis. *J Biol Chem.*, 280(46): 38177-85.

Li H. Y., Pan C. Y., Chen H., Zhao C. J., Lu G. D., Wang Z. H., 2003. Optimization of TDNA insertional mutagenesis and analysis of mutants of *Magnaporthe grisea*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao,* 19: 419-423

Lieu F. Y. and Bullerman L. B., 1977. Production and stability of aflatoxins, penicillic acid and patulin in several substrates. *J. Food Sci*., 42: 1222-1224.

Lilly V. G. and Barnett H. L. 1951. Physiology of the Fungi. McGraw-Hill, New York.

Lima G., Ippolito A., Nigro F. e Salerno M., 1997a. Lotta biologica contro la muffa grigia dell'uva da tavola in conservazione mediante trattamenti pre-raccolta con *Aureobasidium pullulans* e *Candida oleophila*. *Difesa Piante*, 20 (1-2): 21-28.

Lima G., Ippolito A., Nigro F. e Salerno M., 1997b. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Technology*, 10:169-178.

Lima G., De Curtis F., Castoria R. and De Cicco V., 1998. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. *Biocontrol Science and Technologies,* 8: 257-267.

Lima G., Arru S., De Curtis F., Arras G., 1999. Influence of antagonist, host fruit, and pathogen on the control of postharvest fungal diseases by yeasts. *J. Ind. Microbiol. Biotech*., 23: 223–229.

Lima G., De Curtis F., Castoria R., and De Cicco V., 2003. Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol yeasts in semi-commercial conditions. *Eur. J. Plant. Pathol.,* 109: 341–349.

Liu B. H., Wu T. S., Yu F. Y., Su C. C., 2007. Induction of oxidative stress response by the mycotoxin patulin in mammalian cells. *Toxicol. Sci*., 95: 340–347.

Liu B. H., F. Y. Yu, T. S. Wu, S. Y. Li, M. C. Su, M. C. Wang, e S. M. Shih, 2003. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicol Appl Pharm*., 191: 255-63.

Logrieco A., Solfrizzo M. e Castoria R., 2002. Funghi tossigeni e micotossine: filiera orto-frutticola. Speciale micotossine. Estratto da *Informatore Fitopatologico*. Anno LII- n-12/12.

Lopez-Diaz T. M. and Flannigan B., 1997. Production of Patulin and cytochalasin E by 4 strains of *A. clavatus* during malting of barley and wheat. *International Journalof Food Microbiology*, 35: 129-136.

Lopez-Garcia B., Gonzales-Candelas L., Perez-Paya E., and Marcos J. F., 2000. Identification and characterization of a hexapeptide with activity against phytopathogenic fungi that cause postharvest decay in fruits. *Mol. Plant Microbe. In*. 13: 837-846.

Lorito M., 1998. Chitinolytic enzymes and their genes. In: *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume 2, Enzymes, biological control and commercial applications, G.E. Harman and C.P. Kubicek eds., Taylor & Francis Ltd., London

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

Lorito M., G. E. Harman, C. K. Hayes, R. M. Broadway, A. Tronsmo, S. L. Woo and A. Di Pietro., 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum:* antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. Phytopathology, 83: 302-307.

Lorito M., S. L. Woo, I. Garcia Fernandez, G. Colucci, G. E. Harman, J. A. Pintor-Toro, E. Filippone, S. Muccifora, C. B. Lawrence, A. Zoina, S. Tuzun and F. Scala., 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 95 (14): 7860-7865.

MacDonald S., Long M., and Gilbert J., 2000. Liquid Chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: *Collaborative study. J. AOAC* Int. 83: 1387-1394.

Maeng S., Ko Y., Kim G., Jung K., Floyd A., Heitman J., and Bahn Y., 2010. Comparative Transcriptome Analysis Reveals Novel Roles of the Ras and Cyclic AMP Signaling Pathways in Environmental Stress Response and Antifungal Drug Sensitivity in *Cryptococcus neoformans. Eukaryot Cell.*, 9(3): 360–378.

Manners J. G., 1993. Invasion of the host plant and damage to host tissues. *In: Principles of plant pathology.* Second Edition. Cambridge University Press.

Mares D., 1987. Antimicrobial activity of protoanemonin, a lactone from ranunculaceous plants. *Mycopathologia*, 98 (3): 133-140.

Mari M., Neri F., Bertolini P., 2007. Novel Approaches to Prevent and Control Postharvest Diseases of Fruit. *Stewart Postharvest Review*, 3(6): Article 4. Stewart Postharvest Solutions Ltd., London, UK.

Martinez M., Pramanik A., Moto-Ndje S., Moore C.W., 2003. Overexpression of genes involved in vesicular trafficking to the vacuole defends against lethal effects of oxidative damage. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 49(7): 1025-35.

Martins M. L., Gimeno A., Martins H. M., and Bernardo F., 2002. Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Food Additives and Contaminants,* 19: 568-274.

Material Safety Data Sheet, 2004. MP Biomedicals Germany GmbH. www.mpbio.com.

Matta A., Luisoni E. e Surico G., 1996. *Fondamenti di Patologia Vegetale*. Patron Editore, Bologna, pp 94-107, 328-333.

McClelland C. M., Chang Y. C., Kwon-Chung K. J., 2005. High frequency transformation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Fungal Genet Biol.*, 42: 904-913

McKinley E. R. and Carlton W. W., 1991. Patulin. In. *Mycotoxins and phytoalexins* (Sharma, R.P., and Salunkhe, D.K., Eds.) pp. 191-236, CRC Press, Boca Raton, FL.

Medical Research Council, 1944. Clinical trial of patulin in the common cold: report of the Patulin Clinical Trials Committee, *Lancet* 2: 373-375.

Meng Y., G. Patel, M. Heist, M. F. Betts, S. L. Tucker, N. Donofrio, T. Mitchell, D. Brown, L. Li, J.-R. Xu, M. Thon, M. J. Orbach, R. A. Dean, and M. L. Farman, 2007. A systematic analysis of T-DNA insertion events in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 44: 1050-1064.

Messenguy F., Dubois E., 2003. Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene*. 316:1-21.

Meyer V., 2008. Genetic engineering of filamentous fungi - Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances,* 26: 177–185.

Meyer V., Mueller D., Strowig T., Stahl U., 2003. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. *Curr Genet*., 43: 371-377

Michielse C. B., Arentshorst M., Ram A. F. J., van den Hondel C. A., 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. *Fungal Genet Biol*, 42: 9–19.

Michielse C. B., Hooykaas P. J. J., van den Hondel C. A. , and Ram A. F. J., 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr. Genet.* 48: 1-17.

Michielse C. B., Ram A. F., Hooykaas P. J., Hondel C. A., 2004a. Role of bacterial virulence proteins in *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus awamori*. *Fungal Genet Biol,* 41: 571-578.

Miraglia M., e Brera C., 2000. Le micotossine negli alimenti; informazioni disponibili ed impatto sulla salute umana. In: *Proceedings of the 6th International Feed Production Conference*, Facoltà di Agraria U.C.S.C., Piacenza, pp. 27-28.

Moake M. M.; Padilla-Zakour O. I.; Worobo R. W, 2005. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, *1*, 8–21.

Mogensen E. G., Challen M. P., Strange R. N., 2006. Reduction in solanapyrone phytotoxin production by *Ascochyta rabiei* transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiol Lett*, 255: 255-61.

Mondon P., Chang Y. C., Varma A., Kwon-Chung K. J., 2000. A novel episomal shuttle vector for transformation of *Cryptococcus neoformans* with the *ccdB* gene as a positive selection marker in bacteria. *FEMS Microbiology Letters,* 187: 41-45.

Morales H., Marín S., Ramos A. J., Sanchis V., 2010. Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in Penicillium expansum growth and patulin accumulation: A review. *Food Control*, 21: 953-962.

Morales H., Sanchis V., Usall J., Ramos A. J. and Marín S., 2008a. Effect of biocontrol agents *Candida sake* and *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *Internatational Journal of Food Microbiology*,122: 61-67.

Mortimer D. N., Parker I., Shephard M. J. and Gilbert J., 1985. A limited survey of retail apple and grape juices for the mycotoxin patulin. *Food Additives and Contaminants,* 2: 165-170.

Moss M. O. and Long M. T:, 2002. Fate of patulin in the presence of yeast *Saccharomices cerevisiae*. *Food Additives and Contaminants*, 2002, Vol. 19, No. 4, 387-399.

Murillo-Arbizu M., Gonzalez-Penas E., Amezqueta S., 2010. Comparison between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for the study of the occurrence of patulin in apple juice intended for infants. *Food and Chemical Toxicology,* 48 (8-9): 2429-2434.

Naceur Haouet M. e Altissimi S. M., 2003. *Micotossine negli alimenti e micotossicosi animale e umana* (1ª parte). Webzine Sanità Pubblica Veterinaria, n. 18, febbraio, http://www.pg.izs.it/indice-spv.html#147

Nikawa J., Hosaka K., Tsukagoshi Y., Yamashita S., 1990. Primary structure of the yeast choline transport gene and regulation of its expression. J Biol Chem. 265(26): 15996-16003.

Nikawa J., Tsukagoshi Y., Yamashita S., 1986. Cloning of a gene encoding choline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.,* 166(1): 328-30.

Notario V., 1982. β-glucanase from *Candida albicans*: purification, characterization and the nature of their attachment to cell wall component. *J. Gen. Microbiol*., 128, 747.

Orlowski M., and A. Meister, 1970 The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 67: 1248–1255.

Osswald H.; Frank H. K.; Komitowski D.; Winter H., 1978. Long-term testing of patulin administered orally to Sprague-Dawley rats and Swiss mice. *Food Cosmet.,* 16: 243–247.

Parsons A. B., Brost R. L., Ding H., Li Z., Zhang C., Sheikh B., Brown G.W., Kane P.M., Hughes T. R., Boone C., 2004. Integration of chemical-genetic and genetic

interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat Biotechnol.*, 22(1): 62-69.

Pasini W., 2006; "*Sicurezza alimentare: si alla sorveglianza*" in Fusariosi e micotossine, qualità e sicurezza dei cereali, Supplemento n° 1 al numero del 17/23 marzo 2006 de "*L'informatore agrario*".

Paster N., Huppert D., and Barkai-Golan R., 1995. Production of patulin by different strains of *Penicillium expansum* in pear and apple cultivars stored at different temperatures and modified atmospheres. *Food Addit. Contam.*, 12: 51–58.

Paterson R. R. M. and Kozakiewicz Z., 1997. *Penicillium* and *Aspergillus* mycotoxins – diagnostic and quantitative data from commoditives and cultures. In: A. Mesterhazy (ed.), *Proc. Fifth Eur. Fusarium Sem.*, Szeged, Hungary, Vol. 25, pp. 271-275. Cereal Research Institute, Szeged.

Paulitz and Bélanger, 2001. Biological control in greenhouse system. *Annual Review of Phytopathology,* Vol. 39: 103-133.

Pfeiffer E., Gross K., Metzler M., 1998. Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. *Carcinogenesis,* 19: 1313–1318.

Piemontese L., Solfrizzo M. and Visconti A., 2005. Occurrence of patulin in conventional and organic fruit products in Italy and subsequent exposure assessment. *Food Additives and Contaminants,* 22: 437-442.

Pitkin J. W., Panaccione D. G., Walton J. D., 1996. A putative cyclic peptide efflux pump encoded by the *TOXA* gene of the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *Microbiology,* 142: 1557-1565.

Prieta J., Moreno M. A., Diaz S., Suarez G. e Dominguez L., 1994. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by diphasic dialysis membrane procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemisty*, 42: 1701-1703.

Puel O., Galtier P. and Oswald I. P., 2010. Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins* 2: 613-631; doi:10.3390/toxins2040613.

Reese A. J. and Doering T. L., 2003. Cell wall α-1,3-glucan is required to anchor the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol. Microbiol.*, 50: 1401-1409.

Ricelli A., Baruzzi F., Solfrizzo M., Morea M., Fanizzi F. P., 2007. Biotransformation of patulin by *Gluconobacter oxydans*. *Applied and Environmental Microbiology,* Vol. 73, N°. 3p., 785–792.

Roberti R. e Selmi C., 1999. *Bacillus subtilis* nella lotta contro i patogeni delle piante. *Informatore fitopatologico,* 7-8: 15-21.

Rodriguez-Tovar A. V., Ruiz-Medrano R., Herrera-Martinez A., Barrera-Figueroa B. E., Hidalgo-Lara M. E., Reyes-Marquez B. E., Cabrera-Ponce J. L., Valdes M., Xoconostle-Cazares B., 2005. Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *J Microbiol Methods*, 63: 45-54

Rogers C. W., Challen M. P., Green J. R., Whipps J. M., 2004. Use of REMI and *Agrobacterium*-mediated transformation to identify pathogenicity mutants of the biocontrol fungus, *Coniothyrium minitans*. *FEMS Microbiol Lett*, 241: 207-214.

Rogers K. M., C. A. Pierson, N. T. Culbertson, C. Mo, A. M. Sturm, J. Eckstein, R. Barbuch, N. D. Lees, and M. Bard, 2004. Disruption of the *Candida albicans CYB5* Gene Results in Increased Azole Sensitivity. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(9): 3425–3435.

Rolland S., Jobic C., Fevre M., Bruel C., 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. *Curr Genet*, 44: 164–171.

Ruiz-Diez B, 2002. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *J Appl Microbiol,* 92: 189-195.

Sambrook J, Fritsch E. F. and Maniatis T. 1989. Molecular cloning; a laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Sampaio J. P., Gadanho M., Santos M., Duarte F. L., Pais C., Fonseca A., Fell J. W., 2001. Plyphasic taxonomy of basidiomycetous yaest genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamophic species. *International journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology,* 51: 687-697.

Sanglard D., Coste A. and Ferrari S., 2009. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res.,* 9: 1029-1050.

Schumacher D. M., Muller C., Metzler M., Lehmann L., 2006. DNA–DNA cross-links contribute to the mutagenic potential of the mycotoxin patulin. *Toxicology Letters,* 166: 268–275.

Schumacher D. M.; Metzler M.; Lehmann L, 2005a. Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. *Arch. Toxicol.* 2005, 79: 110–121.

Schumacher D. M.; Wagner J.; Metzler M.; Lehmann L, 2005b. Influence of decreased intracellular glutathione level on the mutagenicity of patulin in cultured mouse lymphoma cells. *Mycotoxin Res*. 21: 150–152.

Scott P. M., Kennedy B. e Van Walbeek W.,1972. Desoxypatulinic acid from a patulin-producing strain of *Penicillium patulum*. *Experientia,* 28: 1252.

Selmanoglu G., 2006. Evaluation of the reproductive toxicity of patulin in growing male rats. *Food Chem. Toxicol*. 44: 2019–2024.

Selmanoglu G.; Kockaya E. A, 2004. Investigation of the effects of patulin on thyroid and testis, and hormone levels in growing male rats. *Food Chem. Toxicol*. 42: 721–727.

Shapira M., Segal E., Botstein D., 2004. Disruption of yeast forkhead-associated cell cycle transcription by oxidative stress. *Mol Biol Cell.* 15(12): 5659-69.

Sharma R. R., Singh D., Singh R*.,* 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonist: A review. *Biological control*, 50: 205-221.

Shephard G. S., Leggott N. L., 2000. Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. *J Chromatogr A,* 882: 17-22

Singh D., Sharma R. R., 2007. Postharvest diseases of fruit and vegetables and their management. In: Prasad, D. (Ed.), Sustainable Pest Management. Daya Publishing House, New Delhi, India.

Sionov E., Lee H., Chang Y. C., and Kwon-Chung K. J., 2010. *Cryptococcus neoformans* Overcomes Stress of Azole Drugs by Formation of Disomy in Specific Multiple Chromosomes. *PLoS Pathog.*, 6(4): e1000848.

Smith J. E:, Lewis C. W. e Anderson J. G.,1994. *Mycotoxins in human nutrition and health.* European Comm, Directorate.-General XII; Science, Research and Development, EUR 16048 EN.

Sugui J. A., Chang Y. C., Kwon-Chung K. J., 2005. *Agrobacterium tumefaciens*mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. *Appl Environ Microbiol*, 71: 1798-1802.

Suzuki T., Takeda M., and Tanabe H., 1971. A new mycotoxin produced by *Aspergillus clavatus*. *Chem. Pharm. Bull.*, 19: 1786-1788.

Tedrick K., Trischuk T., Lehner R., Eitzen G., 2004. Enhanced membrane fusion in sterol-enriched vacuoles bypasses the Vrp1p requirement. *Mol Biol Cell.*, 5(10): 4609-4621.

Thorpe G. W., Fong C. S., Alic N., Higgins V. J., and Dawes I. W., 2004. Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: Oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(17): 6564–6569.

Tian G., Lewis S. A., Feierbach B., Stearns T., Rommelaere H., Ampe C., Cowan N. J., 1997. Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors. *J Cell Biol.* 138(4): 821-832.

Toda T., Cameron S., Sass P., Zoller M., Wigler M., 1987. Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell*, 50(2): 277-287.

Toffaletti D. L., Rude T. H., Johnston S. A., Durack D. T., Perfect J. R., 1993. Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J. Bacteriol.* 175: 1405-1411.

Truan G., Epinat J. C., Rougeulle C., Cullin C., Pompon D., 1994. Cloning and characterization of a yeast cytochrome b5-encoding gene which suppresses ketoconazole hypersensitivity in a NADPH-P-450 reductase-deficient strain. *Gene,* 142(1): 123-127.

Tully M., Gilbert H. J., 1985. Transformation of *Rhodosporidium toruloides*. *Gene*. 36: 235- 240.

Umeda M., Tsutsui T., Saito M., 1977. Mutagenicity and inducibility of DNA single-strand breaks and chromosome aberrations by various mycotoxins. *Gann,* 68, 619–625.

Valerio, E., Gadanho, M., Sampaio, J. P., 2008. Reappraisal of the *Sporobolomyces roseus* species complex and description of *Sporidiobolus metaroseus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 736-741.

Varga J., Peteri Z., Tabori K., Teren K., Vagvolgyi C., 2005. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus isolates*. *International Journal of Food Microbiology,* 99: 321– 328.

Vijn I and Govers F, 2003. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Pathol,* 4:459–467.

Visconti A., 1997. Problematiche connesse con la presenza di micotossine in alimenti e mangimi. In: *Tecnica Molitoria*, ottobre 1997, 1113-1122.

Vollmer P., Will E., Scheglmann D., Strom M., Gallwitz D., 1999. Primary structure and biochemical characterization of yeast GTPase-activating proteins with substrate preference for the transport GTPase Ypt7p. *Eur J Biochem.*, 260(1): 284-290.

Walton F. J, Idnurm A. and Heitman J., 2005. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.,* 57: 1381-1396.

Webb C. A., Szabo L. J., Bakkeren G., Garry C., Staples R. C., Eversmeyer M., Fellers J., 2006. Transient expression and insertional mutagenesis of *Puccinia triticina* using biolistics. *Funct. Integr. Genomics,* 6: 250-260.

WHO, 2002. *Evaluation of certain mycotoxins in food*. Fifty-sixth report of the Join FAO/WHO expert committee on fold additives. WHO Technical Report Series 906 World Health Organization, Ginevra, pp 62.

Wilson C. L. and Wisniewski M. E., 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emergine technology. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 425-441.

Wilson C. L., Wisniewski M. E., Droby E., Chalutz E., 1993. A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruit and vegetables. Scientia Horticulturae 53: 183–189.

Winston F, C. Dollard and. L. Ricupero-Hovass, 1995. Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast,* 11: 53-55.

Wisniewski M. E., Biles C., Droby S., MacLaughin R., Wilson C. L. and Chalutz E., 1991. Mode of action of the postharvest boicontrol yeast, *Pichia guillermondii*. Characterization of attachment to Botrytis cinerea. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39: 245-258.

Wisniewski M. E. and Wilson C. L., 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances. *Hort. Science*, 27: 94-98.

Wright S. A. I., Ianiri G., De Felice D. V. and Castoria R. 2008. A rapid assay for patulin degradation by the basidiomycetous yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11. COST Action 924. Novel approaches for the control of postharvest diseases and disorders, pp. 19-29.

Yamazaki M., Komagata K., 1983. An electrophoretic comparison of enzymes of ballistosporogenous yeasts. *J. Gen. Appl. Microbiol.,* 29: 115-143.

Yehuda H., Droby S., Bar-Simon M., Wisniewski M. E. e Goldway M., 2003. The effect of under- and overexpressed *CoEXGI* –encoded exoglucanase secreted by *Candida oleophila* on the biocontrol of *Penicillim digitatum*. *Yeast*, 20: 771-780.

Yoshikawa Y., Ikai K., Umeda Y., Ogawa A., Takesako K., Kato I. and Naganawa H., 1993. Isolation, structures and antifungal activities of new aureobasidins. *The Journal of Antibiotic*, 46(9): 1347-1354.

Yu J. H., Hamari Z, Han K. H., Seo J. A., Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C., 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*., 41(11): 973-981.

Zhou S., Jiang L., Geng C., Cao J. and Zhong L, 2009. Patulin-induced oxidative DNA damage and p53 modulation in HepG2 cells. *Toxicon,* 55: 390-395.

Zhu S. J., 2006. Non-chemical approaches to decay control in postharvest fruit. In: Noureddine, B., Norio, S. (Eds.), Advances in Postharvest Technologies for Horticultural Crops. Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 297–313.

Zupan J, Muth T. R., Draper O, Zambryski P, 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J,* 23: 11–28.