



Università degli Studi di Sassari



SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA

**Scienze dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari**

Indirizzo: Biotecnologie Microbiche Agroalimentari

Ciclo XXIV

Functional analysis of the *Fusarium culmorum* genome: gene silencing, transposon tagging and gene knock-out by homologous recombination

Francesca Spanu

<i>Direttore della Scuola:</i>	prof. Giuseppe Pulina
<i>Referente di Indirizzo</i>	prof.ssa Marilena Budroni
<i>Docente Guida</i>	prof. Quirico Migheli e dr. Matias Pasquali
<i>Docente Tutor</i>	dott.ssa Barbara Scherm

Triennio accademico 2009-2011

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 L'importanza dei cereali.....	3
1.2 Il frumento duro.....	4
1.2.1 Caratteristiche morfologiche.....	5
1.2.2 Stadi fenologici.....	6
1.3 <i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Smith) Sacc.....	8
1.4 Fusariosi del frumento.....	11
1.4.1 Il “mal del piede”.....	11
1.4.2 La fusariosi della spiga.....	13
1.4.3 Strategie di lotta.....	15
1.5 Le micotossine.....	16
1.5.1 Fumonisine.....	18
1.5.2 Zearalenone.....	19
1.5.3 I tricoteceni.....	21
1.5.4 La biosintesi dei tricoteceni.....	25
1.6 Tecniche conosciute per l'analisi del genoma nei funghi filamentosi.....	26
1.6.1 Gene silencing.....	28
1.6.2 Gene knock-out mediante ricombinazione omologa.....	30
1.6.3 Transposon Tagging.....	30

2. SCOPO DEL LAVORO.....	34
3. CAPITOLO I	36
Il silenziamento genico nel fungo filamentoso <i>Fusarium culmorum</i>	
3.1 Sintesi.....	37
Altered trichothecene biosynthesis in <i>TRI6</i> -silenced transformants of <i>Fusarium culmorum</i> influences the severity of crown and foot rot on durum wheat seedlings. (Articolo 1: pubblicato su <i>Molecular Plant Pathology</i>)	39
4. CAPITOLO II	52
Il ruolo del gene <i>stuA</i> nelle principali attività fisiologiche e metaboliche del fungo fitopatogeno <i>Fusarium culmorum</i>	
4.1 Sintesi.....	53
<i>FcstuA</i> from <i>Fusarium culmorum</i> controls wheat crown rot in a toxin and pectolytic enzyme secretion independent manner (Articolo 2)	55
5. CAPITOLO III	76
Mutagenesi mediata da trasposoni non autonomi per “etichettare” geni nel patogeno del frumento <i>Fusarium culmorum</i>	
5.1 Sintesi.....	77
Transposition of the Miniature Inverted-Repeat Transposable Element <i>mimpI</i> in the wheat pathogen <i>Fusarium culmorum</i> (Articolo 3)	79
6. DISCUSSIONE GENERALE E PROSPETTIVE FUTURE.....	98
Ringraziamenti.....	109
Riferimenti bibliografici.....	110

1. INTRODUZIONE

1.1 L'importanza dei cereali

I cereali coltivati nei diversi areali agricoli del mondo appartengono all'ordine delle *Poales* e alla famiglia delle *Graminaceae* (*Poaceae*) che è suddivisa in circa 635 generi e annovera più di 8000-9000 specie. Ricoprono un ruolo economico ed ecologico preponderante in quanto rappresentano la fonte primaria di sostentamento dell'umanità, degli animali selvatici e della maggior parte degli allevamenti zootecnici. Infatti, fin dallo sviluppo delle prime civiltà i cereali hanno svolto un ruolo chiave nell'alimentazione dovuto ad alcune loro peculiarità: ottima fonte energetica (elevati quantitativi di carboidrati, buon contenuto proteico, lipidico e vitaminico), facilità di trasporto e conservabilità a lungo termine, grande adattabilità ai differenti climi e tipi di terreno con conseguente facilità di coltivazione.

I cereali maggiormente diffusi al mondo sono: il frumento (nelle aree cerealicole Europee), il riso (nelle regioni Asiatiche) il mais (nelle Americhe) il sorgo e il miglio (in Africa).

Dal rapporto trimestrale della Crop Prospects Food Situation della FAO del 6 ottobre 2011, la produzione mondiale dei cereali nell'annata agraria 2011/2012 ammonterà a 2310 milioni di tonnellate pari al 3% (circa 68 milioni di tonnellate) in più rispetto a quello dichiarato nel 2010/2011. Nello specifico si è registrato un incremento della produzione mondiale di frumento, riso e altri cereali detti secondari rispettivamente del 4,6%, 3% e 2,1%.

Nonostante il trend positivo delle produzioni, l'attuale rallentamento economico internazionale potrebbe influenzare la sicurezza alimentare mondiale in particolare per i paesi poveri e in via di sviluppo. Il rapporto afferma che ad un aumento di produzione corrisponde una minore domanda e questo meccanismo incrementa il calo dei prezzi sul mercato.

Ultime stime della FAO indicano che 32 paesi in tutto il mondo hanno bisogno di assistenza esterna a causa di raccolti scarsi, conflitti bellici, disastri naturali, e prezzi degli alimenti sempre più alti nei mercati interni (fonte: <http://www.fao.org/giews>).

1.2 Il frumento duro

Triticum turgidum o *durum* è un cereale autunno-vernino originario dell'Africa centro Orientale e precisamente dell'Etiopia (Vavilov, 1926). Rispetto al frumento tenero (*Triticum aestivum*) ha un ciclo colturale più corto e predilige ambienti dal clima caldo-asciutto. È una specie longigiurna e microterma, gli areali di coltivazione si estendono tra i 30°-60° di latitudine ma a volte viene coltivato anche in zone più settentrionali caratterizzate da inverni rigidi e lunghi come ad esempio in Canada o nella penisola Scandinava. In questi casi la semina viene spostata al periodo primaverile con conseguente raccolta al periodo autunnale. La resistenza del frumento al freddo dipende dalla varietà, dallo stadio fenologico e dallo stato fisiologico della pianta. Per quanto riguarda le esigenze pedologiche, il frumento duro si adatta a tutti i tipi e strutture di terreno ma predilige terreni di medio impasto (argilloso-limoso con un buon apporto di sostanza organica mineralizzante), ben strutturati, con pH 6,5-7,8 e con un'ottima capacità drenante in quanto soffre di asfissia radicale. È buona pratica agricola avvicendare il frumento con colture da rinnovo ed evitare il ringrano o ristoppio dato che comporterebbe un impoverimento della fertilità del terreno (coltura depauperante) e una sensibile riduzione della produzione correlata ad un aumento della proliferazione di erbe infestanti, insetti, nematodi e ad una maggiore incidenza delle malattie fungine.

Secondo la classificazione di Linneo le specie di frumento vengono distinte in due generi: il genere *Aegilops* che comprende specie ad *habitus* selvatico e il genere *Triticum* che annovera le specie addomesticate e attualmente coltivate. Dal punto di vista genetico una prima classificazione è stata fatta da MacKey, successivamente rivisitata da van Slageren, che suddivide il genere *Triticum* in 6 specie a seconda del livello di ploidia. *Triticum durum* è tetraploide e si è evoluto in seguito all'ibridizzazione del progenitore selvatico *Aegilops speltoides* con il polline di *Triticum urartu*.

La produzione mondiale annuale, stimata ai primi del mese di settembre, si aggira intorno a 35,3 milioni di tonnellate, solo di poco superiore a quella dell'annata agraria 2007/2008 (Serra, 2011).

Da indagini ISTAT condotte in Italia lo scorso 11 febbraio sulle semine di frumento duro effettuate durante l'annata agraria 2009/2010 e le previsioni per l'annata in corso è emerso che le superfici destinate alla coltivazione sono diminuite del 13,5% soprattutto

nel centro della penisola. Probabilmente questo decremento è da attribuire alla crescita del 19,1% dei terreni a riposo rispetto alla scorsa annata dovuto all'aumento dei casi di rotazione colturale, alle incertezze del mercato e alle condizioni meteorologiche avverse durante il periodo della semina.

1.2.1 Caratteristiche morfologiche

Il frumento duro presenta un culmo cilindrico alto 80-110 cm suddiviso in 5-8 internodi cavi al loro interno tranne la parte distale dell'ultimo internodo che è piena di tessuto spugnoso. L'altezza e la resistenza all'allettamento dipendono dalla varietà.

Le foglie sono formate dalla guaina che avvolge ciascun nodo del culmo, dalla lamina lineare-lanceolata e appuntita all'estremità con nervature parallelinervie e superficie glabra o pubescente, dalla ligula e da due auricole. L'ultima foglia prima dell'infiorescenza è detta foglia "a bandiera".

L'apparato radicale è di tipo fascicolato composto da radici primarie generate durante le prime fasi di germogliazione e secondarie o avventizie sviluppate dai nodi basali. Le radici primarie rimangono vitali per tutto il ciclo vegetativo della pianta e contribuiscono all'assorbimento di acqua e sostanze nutritive mentre quelle avventizie sono fibrose e contribuiscono ad ancorare la pianta al terreno aumentandone la resistenza meccanica.

L'infiorescenza è una pannocchia, comunemente chiamata spiga, composta da spighette inserite in ogni nodo dell'asse principale (rachide) in posizione alterna su due file opposte. Le dimensioni e la fragilità del rachide cambiano a seconda della varietà. Le spighette sono costituite da un breve asse detto rachilla sul quale sono inserite le glume che contengono al loro interno 2-5 fiori. Gli organi riproduttivi dei fiori: tre stami e un ovario supero monocarpellare sormontato da un pistillo con stigma bifido e piumoso sono avvolti dalla palea e dal lemma, quest'ultimo provvisto di una resta lunga fino a 20 cm (genericamente sono chiamati glumetta superiore e inferiore).

La cariosside è un frutto secco indeiscente di forma ellittica-ovoidale ed è caratterizzata da una parte dorsale convessa e da una parte ventrale facilmente riconoscibile per la presenza di un solco che divide a metà la cariosside. Schematicamente la struttura della cariosside può essere suddivisa in: pericarpo, strato aleuronico, endosperma ed embrione. Il pericarpo è l'involucro esterno fibroso ricco di cellulosa e sali minerali che

funge da barriera protettiva per il seme. A seconda della varietà può essere di colore ambrato, rossiccio, bianco, a volte nerastro o violetto. Lo strato aleuronico è uno strato monocellulare ricco di proteine, grassi e vitamine che separa l'endosperma amilaceo dal pericarpo. L'endosperma è composto prevalentemente da amido (circa 70%) e proteine (circa 14%), ha struttura vitrea di colore ambrato o bianconato e costituisce il tessuto di riserva della cariosside. L'embrione è ricco di sostanze nutritive (proteine, lipidi, vitamine e sali minerali) in quanto ha il compito di sostenere la giovane plantula durante la germinazione. All'interno dell'embrione sono già preformati i principali organi della pianta: il fusticino o epicotile che unisce la piumetta, avvolta dal coleoptile, alla radichetta protetta da una specie di cuffia detta coleorizza.

1.2.2 Stadi fenologici

Il ciclo biologico del frumento coincide con il ciclo produttivo e schematicamente viene suddiviso in fasi fenologiche. Esistono diverse tipologie di scale fenologiche, la scelta viene fatta in base al tipo di indagine condotta. Ad esempio la scala centesimale di Zadoks del 1974, estremamente dettagliata nella descrizione morfologica, è utilizzata soprattutto in ambito sperimentale mentre quella di Baggiolini e Keller (1954) viene utilizzata prevalentemente per analisi di campo (interventi fitosanitari o fertilizzazioni). In questi ultimi anni sono stati messi a punto modelli di analisi basati sullo studio degli apici meristemati per determinare con precisione certissima lo stadio di sviluppo della pianta di frumento (Kirby e Appleyard, 1987; McMaster, 1997; Puppi e Zinoni, 1999). Questa tecnica si basa sul prelievo di campioni distruttivi in campo e sull'impiego di strumenti di laboratorio appropriati per l'individuazione e il riconoscimento dei vari componenti del meristema apicale (Kirby e Appleyard, 1987). La tecnica di Kirby (microfenologia) viene spesso associata alle osservazioni fenologiche tradizionali (Kirby *et al.*, 1994).

La scala attualmente più utilizzata rimane quella di Zadoks che suddivide lo sviluppo vegetativo e riproduttivo di una pianta di frumento in 10 stadi fenologici. Ognuno di questi stadi (fase principale di crescita) è stato suddiviso in altri 9 sottostadi (fase secondaria di crescita). In tabella 1 sono stati riportati i dieci stadi in cui viene suddivisa la fase principale di crescita.

Tabella 1: Scala fenologica centesimale di Zadoks. Codice decimale (0-9) per identificare la fase principale di crescita del frumento.

Codice Zadoks	Fase di crescita principale	Descrizione
0	Germinazione	Inizia con il rigonfiamento della cariosside e la rottura del tegumento seguita dall'emissione dell'apice radicale e del germoglio.
1	Sviluppo della pianta	Il coleoptile si allunga ed emerge dalla superficie del terreno fino alla formazione dell'epicotile (primo internodo embrionale) e delle prime foglie. L'apparato radicale sviluppa le radici avventizie.
2	Accestimento	Emissioni di nuovi germogli a partire dall'ascella di ogni foglia basale (detti culmi secondari). Ogni culmo di accestimento può a sua volta accestire e sviluppare un proprio apparato radicale.
3	Allungamento del culmo	Allungamento rapido degli internodi con emissione di nuove foglie. L'ultima foglia è chiamata foglia bandiera. In questa fase il frumento assorbe notevoli quantità di acqua e elementi nutritivi.
4	Stadio della botticella	Ingrossamento della guaina della foglia bandiera che avvolge la spiga.
5	Emergenza della spiga	Dallo stadio di botticella la spiga impiega circa 10-20 giorni ad emergere.
6	Fioritura	Dura circa 4-8 giorni. Inizia dalle spighette centrali per poi estendersi in tutta la spiga. Le antere fuoriescono dalle glumette.
7	Maturazione lattea	Dopo la fecondazione inizia lo sviluppo della cariosside. In questo stadio la cariosside raggiunge il massimo volume e contiene un liquido lattescente ricco di amido e proteine.
8	Maturazione cerosa	L'endosperma perde umidità e assume una consistenza pastosa. La cariosside può essere facilmente schiacciata dalla pressione delle dita.
9	Maturazione fisiologica	La pianta non è più in grado di effettuare la fotosintesi, non accumula più le sostanze nutritive nelle cariossidi che assumono una consistenza vitrea e coriacea.

1.3 *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc.

F. culmorum insieme a *F. graminearum* Schwabe (telomorfo=*Gibberella zeae*) e *F. pseudograminearum* O'Donnell e Aoki (telomorfo=*Gibberella coronicola*) rappresentano i più importanti patogeni del frumento e sono annoverati tra i principali agenti causali del “mal del piede” e della fusariosi della spiga nel mondo (Wagacha e Muthomi, 2007; Wang *et al.*, 2006; Goswami e Kistler, 2004). Nel complesso i funghi appartenenti al genere *Fusarium* rappresentano uno dei gruppi più dannosi per le produzioni agricole sia in campo, prima della raccolta, che nel post-raccolta durante le fasi di stoccaggio in quanto molte specie appartenenti a questo genere sono produttrici di micotossine termoresistenti. Le micotossine sono dei metaboliti secondari che, se presenti in concentrazioni elevate nel cibo e nelle derrate alimentari possono causare gravi intossicazioni alimentari (micotossicosi) nell' uomo e negli animali (Marasas *et al.*, 1984; Sudakin, 2003). Le tossine prodotte da *F. culmorum* appartengono al gruppo dei tricoteceni (deossinivalenolo, nivalenolo) (Bottalico e Perrone, 2002; Bensassi *et al.*, 2010), sesquiterpeni epossidici in grado di inibire la sintesi proteica negli eucarioti (Wei e McLaughlin, 1974). Oltre ai tricoteceni, *F. culmorum* produce lo zearalenone, lattone dell'acido resorcilico, di solito più abbondante sul mais che su frumento o su orzo. *F. culmorum* è un fungo ubiquitario del terreno comunemente riscontrabile anche come saprofita su residui colturali. Secondo la classificazione di Nelson *et al.* (1983) appartiene alla Sezione Discolor e come tutti i funghi appartenenti a questa Sezione non produce microconidi. Caratteristiche morfologiche da tenere in considerazione per la sua identificazione sono: la presenza di macroconidi 3-5 settati piuttosto corti e larghi con cellula apicale smussata e cellula basale leggermente accennata o con un piede ben formato, generati a partire da rami conidiofori monofialidici o da sporodochi di colore arancione (Figura 1) (Balmas *et al.*, 2000; Leslie *et al.*, 2006). Inoltre *F. culmorum* produce abbondanti spore di resistenza dette clamidospore (singole, a catena, in gruppo o a partire dal macroconidio) che presentano parete ispessita e ricca di sostanze di riserva. Le clamidospore hanno la capacità di sopravvivere in condizioni ambientali avverse e rimangono quiescenti per lunghi periodi in attesa di condizioni favorevoli (Corazza e Balmas, 1994).



Figura 1. Principali caratteristiche morfologiche in *F. culmorum* osservate al microscopio ottico (OLYMPUS BX 41). (A) Panoramica di conidiofori monofialidi; (B) Particolare del ramo conidioforo monofialide e conidio in formazione; (C) Macronidi 3-4 e 5 settati, prodotti da sporodochi.

I macroconidi sono morfologicamente simili a quelli di *F. sambucinum* (Fuckel); tuttavia il rapido accrescimento delle colonie di *F. culmorum* su PDA a 25°C e la formazione di abbondante micelio aereo fioccoso di colore bianco tendente al giallo aranciato (Figura 2A) permette facilmente di identificarlo. La faccia ventrale può variare da rosso carminio a rosso mattone (Figura 2B) (Nelson *et al.*, 1983; Burgess *et al.*, 1988).

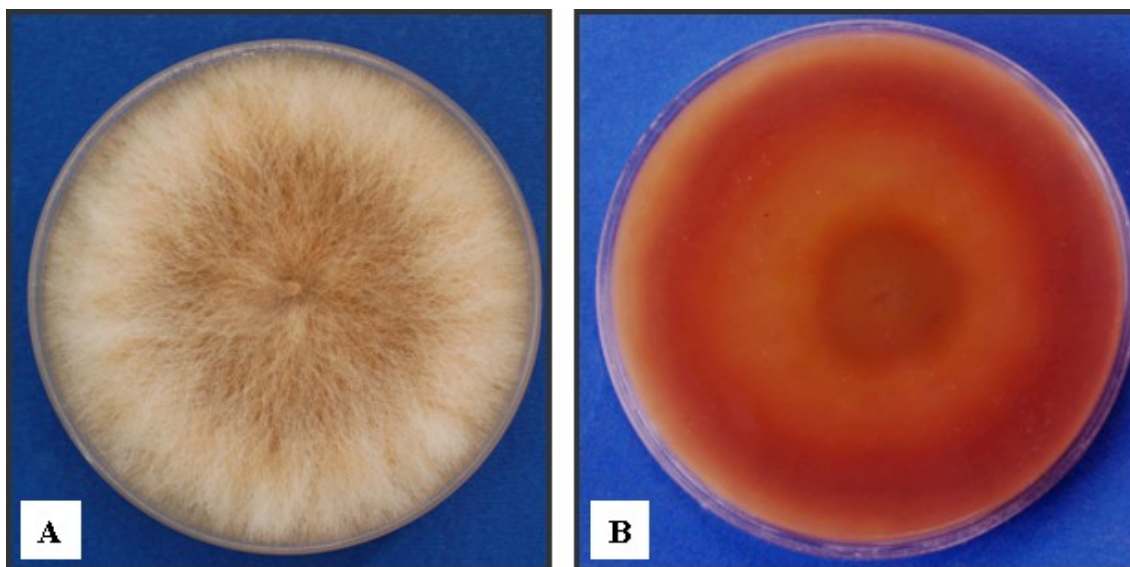


Figura 2. Colorazione e crescita della colonia di *F. culmorum* su PDA. (A) faccia dorsale; (B) faccia ventrale.

F. culmorum è probabilmente un fungo eterotallico (Kerényi *et al.*, 2002) privo di fase sessuata, mesofilo, infatti predilige regioni temperate dell'America, dell'Europa, dell'Asia e dell'Africa ciò nonostante si ritrova anche in ambienti freddi come l'Europa del Nord, l'Europa Centro Orientale e il Canada. La dispersione nell'ambiente dei propaguli è per lo più affidata all'acqua tramite la pioggia (Hörberg, 2002), ma anche attraverso il vento e talvolta gli animali (Parry *et al.*, 1995; Osborne *et al.*, 2007). La temperatura e l'umidità giocano un ruolo fondamentale nei processi di infezione e di colonizzazione della pianta ospite da parte del fungo (Doohan *et al.*, 2003).

I processi di infezione e i meccanismi di penetrazione di *F. culmorum* sono diversi a seconda dell'organo della pianta ospite colonizzato. Recenti analisi condotte con il microscopio confocale a scansione laser sulle radici di piante di frumento infette hanno rivelato inizialmente un percorso delle ife di tipo apoplastico intercellulare tra le cellule dell'epidermide e quelle della corteccia seguito da un percorso simplastico intracellulare con completa colonizzazione della corteccia della radice. Tuttavia il fungo non è in grado di penetrare nell'endoderma e nella stele della radice (Beccari *et al.*, 2011), mentre analisi effettuate sulla sezione del culmo hanno messo in evidenza che *F. culmorum* penetra nella pianta anche attraverso gli stomi delle guaine fogliari che avvolgono la base dello stelo così come già osservato nel coleoptile da Malalasekera *et al.* nel 1973. L'infezione non si estende oltre i primi due internodi basali in quanto *F. culmorum* non è un patogeno sistemico (Clement e Parry 1998) e non sembrerebbe in

grado di risalire il culmo. *F. culmorum* è in grado di colonizzare anche gli organi riproduttivi del frumento con infezioni alla spiga nel periodo dell'antesi (Lacey *et al.*, 1999). I conidi germinano sulla superficie delle glume e le ife per vie intercellulari e intracellulari attraversano la lemma e la palea, raggiungono l'ovario dove ammassi miceliari colonizzano completamente i tessuti (Zange *et al.*, 2005).

F. culmorum è un patogeno che nei nostri ambienti è sempre presente e si sviluppa maggiormente dove vi è carenza idrica e temperature elevate (Cariddi *et al.*, 1990; Strunnikova *et al.*, 2000).

1.4 Fusariosi del frumento

Il “mal del piede” e la fusariosi della spiga sono due importanti malattie dei cereali autunno-vernini che colpiscono le piante in tutti gli stadi del ciclo biologico della coltura.

1.4.1 Il “mal del piede”

Il “mal del piede” è una fitopatologia ad eziologia complessa trasmessa attraverso il terreno da diversi agenti causali (*F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. crookwellense*, *Microdochium nivale*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* e *Bipolaris sorochiniana*) che possono agire singolarmente o in associazione sullo stesso ospite a seconda delle condizioni agro-climatiche. In Italia tra i possibili agenti causali del “mal del piede”, *F. culmorum* è risultato il più diffuso (Corazza e Balmas, 1994). A seconda dello stadio fenologico in cui viene attaccata la pianta ospite si possono registrare sintomatologie differenti. Uno dei sintomi che contraddistingue questa malattia è l'imbrunimento basale più o meno vistoso del culmo nella zona del colletto che si estende fino ai primi due internodi (Figura 3A). Nella fase iniziale della malattia si osservano imbrunimenti delle guaine fogliari più esterne fino alla colonizzazione completa dei tessuti più interni compromettendo la traslocazione dell'acqua e delle sostanze nutritive. I danni che il fungo causa al sistema conduttore della pianta, nelle fasi fenologiche tra la spigatura e la maturazione lattea, possono portare all'emissione di spighe bianche (Figura 3B) con aspetto di maturazione anticipata che risultano vuote o con cariossidi striminzite (Figura 3C) oppure può ridurre la resistenza meccanica del culmo favorendo l'allettamento delle piante in

campo. Attacchi precoci del fungo causati dall'impiego di cariossidi contaminate o dalla presenza di inoculo nel terreno (clamidospore o micelio svernante su residui vegetali infetti) possono portare alla mancata emergenza della giovane plantula, all'imbrunimento delle radici e del coleoptile o alla morte delle piantine subito dopo l'emergenza causando fallanze nei campi (Figura 3D). Se l'attacco si manifesta durante lo stadio di accestimento si può verificare la morte dei culmi secondari con conseguente minore produzione di spighe per ettaro (Balmas, 1992). Pertanto si hanno danni a carico della qualità di produzione ma anche della quantità (Corazza *et al.*, 1987; Covarelli e Nicholson, 2002).

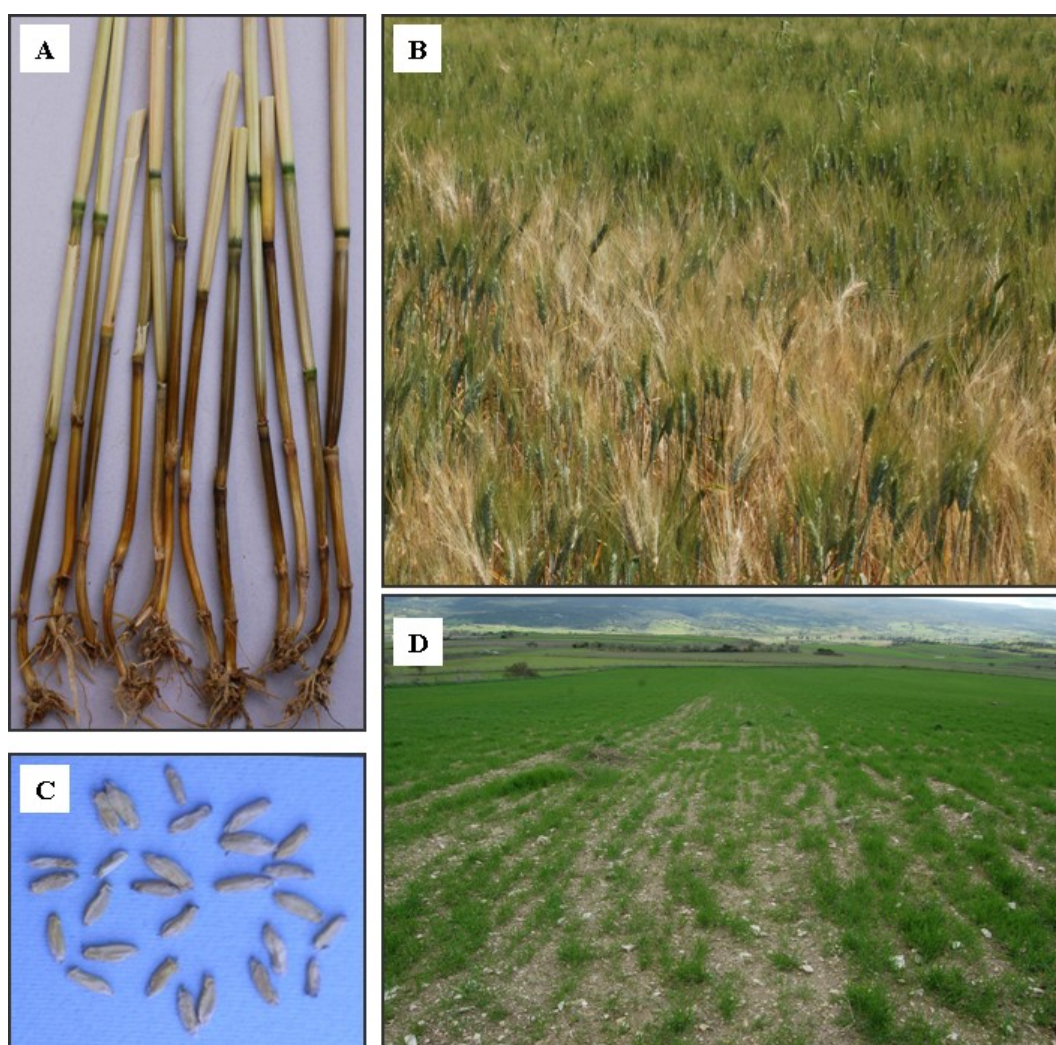


Figura 3. Principali sintomatologie del “mal del piede” causate da *F. culmorum*: (A) imbrunimento basale dei primi 2 internodi del culmo e della radice; (B) spighe bianche; (C) cariossidi striminzite; (D) fallanze nel seminato per mancata emergenza della plantula o per morte subito dopo l'emergenza.

Il potenziale di inoculo (capacità di sopravvivenza dei propaguli in assenza della pianta ospite), il periodo e la modalità di semina (semine anticipate, profonde e troppo fitte), le sistemazioni idraulico agrarie e le condizioni pedologiche del terreno (ristagno idrico, aridità dei suoli, terreni pesanti), le cospicue concimazioni azotate, l'avvicendamento con altri cereali autunno-vernini, lo stato sanitario della semente, la scelta delle cultivar e le condizioni climatiche (temperatura, umidità) sono tutti fattori di stress che influenzano lo sviluppo della malattia e rendono le piante di frumento più soggette agli attacchi del patogeno (Balmas, 1992; Corazza e Balmas, 1994; Pettitt *et al.*, 1996). Da studi effettuati allo scopo di valutare quale fosse l'effetto delle pratiche culturali sui funghi responsabili del "mal del piede" è emerso che *F. culmorum* è maggiormente diffuso in quei terreni dove veniva praticata la tecnica del minimum tillage o del no tillage (detta anche sod tillage) (Montanari *et al.*, 2006; Bateman *et al.*, 2007), dove il terreno non viene lavorato o è lavorato superficialmente.

Nell'Italia centro-meridionale e in Sardegna i fattori ambientali, quali suoli asciutti e aridi e temperature elevate, favoriscono lo sviluppo del "mal del piede" dovuto a *F. culmorum* con conseguenti gravi perdite di produzione (Cariddi *et al.*, 1991; Balmas *et al.*, 2006).

1.4.2 La fusariosi della spiga

La fusariosi della spiga è una delle malattie fungine più distruttive del frumento diffusa in tutto il mondo in forma epidemica (Bottalico *et al.*, 2002; McMullen *et al.*, 1997; Balmas *et al.*, 1998). È stata descritta per la prima volta alla fine del 19 secolo in Inghilterra (Smith, 1884); in Italia le prime segnalazioni risalgono agli inizi del ventesimo secolo (Peglion, 1900) ma si è manifestata in maniera virulenta in alcuni areali del Nord e del centro Italia agli inizi degli anni '90 (Pancaldi, 1996; Corazza *et al.*, 1989; Balmas e Corazza, 1994; Balmas *et al.*, 1995).

I principali agenti causali della malattia appartengono al genere *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. triticum*) e al genere *Microdochium* (*M. nivale nivale* e *M. nivale majus*). Sulle spighe possono essere isolate anche altre specie micotossigene di *Fusarium* che però non causano la malattia (*F. poae*, *F. langsethiae*). *F. graminearum* e *F. culmorum* sono tra gli agenti patogeni più diffusi e più aggressivi in quanto determinano ingenti danni alla produzione sia dal punto di vista quantitativo

(cali della produzione intorno al 30%-70% dovuto al minor numero di cariossidi o alla riduzione delle dimensioni e del loro peso unitario e specifico) che qualitativo (contaminazione della granella da micotossine, valore nutritivo, colore della cariosside etc.) (Prodi *et al.*, 2009). Recentemente, il potenziale distruttivo della fusariosi del frumento è stato messo in luce in maniera drammatica in seguito alle epidemie scoppiate nel Nord America (Windels, 2000; Goswami e Kistler, 2004; McMullen, 2003). Questi attacchi hanno portato alla produzione di granella contaminata da micotossine a livelli talmente elevati da renderla del tutto incommerciabile.

Le fasi fenologiche più sensibili del frumento per la diffusione della malattia sono la spigatura-fioritura e la maturazione latteo-cerosa (Schroeder e Christensen, 1963). La gravità della malattia è influenzata dalle condizioni climatiche (caldo umido e pioggia), dalle tecniche colturali impiegate (precessione colturale, potenziale di inoculo in campo e gestione dei residui colturali, concimazioni azotate eccessive, impiego di varietà sensibili) e dalla microflora e microfauna presente nel terreno (Balmas *et al.*, 1998). I sintomi della malattia sono visibili alcuni giorni dopo l'infezione, la spiga presenta disseccamenti localizzati o totali del rachide che possono portare alla prematura essiccazione della spiga e quindi alla formazione di cariossidi striminzite e scure in proporzione alla percentuale di tessuto infetto (Figura 4A e 4B). Se l'infezione avviene durante periodi umidi e piovosi si può osservare la formazione di micelio bianco rossastro sulla superficie della spiga e/o la comparsa di masserelle arancioni nelle glume dette sporodochi (fruttificazioni agamiche) (Figura 4C e 4D) (Champeil *et al.*, 2004).

Sebbene la fusariosi della spiga sia una malattia presente da diversi decenni nelle regioni centro settentrionali del nostro Paese non è generalmente diffusa nell'Italia meridionale ad eccezione di particolari condizioni climatiche (Shah *et al.*, 2005). In Sardegna fino a qualche anno fa era una malattia del tutto sconosciuta. Recentemente a causa di particolari condizioni climatiche (elevata umidità, piogge copiose e temperature relativamente alte intorno ai 20-25°C) verificatesi tra la spigatura e la maturazione latteo-cerosa, *F. culmorum* è stato isolato in diversi areali cerealicoli anche come agente causale della fusariosi della spiga. Tuttavia gli attacchi registrati non sono stati molto gravi (Pruneddu *et al.*, 2010).

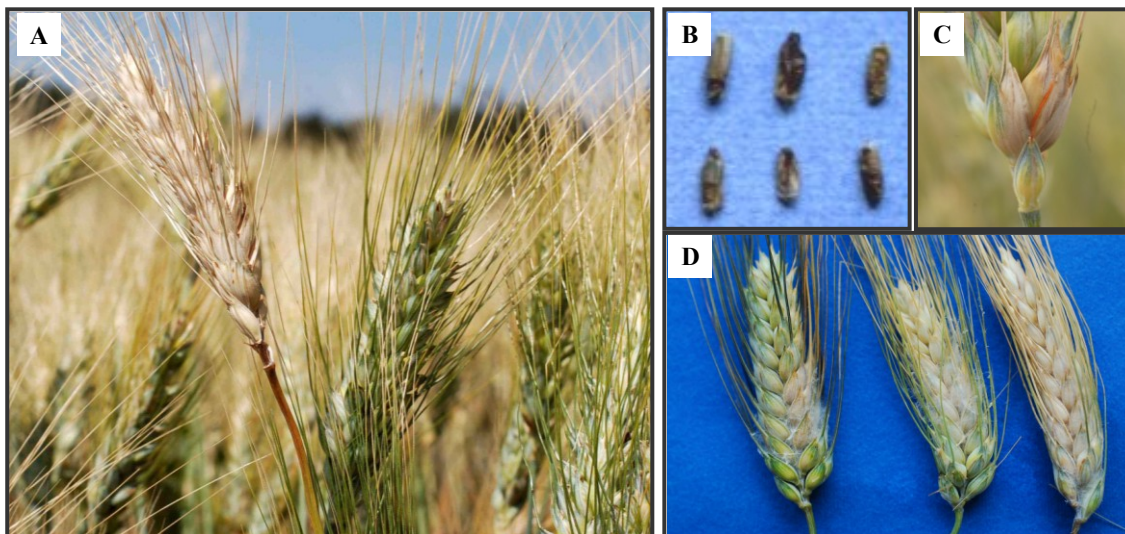


Figura 4. Principali sintomatologie della fusariosi della spiga causate da *F. culmorum*: (A) disseccamento totale del rachide e delle spighe; (B) cariossidi striminzite; (C) sporodochi in formazione nelle glume alla base della spiga (masserelle arancioni) ; (D) spighe sintomatiche ricoperte dal micelio del fungo.

1.4.3 Strategie di lotta

Le strategie impiegate per il controllo e il contenimento del “mal del piede” e della fusariosi della spiga prevedono un’integrazione sinergica dei diversi metodi di controllo attualmente in uso. La maggior parte di questi metodi si basa sull’adozione di misure preventive mirate a ridurre il potenziale di inoculo in campo e la suscettibilità delle piante all’attacco del patogeno.

Pertanto, è buona pratica agricola utilizzare varietà che negli anni si sono dimostrate meno suscettibili e sementi sane o conciate con principi attivi efficaci in grado di devitalizzare l’inoculo fungino e proteggere la pianta durante le prime fasi di sviluppo. Tebuconazolo, procloraz, ciproconazolo, bromoconazolo, epossiconazolo sono alcuni dei principali principi attivi utilizzati a tale scopo. Essi non garantiscono una completa protezione in tutti gli stadi fenologici del frumento in quanto sono soggetti ad una rapida degradazione soprattutto ad opera della microflora presente nella rizosfera (Iutyns’ka *et al.*, 2000). L’impiego di fungicidi formulati in complessi di inclusione con β -ciclodestrina migliorano il rilascio del principio attivo consentendo una fase più lunga di protezione degli organi della pianta (Balmas *et al.*, 2006).

Nel prevenire i danni è fondamentale preparare un buon letto di semina: eliminazione delle erbe infestanti, distruzione o interrimento dei residui colturali, arature profonde che consentano il rimescolamento degli strati del terreno e l’allontanamento

dell'inoculo dall'ospite. Un altro accorgimento importante è quello di non seminare nello stesso appezzamento frumento per annate agrarie consecutive (ringrano o ristoppio) ma effettuare ampie rotazioni colturali evitando le successioni con mais in quanto sensibile agli stessi patogeni (Wagacha e Muthomi, 2007). Perciò è sconsigliata la semina su sodo o su terreni preparati secondo la tecnica del “minimum tillage” (Montanari *et al.*, 2006). Semine troppo anticipate, interrimento della cariosside troppo in profondità, semine troppo fitte, concimazioni azotate eccessive e tutti quei fattori che hanno un ruolo di stress nello sviluppo della pianta comportano una maggiore predisposizione allo sviluppo delle infestazioni e sono per questo motivo da evitare (Corazza e Balmas, 1994; Martin *et al.*, 1991, Wagacha e Muthomi, 2007). Nonostante le forti limitazioni legate alla proibizione di alcuni gruppi di fitofarmaci per gli effetti tossicologici e l'impatto ambientale che ne conseguono, attualmente da un punto di vista economico l'abbandono della lotta chimica è sconsigliato. Per contenere la malattia è necessario individuare il principio attivo più appropriato, la dose e il periodo ottimale di somministrazione (inizio dell'infezione e massima suscettibilità del cereale). Interventi erranei riducono l'efficacia del trattamento e soprattutto viene incrementata la produzione di micotossine (Haidukowski *et al.*, 2004; Magan *et al.*, 2002). Ad esempio, nel caso della fusariosi della spiga il momento ottimale di intervento con procloraz, propiconazolo, epossiconazolo, tebuconazolo, cyproconazolo, azoxystrobin e procloraz è alla fioritura subito dopo un evento piovoso (Pancaldi e Alberti, 2004; Haidukowski *et al.*, 2004).

L'umanità in materia di sicurezza alimentare e salvaguardia dell'ambiente si trova ad affrontare continue sfide: deve produrre grandi quantità di prodotti di alta qualità ma a basso impatto ambientale sufficienti a sfamare l'intera popolazione. È in questo contesto che nasce la necessità di sviluppare metodi di lotta e di produzione alternativi ed altamente competitivi anche dal punto di vista economico a quelli cosiddetti “convenzionali” (Alabouvette *et al.*, 2009).

1.5 Le micotossine

Le micotossine sono prodotti naturali altamente tossici del metabolismo secondario di circa 200 specie di funghi filamentosi, appartenenti principalmente ai generi *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, che possono svilupparsi su una grande varietà di derrate

alimentari. Possono avere caratteristiche di genotossicità, cancerogenicità, immunotossicità, mutagenicità, nefrotossicità e teratogenicità (Zöllner e Mayer-Helm, 2006).

La contaminazione può avvenire in campo, a causa di condizioni ambientali sfavorevoli (elevata umidità relativa, attività dell'acqua, temperature elevate, piogge battenti) o pratiche agricole inadeguate (sistemazioni del terreno, piani rotazionali inesistenti, eccessive concimazioni azotate, etc.), oppure durante la raccolta o nelle fasi di trasporto e stoccaggio (Lacey *et al.*, 1999).

Le micotossine persistono nei prodotti contaminati per molto tempo dopo la morte del fungo produttore, infatti, non vengono completamente distrutte con i normali processi fisici (cernita, calore, radiazioni) chimici (estrazione, raffinazione) e biologici (fermentazioni) impiegati dalle industrie alimentari (Aziz *et al.*, 1997; Yumbe-Guevara *et al.*, 2003).

Le micotossine sono tossiche per l'uomo e per gli animali, a tal punto che, se presenti in concentrazioni elevate negli alimenti (sia di origine vegetale che animale) e nelle derrate, possono causare gravi intossicazioni alimentari (micotossicosi). Oltre che per ingestione le micotossine possono esplicare la loro attività tossica per inalazione e contatto (Peraica *et al.*, 1999).

Al fine di tutelare la salute umana la Comunità Economica Europea ha pubblicato diversi regolamenti. Il Regolamento (CE) n°1126/2007 del 28 settembre 2007 modifica il Regolamento (CE) n°1881/2006 del 19 dicembre 2006 e ridefinisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le *Fusarium* tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco (Tabella 2-3-4). I limiti (tenori massimi) vengono espressi in microgrammi per chilogrammo ovvero in parti per miliardo ($\mu\text{g}/\text{kg}$ o ppb).

Il genere *Fusarium* produce numerose tossine chimicamente diverse tra loro, le principali appartengono alla famiglia delle fumonisine, degli zearalenoni e al gruppo dei tricoteceni (Champeil *et al.*, 2004).

1.5.1 Fumonisine

Le fumonisine sono un gruppo di micotossine di origine alimentare diffuse in tutto il mondo soprattutto nelle coltivazioni di mais e nei suoi derivati (alimenti a base di mais, insilati e mangimi) prodotte da 15 specie fungine appartenenti al genere *Fusarium* (8 appartengono alla sezione *Liseola*, 5 alla sezione *Dlaminia*, 1 alla sezione *Elegans* e 1 alla sezione *Arthrosporiella*) (Rheeder *et al.*, 2002). Sono state isolate per la prima volta da colture di *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg nel 1988 (Gelderblom *et al.*, 1988). Attualmente *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, due specie appartenenti al complesso *Gibberella fujikuroi* (Leslie *et al.*, 2006), sintetizzano principalmente le fumonisine del gruppo B (FB₁, FB₂, FB₃, FB₄). Di questi quattro metaboliti, FB₁ di norma rappresenta dal 70% all' 80% del contenuto totale di fumonisina, FB₂ dal 15% al 25%, FB₃ dal 3% all'8%, e infine FB₄ una percentuale ancora più bassa (Rheeder *et al.*, 2002).

Dal punto di vista della struttura chimica le fumonisine sono diesteri dell'acido tricarballylico e polialcoli costituiti da una lunga catena idrocarburica idrossilata contenente gruppi metile e amminiacidici. L'elevata tossicità della FB₁ pare sia dovuta alla somiglianza con la struttura della sfingosina, componente della membrana sfingolipidica che esplica un importante ruolo in numerose funzioni cellulari, a livello di crescita, di differenziazione cellulare e di trasmissione degli impulsi nel sistema nervoso (Butchko, 2006). La fumonisina B₁ inibisce un enzima chiave del metabolismo degli sfingolipidi noto come N-acil-transferasi che è implicato nella conversione della sfingosina e sfingamina a ceramidi che vengono successivamente trasformati in sfingolipidi complessi (Butchko *et al.*, 2006).

I tenori massimi di fumonisine presenti nei prodotti alimentari sono stati sanciti dal Regolamento (CE) n° 1126/2007 (Tabella 2). Le fumonisine sono correlate ad una vasta gamma di problemi di salute umana e animale. Nell'uomo se ingerita in quantità elevate la fumonisina B₁ rappresenta uno dei fattori che contribuiscono alla comparsa del cancro esofageo, mentre se somministrata agli animali può causare neurotossicosi letale agli equini (sindrome encefalica caratteristica della leucoencefalomalacia equina ELEM), comparsa di tumori del fegato e dei reni ai ratti, edema polmonare nei maiali, epatiti e immunodeficienza nei bovini e nelle specie aviarie (Desjardins, 2006).

Tabella 2. Limiti massimi ammessi per le fumonisine di tipo B1 e B2 nei prodotti alimentari secondo il Regolamento (CE) 1126/2007 (Tratto da: Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea L 255/15 del 29/9/2007).

2.6	Fumonisine (Somma di B1 e B2)	Tenori massimi (µg/kg) (ppb)
2.6.1	Granoturco non trasformato, ad eccezione del granturco non trasformato destinato alla molitura ad umido (*)	4000
2.6.2	Granoturco destinato al consumo umano diretto, prodotti a base di granturco destinati al consumo umano diretto, ad eccezione degli alimenti elencati ai punti 2.6.3 e 2.6.4	1000
2.6.3	Cereali da colazione e merende a base di granturco	800
2.6.4	Alimenti a base di granturco trasformato e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200
2.6.5	Frazioni della molitura del granturco di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1103 13 o 1103 20 40 e altri prodotti della molitura del granturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	1400
2.6.6	Frazioni della molitura del granturco di dimensioni ≤ 500 micron di cui al codice NC 1102 20 e altri prodotti della molitura del granturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni ≤ 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	2000

(*) L'esenzione si applica unicamente al granturco per il quale è chiaro, attraverso ad esempio l'etichettatura e la destinazione, che è destinato unicamente alla molitura ad umido (produzione di amido).

1.5.2 Zearalenone

Lo Zearalenone appartiene alla famiglia degli estrogeni e chimicamente è un lattone dell'acido resorcilico (Urry *et al.*, 1966), di solito più abbondante su mais che su frumento orzo e sorgo (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987). *F. graminearum* è stato il primo organismo produttore studiato (Stob *et al.*, 1962). È sintetizzato anche da altre specie appartenenti al genere *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. equiseti* e *F. semitectum*) in condizioni di elevata umidità e temperatura compresa tra 10° e 30°C. Questo composto non presenta una tossicità acuta ma ha una azione estrogeno-simile e può causare sterilità nell'uomo e negli animali. Nei suini, animali particolarmente sensibili allo zearalenone, è responsabile di iperestrisimo mentre nei bovini e nelle specie aviarie di ipofertilità (Desjardins *et al.*, 2001). Infatti i suoi principali metaboliti (α -zearalenone e β -zearalenone) hanno una elevata affinità con i recettori degli

estrogeni epatici, uterini, mammari e ipotalamici con conseguenti effetti anabolici e uterotrofici (Coulombe, 1993). Dopo l'ingestione dell'alimento infetto si può avere una conversione dell'epimero α in quello β e viceversa. Il metabolita α -zearalenone ha una attività ormono-simile 4-5 volte superiore alla forma β e predomina nei suini, mentre nei polli le due forme si equivalgono (Hagler *et al.*, 1979).

La quantità massima di zearalenone negli alimenti è regolamentata secondo il Regolamento (CE) n° 1881/2006 poi modificato dal Regolamento (CE) n° 1126/2007 (Tabella 3).

Negli ultimi anni sono stati ideati efficienti sistemi di detossificazione enzimatica dello zearalenone grazie all'identificazione del gene *zhd101* isolato da *Clonostachys rosea* mediante tecnologie transgeniche (Takahashi-Ando *et al.*, 2002; Takahashi-Ando *et al.*, 2004; Igawa *et al.*, 2007). Il gene *zhd101* a pH alcalino converte la micotossina estrogena in 1-(3,5-dihydroxy-phenyl)-10'-hydroxy-1'-undecen-6'-one non estrogeno (Kakeya *et al.*, 2002).

Tabella 3: Limiti massimi ammessi per lo zearalenone nei prodotti alimentari secondo il Regolamento (CE) 1126/2007 (Tratto da: Gazzetta ufficiale dell'unione Europea L 255/15 del 29/9/2007).

2.5	Zearalenone	Tenori massimi ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (ppb)
2.5.1	Cereali non trasformati diversi dal granturco	100
2.5.2	Granturco non trasformato ad eccezione del granturco non trasformato destinato alla molitura ad umido (*)	350
2.5.3	Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca e germe come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.5.6, 2.5.7, 2.5.8, 2.5.9, 2.5.10	75
2.5.4	Olio di granturco raffinato	400
2.5.5	Pane (compresi piccoli prodotti da forno), prodotti della pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione, esclusi le merende a base di granturco e i cereali da colazione a base di granturco	50
2.5.6	Granturco destinato al consumo umano diretto, merende a base di granturco e cereali da colazione a base di granturco	100

Segue dalla pagina precedente

2.5	Zearalenone	Tenori massimi (µg/kg) (ppb)
2.5.7	Alimenti a base di cereali trasformati (esclusi quelli a base di granoturco) e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	20
2.5.8	Alimenti a base di granoturco trasformato destinati ai lattanti e ai bambini	20
2.5.9	Frazioni della molitura del granoturco di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1103 13 o 1103 20 40 e altri prodotti della molitura del granoturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	200
2.5.10	Frazioni della molitura del granoturco di dimensioni ≤ 500 micron di cui al codice NC 1102 20 e altri prodotti della molitura del granoturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni ≤ 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	300

(*) L'esenzione si applica unicamente al granoturco per il quale è chiaro, attraverso ad esempio l'etichettatura e la destinazione, che è destinato unicamente alla molitura ad umido (produzione di amido).

1.5.3 I tricoteceni

I tricoteceni sono un gruppo di micotossine prodotte da specie fungine appartenenti ai generi: *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Cylindrocarpon* e *Stachybotrys* (Ueno, 1989; Buck and Cote, 1991). Dal punto di vista chimico i tricoteceni sono sesquiterpeni epossidici e la loro tossicità è dovuta al gruppo epossidico (Organizzazione mondiale della sanità, WHO 1990). I tricoteceni prodotti da *Fusarium* sono diffusi in tutte le aree cerealicole del mondo e vengono schematicamente suddivisi in due gruppi (A e B) (Figura 5). Il gruppo A comprende le tossine T-2, HT-2, AcetilT-2, Diacetossilscirpenolo (DAS), 15 Acetossilscirpenolo, Neosolaniolo (NEO) e sono caratterizzati dalla presenza in C-8 di un gruppo funzionale diverso da un chetone (Koch, 2004). Il gruppo B comprende Deossinivalenolo (DON), Nivalenolo (NIV), 3-AcetilDON, 15-AcetilDON, Fusarenone X e sono caratterizzati da un gruppo carbonilico in posizione C-8 (Koch, 2004).

F. equiseti, *F. poae* e *F. sporotrichoides* producono tricoteceni di tipo A mentre *F. culmorum* e *F. graminearum* sono le specie fungine più rilevanti per la produzione di tricoteceni di tipo B (Joseph *et al.*, 2004).

I tricoteceni sono tossine termoresistenti e fotoresistenti che inducono effetti tossici acuti nell'uomo e negli animali e sono capaci di inibire la sintesi proteica negli eucarioti e di causare fenomeni apoptotici sia *in vitro* che *in vivo* in vari organi (Yang *et al.*, 2000; Pae *et al.*, 2003; Poapolathep *et al.*, 2002).

La tossicità acuta dei tricoteceni è caratterizzata da: disturbi gastrointestinali come vomito, diarrea e infiammazione delle mucose dello stomaco dell'intestino tenue e della bocca, irritazioni cutanee, inappetenza e rifiuto dell'alimento, effetti immunomodulatori che vanno dalla soppressione alla stimolazione del sistema immunitario, aborto, emorragie, anemia e leucopenia, febbre, mal di testa, dispnea, vertigini, cancro (Zöllner *et al.*, 2006; Cavret e Lecoeur, 2006; Pestka e Smolinski, 2005; Sakai *et al.*, 2007). Invece, il livello di tossicità è determinato in funzione al tempo in cui il soggetto rimane, a contatto con la tossina, dall'età e dallo stato nutrizionale del soggetto, dal tipo di tossina e dalla dose di tossina assimilata (Prelusky *et al.*, 1994).

In alcuni casi, i tricoteceni hanno un ruolo importante nel condizionare l'aggressività dei funghi patogeni (per esempio alcune specie del genere *Fusarium*) nei confronti delle piante ospiti (Proctor *et al.*, 2002; Bai *et al.*, 2002; Hestbjerg *et al.*, 2002; Mesterhazy *et al.*, 2002).

Il deossivalenolo e la tossina T-2 sono i principali tricoteceni ritrovati come contaminanti naturali su numerosi prodotti agricoli e alimenti commerciali (Sudakin, 2003).

Deossivalenolo. I ricercatori Giapponesi sono stati i primi a isolare il deossivalenolo ("Rd-toxin") da piante di orzo infettate da funghi appartenenti al genere *Fusarium* (Moorooka *et al.*, 1972). Poco dopo anche i ricercatori statunitensi avevano isolato la stessa tossina da piante di mais e di frumento infettate da *F. graminearum* e *F. culmorum* classificandola con il nome di "vomitoxin" per la sua capacità di causare emesi nei suini (Vesonder *et al.*, 1973, Greenhalgh *et al.*, 1986).

Il deossivalenolo (DON), noto appunto come vomitossina, si riscontra maggiormente in campo nelle colture cerealicole infette insieme ad un'altra tossina, lo zearalenone, dato che possiedono le medesime condizioni di sviluppo. Se le condizioni ambientali rimangono favorevoli è possibile isolare il deossivalenolo dalle granaglie immagazzinate, dai mangimi, dagli insilati, e dal fieno ma anche dai prodotti da forno

(pane, biscotti, merendine, cereali da colazione, fette biscottate, etc.) in quanto è molto resistente al calore (Bottalico e Perrone, 2002).

Può avere nei mammiferi effetti neurotossici e immunotossici ed è responsabile di sindromi emetiche e anoressiche negli allevamenti zootecnici (in particolar modo quelli suini) (Eriksen e Pettersson, 2004a). I tenori massimi stabiliti nel Regolamento (CE) n°1126/2007 (Tabella 4) per il DON sono: 1250 (µg/kg) per il grano tenero e 1750 (µg/kg) per il grano duro.

Tabella 4: Limiti massimi ammessi per le principali tossine prodotte dal genere *Fusarium* nei prodotti alimentari secondo il Regolamento (CE) 1126/2007 (Tratto da: Gazzetta ufficiale dell'unione Europea L 255/15 del 29/9/2007).

2.4	Deossivalenolo	Tenori massimi (µg/kg) (ppb)
2.4.1	Cereali non trasformati diversi da grano duro, avena e granturco	1.250
2.4.2	Grano duro e avena non trasformati	1.750
2.4.3	Granturco non trasformato ad eccezione del granturco non trasformato destinato alla molitura ad umido (*)	1.750 ¹
2.4.4	Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca e germe come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.4.7, 2.4.8 e 2.4.9	750
2.4.5	Pasta (secca)	750
2.4.6	Pane (compresi piccoli prodotti da forno), prodotti della pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione	500
2.4.7	Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200
2.4.8	Frazioni della molitura del granturco di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1103 13 o 1103 20 40 e altri prodotti della molitura del granturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	750
2.4.9	Frazioni della molitura del granturco di dimensioni ≤ 500 micron di cui al codice NC 1102 20 e altri prodotti della molitura del granturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni ≤ 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	1250

(*) L'esenzione si applica unicamente al granturco per il quale è chiaro, attraverso ad esempio l'etichettatura e la destinazione, che è destinato unicamente alla molitura ad umido (produzione di amido).

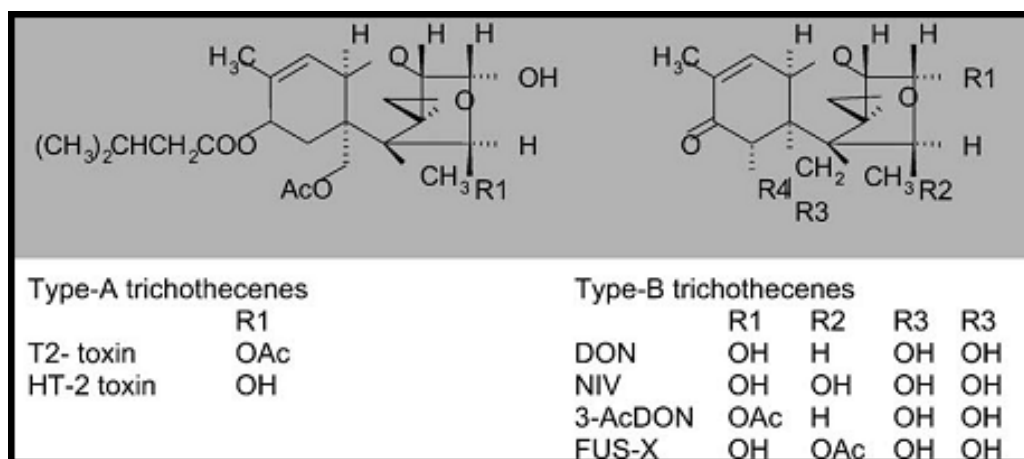


Figura 5. Formula di struttura dei tricoteceni del gruppo A e del gruppo B (Tratto da: Kock, 2004).

Nivalenolo. Il nivalenolo (NIV) è stato isolato per la prima volta dal fungo *F. nivale*, (Tatsuno *et al.* 1968; Ueno *et al.*, 1970). Successivamente, nel 1984, Marasas *et al.* hanno dimostrato che si trattava di un errore di identificazione in quanto era un ceppo atipico di *F. sporotrichioides*. Infatti, il *F. nivale* oggi noto come *Microdochium nivale* non produce tricoteceni. Tuttavia le specie maggiori produttrici di questa tossina sono *F. graminearum*, *F. crookwellense* e *F. culmorum* (Miller *et al.*, 1991). Ceppi di *F. graminearum* produttori di NIV sono stati frequentemente isolati in Giappone, Australia e Nuova Zelanda (Blaney e Williams, 1991) e in Italia (Logrieco *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1991; Logrieco *et al.*, 2002). Recentemente, anche nelle aree cerealicole della Louisiana sono stati isolati, in alta percentuale (79%), ceppi di *F. graminearum* produttori della tossina nivalenolo (Gale *et al.*, 2011).

Uomini e animali vengono a diretto contatto con la tossina principalmente con l'alimentazione e sono affetti da emorragia polmonare e cerebrale, vomito, diarrea e danni dovuti all'inibizione della sintesi proteica e del DNA, sintomi molto simili a quelli causati dal deossinivalenolo. Infatti, alcuni studi (Eriksen *et al.*, 2004b) hanno dimostrato che DON e NIV presentano la medesima citotossicità mentre da analisi condotte nel 2004 da Minervini *et al.* è emerso addirittura che NIV può avere una maggiore tossicità rispetto a DON.

Tossina T-2. La tossina T-2 è molto pericolosa per la salute umana e animale in quanto ha una tossicità acuta e cronica superiore a tutte le altre tossine appartenenti al gruppo dei tricoteceni. Se si verificano le condizioni ambientali favorevoli la tossina T-2 viene

isolata in campo ma persiste durante le fasi di post-raccolta e stoccaggio. Gli effetti tossici consistono nella progressiva riduzione dello stimolo alimentare, diarrea, vomito emorragie multiple, danni epatici, gravi irritazioni cutanee, attività citotossica, immunosoppressiva, neurotossica e antimitotica. Una grave micotossicosi dell'uomo è la leucopenia tossica alimentare (ATA) che ha causato la morte di centinaia di persone nell'Europa orientale soprattutto durante i periodi bellici per il consumo di cereali ammuffiti. Il decorso della malattia alcuni giorni dopo l'ingestione di alimenti contaminati dalla micotossina può essere così schematicamente suddiviso: infiammazione della mucosa gastrica intestinale seguita da nausea, vomito, diarrea, forti dolori addominali, febbre, lesioni della cavità orale, laringiti e faringiti necrotiche con conseguente strozzatura della laringe (Joffe, 1971).

1.5.4 La biosintesi dei tricoteceni

La biosintesi dei tricoteceni richiede oltre 15 passaggi enzimatici e inizia con la formazione del tricodiene mediante la ciclizzazione del farnesil pirofosfato. Successivamente, il tricodiene subisce una serie di passaggi di ossigenazione, ciclizzazione, isomerizzazione ed esterificazione fino alla sintesi dei tricoteceni bioattivi, come il deossinivalenolo, le sue due forme acetilate e il nivalenolo (Desjardins *et al.*, 1993).

In *G. zaeae* e nella specie affine *Fusarium sporotrichioides*, gli enzimi responsabili della biosintesi dei tricoteceni sono codificati da geni distribuiti in tre loci: 12 geni del cluster *TRI*, il locus del singolo gene *TRI101* e il locus dei due geni *TRI1-TRI16*. Il cluster *TRI*, composto da *TRI3*, *TRI4*, *TRI5* e altri nove geni, codifica il maggior numero di enzimi necessari per la biosintesi dei tricoteceni. Il cluster *TRI* codifica anche le proteine che regolano l'espressione dei geni cluster e le proteine coinvolte nel trasporto delle micotossine attraverso la membrana cellulare. Il gene *TRI101* codifica la proteina preposta all'acetilazione dell'ossigeno in C-3 dei tricoteceni e questa reazione ne riduce notevolmente la tossicità (Alexander *et al.*, 2009).

Nostri studi hanno dimostrato che anche in *F. culmorum* la regione genica composta da *TRI4-TRI5-TRI6* (7.6 Kb) ottenuta da un ceppo virulento di *F. culmorum* ha confermato lo stesso tipo di organizzazione (Scherf *et al.*, 2011).

TRI5, il primo gene biosintetico identificato in *F. sporotrichioides*, codifica l'enzima tricodiene sintetasi (Hohn e Beremand, 1989). In *G. zae*, la funzione di *TRI5* è stata determinata attraverso esperimenti di trasformazione mediante "gene disruption", dove si è riscontrato che i mutanti non sono in grado di compiere il primo passo della via biosintetica, e pertanto sono incapaci di produrre deossinivalenolo o i suoi precursori intermedi (Hohn e Desjardins, 1992; Proctor *et al.*, 1995). Solitamente questi mutanti hanno una ridotta virulenza su frumento (Harris *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2006).

L'espressione dei geni *TRI* del cluster è mediata da geni regolatori *TRI6* e *TRI10*, infatti una loro inattivazione, riduce o azzerava l'espressione degli altri geni *TRI*, blocca la produzione di tricoteceni e riduce sensibilmente la virulenza (Peplow *et al.*, 2003; Tag *et al.*, 2001; Seong *et al.*, 2009).

In particolare il gene *TRI6* codifica un fattore di trascrizione di tipo Cys2-His2 che si lega alle regioni promotrici dei geni cluster *TRI*, incluso *TRI5*, e anche i geni *TRIII*, *TRI6* e *TRI10*. Inoltre può regolare positivamente l'espressione di alcuni geni coinvolti nel metabolismo primario e nella formazione degli isoprenoidi, precursori dei tricoteceni (Alexander *et al.*, 2009). Recentemente, abbiamo dimostrato come il silenziamento del gene *TRI6* possa portare alla mancata espressione del gene *TRI5* e al conseguente azzeramento della produzione di tricoteceni in *F. culmorum* (Scherer *et al.*, 2011).

Le ricerche sul processo biosintetico di queste micotossine, sull'organizzazione e funzione dei geni preposti alla biosintesi dei tricoteceni e sul ruolo che i tricoteceni svolgono nel rapporto pianta-patogeno hanno identificato un potenziale obiettivo per aumentare la resistenza del grano a un maggior numero di malattie e per tenere sotto controllo il problema della contaminazione della cariosside da micotossine (Alexander *et al.*, 2009).

1.6 Tecniche conosciute per l'analisi del genoma nei funghi filamentosi

In questi ultimi anni la ricerca ha dedicato molte delle sue attenzioni all'analisi funzionale del genoma dei principali funghi filamentosi e oomiceti implicati in molteplici processi di patogenicità e micotossigenicità nel settore agroalimentare. Lo sviluppo di vari sistemi di trasformazione e di tecniche di mutagenesi casuale e mirata hanno permesso di indagare sulla funzionalità e sulla manipolazione dell'espressione di

numerosi geni in un numero sempre più significativo di funghi filamentosi. Oggi, tutto questo ha portato alla conoscenza del genoma di alcune importanti specie fungine (per esempio: *F. graminearum* PH-1, *F. oxysporum* 4287 e *Fusarium verticillioides* 7600) e ad analisi di sequenziamento ancora in corso (*F. culmorum* UK99) (<http://www.genomesonline.org/>).

Diversi approcci sono stati impiegati per l'ottenimento di trasformanti stabili e la loro scelta viene influenzata principalmente dalle caratteristiche del fungo. Un potenziale problema potrebbe essere la natura multinucleata dei funghi filamentosi, in quanto la presenza di più nuclei comporterebbe l'insorgere di confusione sia per i metodi basati sulla sostituzione genica sia per quelli di mutagenesi inserzionale. Entrambe, infatti, si basano sull'ottenimento di trasformanti omocariotici che hanno avuto origine da un singolo evento di mutazione e che permettono lo studio della funzione del gene bersaglio (Weld *et al.*, 2006).

Tra le principali tecniche di ingegneria genetica, impiegate per l'introduzione di geni di interesse nel genoma di un microrganismo (trasformazione), oggi applicabili anche ai funghi filamentosi, le più utilizzate sono:

- trasformazione di protoplasti: I protoplasti insieme al DNA esogeno vengono lasciati incubare a temperatura ambiente per 15-30 minuti con polietilenglicole e CaCl₂; componenti che incrementano la permeabilità della membrana cellulare e favoriscono l'ingresso del vettore/DNA all'interno della cellula (Lagin *et al.*, 1990; Scherm *et al.*, 2011; Ruiz-Diez *et al.*, 2002).
- elettroporazione: metodo fisico che consente la trasformazione di protoplasti o di conidi in germinazione. I protoplasti/conidi sono sottoposti brevemente a un campo elettrico pulsante ad alta tensione che origina dei pori nella membrana cellulare facilitandone l'ingresso del DNA esogeno nel citoplasma. I micropori non causano gravi conseguenze alla cellula che in breve tempo reintegra la sua membrana cellulare (Chakraborty *et al.*, 1991).
- bombardamento biolistico: È stato introdotto da Klein *et al.* nel 1987 e successivamente adattato per la trasformazione di cellule fungine. Una microparticella di oro o tungsteno rivestita del DNA del vettore in cui è stato integrato il gene di interesse viene sparata nei tessuti fungini. Questo metodo è utilizzato soprattutto per

quei funghi in cui la produzione di protoplasti risulta essere particolarmente difficile anche per le scarse conoscenze riguardo la composizione della parete cellulare (Davidson *et al.*, 2000).

- *Agrotrasformazione*: Nel 1998 de Groot *et al.* hanno dimostrato con successo l'impiego di *Agrobacterium tumefaciens* nella trasformazione di funghi filamentosi (*Agrobacterium*-mediated transformation o AMT). Qualche anno dopo altri ricercatori hanno osservato la possibilità di applicare tale metodo anche per gli oomiceti e per la maggior parte dei funghi appartenenti alle classi Ascomycetes, Basidiomycetes, Zygomycetes tra i quali *Agaricus bisporus*, *Calonectria morganii*, *Fusarium circinatum* e *Helminthosporium turcicum* che difficilmente possono essere trasformati con i metodi convenzionali (Michielse *et al.*, 2005a). AMT è una tecnica di trasformazione relativamente semplice e molto efficiente in quanto è possibile ottenere un'elevata percentuale di trasformanti monocopia e può essere impiegata sia per mutagenesi mirata (sostituzione genica mediante ricombinazione omologa), da sola o in combinazione con i metodi convenzionali (NHEJ e TAGKO) (van Attikum *et al.*, 2001 e Adachi *et al.*, 2002), sia per mutagenesi inserzionale casuale (Combier *et al.*, 2003; Zeilenger *et al.*, 2004; Michielse *et al.*, 2005b).

Tuttavia esistono alcuni funghi recalcitranti a questo tipo di trasformazione quali ad esempio *Sclerotinia sclerotium* e *Aspergillus niger* dai quali non si sono ottenuti trasformanti o l'efficienza di trasformazione era troppo bassa (Rolland *et al.*, 2003; Michielse *et al.*, 2005a).

In questo progetto di dottorato è stata valutata l'efficacia del gene silencing, del gene knock-out mediante ricombinazione omologa e del transposon tagging nel background genetico di *F. culmorum*. Nei paragrafi successivi ho riportato schematicamente i principi base di ciascuna tecnica.

1.6.1 Gene silencing

Il primo meccanismo di silenziamento genico nei funghi filamentosi, conosciuto come "quelling" è stato scoperto da Romano e Macino nel 1992 in *Neurospora crassa*. Da allora *Neurospora crassa* è stato il principale modello di studio nei funghi filamentosi per la comprensione dei meccanismi di funzionamento dell'RNA interference (RNAi). In pianta tale fenomeno fu denominato "co-suppression" in quanto l'introduzione di un

transgene con lo scopo di ottenere un aumento dell'espressione di un determinato gene ha portato alla soppressione sia del transgene che del gene endogeno con conseguente riduzione dell'espressione genica (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990). Un caso analogo è stato osservato qualche anno più tardi anche nel nematode *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998). In un primo momento si pensava che l'RNA interference (RNAi) fosse solo un sistema di difesa della cellula da acidi nucleici esogeni ma in realtà svolge un ruolo ben più complesso nella biosintesi di molti RNA cellulari e in numerosi processi di regolazione dell'espressione genica sia a livello trascrizionale che post trascrizionale (Nakayashiki *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). L'inattivazione genica post trascrizionale è un processo altamente specifico mediato da RNAs a doppio filamento (dsRNAs), omologhi alla sequenza bersaglio, che vengono digeriti in frammenti di lunghezza minore di circa 21-25bp (sRNAs) da una endoribonucleasi chiamata DICER appartenente alla famiglia delle *RNAsiIII* (Bernstein *et al.*, 2001). Il breve frammento di dsRNA detto short interfering RNA (siRNA) viene incorporato da un complesso multiproteico e insieme formano il RISC (RNA-induced silencing complex). Solo il filamento *antisense* dell'siRNA rimane associato al complesso proteico RISC e funge da stampo per l'individuazione e degradazione dell'RNA messaggero (mRNA) complementare. L'mRNA messaggero viene tagliato in corrispondenza dei residui appaiati con i nucleotidi 10 e 11 dell'siRNA e successivamente degradato da esonucleasi mentre l'siRNA viene convertito in dsRNA grazie all'azione delle proteine RdRp (RNA-dependent RNA polimerasi) (Weld *et al.*, 2006; Hammond *et al.*, 2000; Hutvagner *et al.*, 2002).

E' stato recentemente dimostrato che inverted repeat transgene (IRT) sono degli efficienti attivatori di siRNA in diverse specie fungine. Presumibilmente, IRT produce hpRNA che viene digerito in siRNA da una *RNAsiIII*, attivando così il silenziamento dell'RNA di geni endogeni bersaglio che sono complementari alle sequenze contenute nel hpRNA (Hammond e Keller, 2005). L'IRT è costituita da una sequenza genica ripetuta montata in direzione senso e antisense (circa 500bp) interrotta da uno spaziatore di circa 250 bp (Goldoni *et al.*, 2004).

Nel 2005, ad opera di un gruppo di ricerca statunitense coordinato dalla Professoressa Nancy Keller, è stata dimostrata la possibilità di inibire la produzione di DON attraverso il silenziamento genico con IRT contenente la sequenza codificante del gene

regolatore *TRI6* di *Gibberella zeae* separata da un frammento del gene eterologo green fluorescent protein (*gfp*) sotto il controllo di un promotore costitutivo forte glicerolofosfatodeidrogenasi di *Aspergillus nidulans* (*gpdA*). Un approccio analogo è stato eseguito da noi su *F. culmorum* e i risultati, da poco pubblicati sulla rivista *Molecular Plant Pathology* (Scherm *et al.*, 2011), sono presentati nel capitolo successivo.

Il gene silencing, genericamente conosciuto come knock-down necessita di poche informazioni sulla sequenza del gene bersaglio ma causa solo una parziale riduzione dell'espressione genica rispetto al gene knock-out (Nakayashiki *et al.*, 2008).

1.6.2 Gene knock-out mediante ricombinazione omologa

Gene knock-out è una tecnica di mutagenesi inserzionale mirata che permette l'inattivazione del gene bersaglio mediante la sostituzione del gene wild-type con il gene che codifica un marker di selezione o con lo stesso gene ma mutato. La sostituzione può interessare anche la regione promotrice di un gene. Successive analisi fenotipiche dell'organismo mutato consentono di determinare la funzione del gene sostituito in quel determinato contesto genomico. Nei funghi filamentosi la sostituzione genica avviene mediante ricombinazione omologa e affinché la trasformazione vada a buon fine la sequenza omologa dovrebbe avere dimensioni di almeno 1 kb ma soprattutto dovrebbe presentare una altissima percentuale di omologia. Infatti con questo sistema non manca la formazione di falsi positivi (detti trasformanti ectopici) che si ottengono dall'integrazione di una porzione del costrutto (Zhang *et al.*, 2009). Il costrutto genico può essere realizzato mediante due strategie: overlap PCR (per esempio split marker recombination; Catlett *et al.*, 2003) o ligation-mediated PCR. Le dimensioni della sequenza omologa, il livello di omologia, il metodo di trasformazione adottato e la posizione nel genoma del gene bersaglio sono tra i principali fattori che influenzano l'efficacia del gene disruption o replacement (Weld *et al.*, 2006).

1.6.3 Transposon Tagging

La mutagenesi inserzionale mediante trasposoni (Transposon Tagging) è oggi possibile grazie alla scoperta di elementi trasponibili (TEs) attivi nel genoma di funghi filamentosi in grado di trasportare in sistemi eterologhi (Daboussi e Capy, 2003). Risale

al 1989 la prima identificazione di elementi trasponibili nei funghi e precisamente nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* (Boeke, 1989). La loro identificazione è stata possibile attraverso 4 diverse strategie: 1) Caratterizzazione di sequenze ripetute sparse nel genoma; 2) Inattivazione spontanea dei geni clonati; 3) Costruzione di oligonucleotidi degenerati dei domini conservati della trascrittasi inversa e della trasposasi; 4) Impiego di sonde eterologhe in esperimenti di ibridazione (de Lima Fávoro *et al.*, 2005). I TEs sono in grado di muoversi nel genoma e di inserirsi in nuove locazioni cromosomiche e vengono classificati in base alla modalità di trasposizione e alla loro struttura in tre classi (Finnegan, 1989).

La **classe I** comprende tutti gli elementi che traspongono mediante trascrizione inversa di un intermedio a RNA, sono perciò chiamati retrotrasposoni e traspongono secondo un meccanismo di “copia e incolla”. Questa classe può essere suddivisa in due sottoclassi: LTR (long terminal direct repeats) retroelements che hanno una struttura simile ai retrovirus e sono caratterizzati da una lunga sequenza terminale ripetuta di circa 334 bp (vi appartengono le famiglie *Ty3* e *Ty1/copia*) e i non-LTR che mancano di un promotore forte alle estremità e sono a loro volta distinti in LINEs (Long interspersed elements) e SINEs (short interspersed elements).

La **classe II** comprende tutti gli elementi che possiedono alle estremità 5' e 3' sequenze terminali ripetute e invertite, di lunghezza variabile a seconda dell'elemento (ITR), che traspongono mediante meccanismo di “taglia e incolla” da cromosoma a cromosoma. Le ITR codificano per la trasposasi, l'enzima necessario per la mobilità del trasposone nel genoma. Questa classe è suddivisa in due sottoclassi in funzione della presenza del dominio DDE (sottoclasse I) o della sua assenza (sottoclasse II). Il dominio proteico DDE svolge una funzione indispensabile per la catalisi della trasposasi (Capy *et al.*, 1997). Alla sottoclasse I appartiene la superfamiglia *Tcl/mariner* (probabilmente la più diffusa in natura Plasterk *et al.*, 1999) che a sua volta è suddivisa nelle famiglie *Tc1*, *mariner*, *Ant1* e *pogo* (Emmons *et al.*, 1983; Jacobson *et al.*, 1986; Robertson *et al.*, 2002). In genere sono lunghi 1.3–2.4 kb con ITR di circa 24-30 bp e si inseriscono in corrispondenza del dinucleotide TA che viene duplicato durante la loro reinserzione in differenti *loci* cromosomali. Gli elementi *Fot1* e *impala* sono tra i principali trasposoni ad essere annoverati in questa superfamiglia (Daboussi *et al.*, 1992; Hua-Van *et al.*, 1998; Daboussi e Capy, 2003).

Alla sottoclasse II appartengono le superfamiglie *hAT*, *Mutator* e *MITEs*.

La superfamiglia *hAT* comprende gli elementi *hobo* di *Drosophila*, *Ac* di mais e *Tam3* della bocca di leone che sono molto frequenti nei funghi (sia Ascomiceti che basidiomiceti). Alcune caratteristiche peculiari che li contraddistinguono sono le ITR corte, la duplicazione del sito di inserzione di 8 bp subterminali e l'omologia di sequenza nella regione C-terminale della trasposasi (Calvi *et al.*, 1991; Kempken *et al.*, 2001).

Nella superfamiglia *Mutator* è stato recentemente scoperto nel genoma di *F. oxysporum* l'elemento fungino *hop*; ciò ha suscitato grande interesse in quanto, prima, gli unici elementi facenti parte di questa superfamiglia erano stati riscontrati nelle piante, soprattutto nel mais (Chalvet *et al.*, 2003). Essi sono costituiti da ITR lunghe circa 200 bp e si contraddistinguono per la duplicazione di 9 bp durante la reinserzione (Daboussi e Capy, 2003). Infine la superfamiglia *MITEs* ("miniature inverted-repeat transposable elements") annovera elementi trasponibili di piccole dimensioni (100-500 bp) ma non autonomi in quanto sono privi del gene che codifica per la trasposasi. Inizialmente questi trasposoni sono stati isolati in piante e successivamente in una vasta gamma di organismi, funghi compresi (Bureau e Wessler, 1992; Casacuberta *et al.*, 1998; Yeadon e Catcheside, 1995). È stato dimostrato che questi elementi possono essere mobilizzati da fonti di trasposasi esogene appartenenti alla superfamiglia *Tc1-mariner* grazie alla similarità delle sequenze ripetute (ITR) (Feschottes *et al.*, 2002). Nel 2000 Hua-Van *et al.* hanno identificato in *F. oxysporum* l'elemento non autonomo *mimp1* che presenta sequenze ITR analoghe a quelle di *impala* (elemento trasponibile della superfamiglia *Tc1/mariner*).

Sulla base di queste informazioni è stato messo appunto un sistema di mutagenesi inserzionale a doppia componente *mimp1/impala* in *F. graminearum*, dove *mimp1* si reinseriva con una frequenza molto alta (83-91%), preferenzialmente all'interno o in prossimità di geni (Dufresne *et al.*, 2007; Dufresne *et al.*, 2008).

La tecnica del transposon tagging si basa sull'ottenimento di un fenotipo mutante a seguito dell'inserzione di un trasposone nella regione promotrice o nella regione codificante di un gene. Il DNA inserito, oltre a creare la mutazione, "etichetta" il gene di interesse permettendone una più facile identificazione (Zhang *et al.*, 2008). La conoscenza delle sequenze fiancheggianti il trasposone mediante approcci PCR (TAIL-PCR, iPCR, splinkerette-PCR) consentono di identificare il gene di interesse (Daboussi,

1996). Il principale vantaggio di questo metodo è che possono essere clonati geni la cui funzione non è nota e pertanto può essere considerato come un metodo efficace da utilizzare per il sequenziamento di genomi non ancora conosciuti. Idealmente sistemi di questo genere dovrebbero avere un'elevata efficienza di trasformazione che consenta la formazione di una cospicua libreria genica di trasformanti possibilmente monocopia, in altre parole che hanno inserito nel loro genoma solo una singola copia del costrutto di DNA esogeno. È necessario che siano monocopia per una più semplice identificazione del sito di reinserzione dell'elemento trasponibile. Inoltre i trasformanti ottenuti devono possedere un'elevata frequenza di escissione seguita da un'altrettanto efficiente meccanismo di reinserzione (Weld *et al.*, 2006).

2. Scopo del lavoro

Nel delineare quale è lo scopo del presente progetto di tesi di dottorato è bene sottolineare il motivo per cui abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul fungo ubiquitario *F. culmorum*. Innanzitutto, è uno dei più importanti patogeni dei cereali maggiormente presenti nei nostri areali ma, soprattutto, perché al momento attuale il genoma di *F. culmorum* è ancora in fase di sequenziamento. Sulla base dei dati finora ottenuti, il numero di geni presenti nel suo genoma è stimato superiore a 10.000, distribuiti su 5 cromosomi. Per esplorare il genoma di *F. culmorum* abbiamo deciso di seguire tre approcci complementari tra loro:

- Gene silencing: Attualmente nulla o molto poco si conosce circa i determinanti della patogenicità o al ruolo del deossinivalenolo sulla sua virulenza. La caratterizzazione dei geni implicati nel processo infettivo e nella produzione di micotossine è essenziale per lo sviluppo di nuovi metodi di lotta contro queste malattie, quali l'ottenimento di varietà di cereali resistenti, o la sintesi di nuove molecole target per lo sviluppo di fitofarmaci ad azione selettiva e a basso impatto ambientale in grado di inattivare il processo patogenico/micotossigenico o in grado di stimolare le reazioni di difesa della pianta ospite in programmi di lotta biologica. Duplice è stato il nostro obiettivo: primo saggiare l'efficacia di un IRT-*TRI6* di *F. culmorum* e, secondo, valutare se l'alterazione del pathway biosintetico dei tricoteceni avesse un effetto sull'aggressività del "mal del piede", malattia causata dal patogeno su semenzali di frumento duro.
- Gene knock-out: Il nostro scopo è stato quello di determinare i ruoli chiave in cui era coinvolto il gene *stuA* nel genoma di *F. culmorum*. Dalla letteratura si conosce che il gene *stuA* rappresenta un importante fattore di trascrizione fondamentale nel controllo e nella regolazione dei principali processi di sviluppo nei funghi ascomiceti. Il gene *stuA* contiene un dominio APSES di origine virale, specifico per i funghi, di circa 100 amminoacidi, altamente conservato e ha una struttura ad elica-ansa-elica. Dato il diverso ruolo svolto dal gene *stuA* in *F. graminearum* e *F. oxysporum* nel controllo della patogenicità, abbiamo inteso comprendere quale potesse essere la funzione di questo gene in un sistema di

patogenicità non ancora studiato, il marciume basale del colletto, e se fosse o meno in grado di regolarne la virulenza e la micotossigenicità.

- Transposon tagging: Questo approccio è reso possibile dalla scoperta di elementi trasponibili attivi nei funghi filamentosi da parte del gruppo di ricerca francese coordinato dalla Professoressa Marie-Josée Daboussi. Il nostro obiettivo è stato quello di valutare l'efficacia di un sistema di mutagenesi inserzionale a doppia componente basato sull'elemento trasponibile eterologo non autonomo *mimp1* di *F. oxysporum*, trans-mobilizzato da una fonte esogena di trasposasi (la trasposasi di *impala*). Questa scelta è stata dettata da una forte necessità di mettere a punto un metodo ad elevata efficienza (alto rendimento) per le analisi di genomica funzionale che permettano di caratterizzare geni coinvolti in differenti processi fisiologici e metabolici del fungo e di identificare regioni genomiche non ancora note.

CAPITOLO I

IL SILENZIAMENTO GENICO NEL FUNGO FILAMENTOSO *FUSARIUM CULMORUM*

3.1 SINTESI

Il gene *TRI6* è uno dei 12 geni localizzati all'interno del cluster *TRI* coinvolto nella produzione di enzimi catalitici impiegati durante i processi del pathway biosintetico dei tricoteceni. In particolare codifica una "zinc finger-type DNA-binding protein" e svolge un ruolo cruciale nella modulazione ed espressione del gene *TRI5* che regola il primo passaggio di biosintesi. Proprio per questo suo ruolo di gene regolatore e modulatore del gene *TRI5* abbiamo rivolto la nostra attenzione al suo silenziamento mediante l'impiego di un vettore basato su un "Inverted Repeat Transgene" (IRT) contenente il gene endogeno *TRI6* di *F. culmorum*. Il costrutto *TRI6*-IRT è costituito da due frammenti identici di circa 600 bp del gene *TRI6* di *F. culmorum* posizionati in orientamento invertito su entrambi i lati dello spaziatore. Lo spaziatore è un frammento del gene eterologo *green fluorescent protein (gfp)* approssimativamente di 300 bp, inserito tra il promotore costitutivo *gpdA* di *Aspergillus nidulans* e il terminatore fungino *trpC*. Un ceppo altamente virulento di *F. culmorum* (Mcf 21 wild-type) e un suo mutante (Mcf 21 nit1) per il gene della nitrato reductasi da esso derivato (*nia⁻*) sono stati trasformati con i plasmidi pLRM13 e pUCH2-8 in cotrasformazione di protoplasti fungini con polietilenglicole e CaCl₂. Il plasmide pLRM13 porta il costrutto *TRI6*-IRT, mentre pUCH2-8 contiene il gene di resistenza all'igromicina *hph* (hygromycin B phosphotransferase) come marker di selezione. Oltre 50 trasformanti igromicina-resistenti sono stati selezionati piastrandoli i protoplasti trasformati in Potato Dextrose Agar contenente 20% di saccarosio e 50 ppm di antibiotico (PDAS-H₅₀). Inizialmente sono state valutate le principali caratteristiche fisiologiche dei trasformanti (produzione di conidi, pigmentazione, crescita su diversi terreni) e 8 trasformanti *TRI6*-IRT ottenuti dal ceppo selvaggio Mcf 21 wild-type e 7 trasformanti *TRI6*-IRT ottenuti dal mutante *nia⁻* Mcf21 nit1 sono stati selezionati per le successive analisi. Il pattern di integrazione è stato analizzato mediante Southern blotting per controllare se i trasformanti avessero integrato nel loro genoma il costrutto *TRI6*-IRT o se presentassero eventi di ricombinazione omologa con parziale delezione del gene *TRI6* endogeno. Dall'analisi è risultato che solo in due casi c'è stata ricombinazione omologa con delezione parziale del gene endogeno, mentre nella maggior parte dei casi il costrutto *TRI6*-IRT si è integrato in una o più copie nel genoma, senza alterare la struttura del gene endogeno. L'espressione dei geni *TRI6* e *TRI5* è stata misurata mediante RT-PCR quantitativa e

nella maggior parte dei 18 trasformanti ottenuti si è osservato un intenso segnale di amplificazione, corrispondente ad uno smear di frammenti degradati del gene *TRI6*. Al contrario, l'espressione del gene *TRI5* è risultata diminuita in confronto ai ceppi non trasformati. Sorprendentemente, quattro cotrasformanti hanno dimostrato una espressione del gene *TRI5* significativamente aumentata. Questi risultati sono stati confermati anche dalle analisi northern blotting. Inoltre, a tale aumento è corrisposto un forte aumento (fino a 28 volte in più rispetto ai ceppi non trasformati) della produzione di deossinivalenolo (DON), misurata mediante analisi LC-MS presso l'Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR di Sassari. Le prove di patogenicità hanno dimostrato il ruolo del DON nel determinare la virulenza del fungo, con riduzioni dell'indice di malattia pari al 40-80% in 9 ceppi silenziati. Tale correlazione è stata osservata anche per i quattro ceppi iperproduttori di DON, i quali hanno avuto una aumentata virulenza nei confronti della pianta ospite. Questo studio, da poco pubblicato sulla rivista *Molecular Plant Pathology*, ha dimostrato per la prima volta che la tecnica di silenziamento genico è applicabile anche nel fungo *F. culmorum* e che il DON giuoca un ruolo fondamentale nel determinare la virulenza anche per quanto riguarda la fusariosi basale del frumento.

Altered trichothecene biosynthesis in *TRI6*-silenced transformants of *Fusarium culmorum* influences the severity of crown and foot rot on durum wheat seedlings

BARBARA SCHERM¹, MARCELLA ORRÙ¹, VIRGILIO BALMAS¹, FRANCESCA SPANU¹, EMANUELA AZARA², GIOVANNA DELOGU², THOMAS M. HAMMOND³, NANCY P. KELLER⁴ AND QUIRICO MIGHELI^{1*}

¹Dipartimento di Protezione delle Piante—Unità di ricerca Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Università degli Studi di Sassari, Via E. De Nicola 9, I-07100 Sassari, Italy

²CNR Istituto di Chimica Biomolecolare, Sezione di Sassari, Traversa La Crucca 3, Località Baldirca, Li Punti, I—07040 Sassari, Italy

³Division of Biological Sciences, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA

⁴Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA

SUMMARY

An RNA silencing construct was used to alter mycotoxin production in the plant pathogenic fungus *Fusarium culmorum*, the incitant of crown and foot rot on wheat. The transformation of a wild-type strain and its nitrate reductase-deficient mutant with inverted repeat transgenes (IRTs) containing sequences corresponding to the trichothecene regulatory gene *TRI6* was achieved using hygromycin B resistance as a selectable marker. Southern analysis revealed a variety of integration patterns of the *TRI6* IRT. One transformant underwent homologous recombination with deletion of the endogenous *TRI6* gene, whereas, in another transformant, the *TRI6* IRT was not integrated into the genome. The *TRI6* IRT did not alter the physiological characteristics, such as spore production, pigmentation or growth rate, on solid media. In most transformants, a high *TRI6* amplification signal was detected by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, corresponding to a *TRI6*-hybridizing smear of degraded fragments by Northern analysis, whereas *TRI5* expression decreased compared with the respective non-transformed strain. Four transformants showed increased *TRI5* expression, which was correlated with a dramatic (up to 28-fold) augmentation of deoxynivalenol production. Pathogenicity assays on durum wheat seedlings confirmed that impairment of deoxynivalenol production in the *TRI6* IRT transformants correlated with a loss of virulence, with decreased disease indices ranging from 40% to 80% in nine silenced strains, whereas the overproducing transformants displayed higher virulence compared with the wild-type.

INTRODUCTION

Fusarium culmorum (W.G. Smith) Sacc. is a major fungal pathogen of wheat, causing two forms of disease, namely crown and foot rot (CFR) and fusarium head blight (FHB) (Corazza *et al.*, 2002; Smiley and Patterson, 1996; Wagacha and Muthomi, 2007; Wiese, 1987). The severity of CFR incited by *F. culmorum* is usually greater in dry soils and is commonly associated with warm temperatures (Cariddi and Catalano, 1990). These conditions are dominant in central and southern Italy, where durum wheat is commonly grown. Disease symptoms may include seedling death before or soon after emergence, brown lesions on the stem base, tiller abortion and the formation of whiteheads, containing shrivelled grain or no grain at all. Consequently, significant yield losses are reported and the grain often becomes contaminated with mycotoxins.

Among the most bioactive compounds are trichothecenes, i.e. sesquiterpene epoxides, which are able to inhibit eukaryotic protein synthesis (Wei and McLaughlin, 1974) and may cause toxicoses in humans or animals consuming contaminated food or feed (Sudakin, 2003). Trichothecenes may also induce apoptosis (Desmond *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2000) and have been suggested to play an important role in the aggressiveness of phytopathogenic *Fusarium* species towards plant hosts (Bai *et al.*, 2002; Desjardins *et al.*, 1996, 2000; Harris *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 2005; Maier *et al.*, 2006; McCormick, 2003; Proctor *et al.*, 1995, 2002; Ward *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010).

Type B trichothecenes, produced mainly by *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch (anamorph: *Fusarium graminearum* Schwabe) and *F. culmorum*, are predominant in Europe. They include deoxynivalenol (DON), also known as vomitoxin, with its derivatives monoacetyldeoxynivalenols (3-AcDON, 15-AcDON), nivalenol

*Correspondence: Email: qmigheli@uniss.it

(NIV) and its acetylated form 4-acetylnivalenol or fusarenone X (Bottalico and Perrone, 2002; Goswami and Kistler, 2004).

CFR control is often difficult and mainly relies on preventative measures, such as crop rotation, the use of tolerant cultivars, burial of infested debris, reduced nitrogen fertilization and seed dressing with fungicides. However, the risk of residues and the potential for increased levels of mycotoxins in the grain under certain circumstances (Gardiner *et al.*, 2009) may limit their use.

The biosynthesis of trichothecenes starts with the formation of trichodiene via the cyclization of farnesyl pyrophosphate. Trichodiene then undergoes a series of oxygenation, cyclization, isomerization and esterification steps to yield bioactive trichothecenes, such as DON and acetylated DON (Desjardins *et al.*, 1993). At least 12 genes that encode enzymes catalysing most of these biosynthesis steps have been characterized and found to be located within a single core cluster in *G. zeae* and in the closely related species *Fusarium sporotrichioides* Sherb. (for reviews, see Alexander *et al.*, 2009; Proctor *et al.*, 2002).

TRI5, the first trichothecene biosynthetic gene identified in *F. sporotrichioides*, encodes the enzyme trichodiene synthase (Hohn and Beremand, 1989). In *G. zeae*, *TRI5* function was determined by transformation-mediated gene disruption experiments, resulting in mutants that were unable to carry out the first biosynthetic step and were incapable of producing DON or any of the trichothecene biosynthetic intermediates (Desjardins *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 2005; Maier *et al.*, 2006). These mutants were reduced in virulence when grown on wheat (Proctor *et al.*, 1995).

TRI6 encodes a Cys₂-His₂-type positive transcription factor that binds to the promoter regions of genes located in the core *TRI* cluster, as well as to *TRI1*, *TRI16* and *TRI101*, which are located outside of the *TRI* cluster (Alexander *et al.*, 2009). Thus, this gene plays a crucial role in regulating the expression of multiple biosynthetic genes, including *TRI5*, and can be regarded as a potential molecular target when developing resistant wheat lines or new molecules that could reduce trichothecene biosynthesis.

A possible approach to the downregulation of gene expression in fungi and other eukaryotic organisms in a sequence-specific manner utilizes RNA silencing (Catalanotto *et al.*, 2000; Cogoni and Macino, 1997; Denli and Hannon, 2003; Pickford and Cogoni, 2003; Waterhouse *et al.*, 2001). Specific inhibition of gene expression by RNA silencing has been demonstrated in several filamentous fungi, including *Neurospora crassa*, *Magnaporthe oryzae*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Ophiostoma* spp. and *Aspergillus* spp. (reviewed by Cogoni, 2001; Nakayashiki *et al.*, 2005; Nakayashiki and Nguyen, 2008). Inverted repeat transgenes (IRTs) containing sequences corresponding to the mycotoxin regulatory gene *TRI6* were first shown to inhibit DON production through RNA silencing in *G. zeae* (McDonald *et al.*, 2005).

The aims of this work were twofold: first, to test the efficacy of an RNA interfering construct based on IRT targeted at the trichothecene biosynthesis gene *TRI6* of *F. culmorum* and, second, to evaluate whether altered trichothecene biosynthesis by silenced transformants had an effect on the aggressiveness of this CFR-inducing pathogen towards durum wheat seedlings.

RESULTS

Preparation of *F. culmorum* transformants with the *TRI6* IRT

Co-transformation of MCF 21 wild-type and MCF 21 nit1 with the *TRI6* IRT silencing vector pLRM13 and the hygromycin-carrying plasmid pUCH2-8 resulted in over 50 hygromycin B-resistant transformants, among which eight and seven, respectively, were chosen for further analysis. Southern analysis with a *TRI6* probe revealed a variety of integration patterns of the *TRI6* IRT (Figs 1 and 2 and Supporting Information). These included no *TRI6* IRT integrations (i.e. # 282, where only the hygromycin B resistance-carrying vector pUCH2-8 was integrated) to multiple *TRI6* IRT integrations (i.e. # 111). However, many unpredicted bands were observed in our *NcoI*, *HindIII* and *EcoRI/XbaI* digests (Figs S1–S4, see Supporting Information). These can be explained by intermolecular recombination between IRTs during the transformation process. Using predictions based on such a model (Fig. S5, see Supporting Information), integration patterns were determined for the 15 transformants (Tables 1 and 2). Thus, transformants were found to have: (i) no IRT, (ii) an 'ideal' IRT, (iii) a promoter-bound IRT (i.e. containing the IRT between opposing *gpdA* promoter sequences), (iv) a terminator-bound IRT (i.e. containing the IRT between diverging *trpC* terminators) or any of the types of IRTs in various combinations (Table 1 and Supporting Information).

Gene expression in *TRI6* IRT *F. culmorum* transformants

Relative to control strains, *TRI6* amplification levels appeared to increase in most of the transformants (significantly higher for strains # 252, 260 and 106), except for # 282 (no pLRM13 integration) and # 260 (Figs 1C and 2C). Active silencing of *TRI6* should result in degradation of the *TRI6*-specific mRNA transcripts. During this process, truncated transcripts of several sizes are generated that may be detected by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) applications that usually amplify 100–150-bp-long fragments. Northern blots carried out with a 478-bp-long *TRI6* probe added further evidence to this hypothesis. Most strains revealed a *TRI6* smear

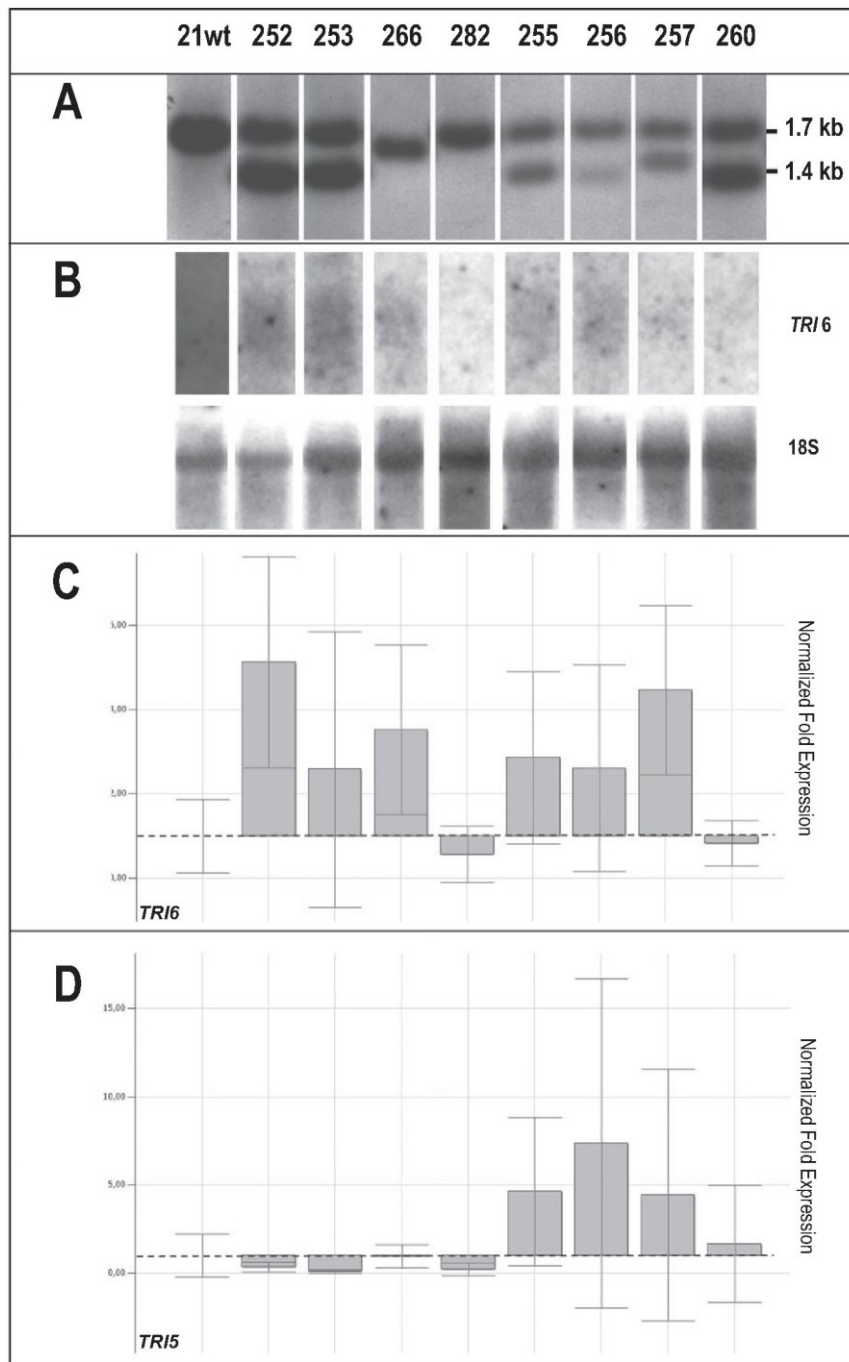


Fig. 1 Characterization and gene expression analysis of *Fusarium culmorum* MCF 21 wild-type (21 wt) and eight independent *TRI6* inverted repeat transgene (IRT) transformants (# 252, 253, 266, 282, 255, 256, 257, 260). (A) Southern blot analysis using the 'sense' *TRI6* IRT fragment of vector pLRM13 to probe *NcoI/HindIII*-digested genomic DNAs, resulting in a 1.7-kb band for the endogenous *TRI6* gene and a 1.4-kb band in the case of *TRI6* IRT integration. (B) Northern blot analysis of *TRI6* expression using a 478-bp-long PCR-amplified *TRI6*-specific probe and control hybridization with the 18S probe. (C, D) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) on expression of the *TRI6* gene (C) and the *TRI5* gene (D); normalization was achieved by comparing the expression of housekeeping genes β -tubulin and 18S; broken line indicates MCF21 21 wt expression level; all other values correspond to increased or decreased gene expression compared with the latter.

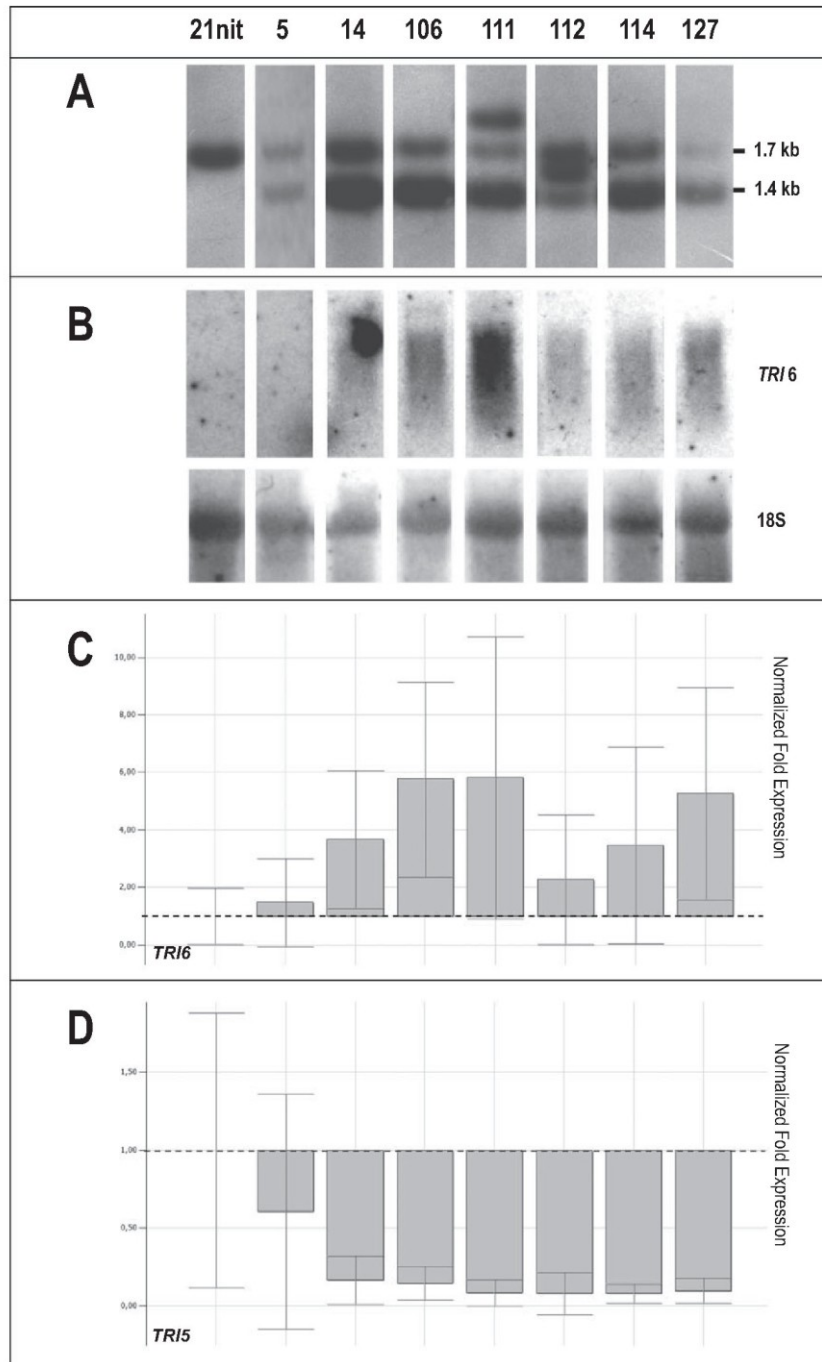


Fig. 2 Characterization and gene expression analysis of *Fusarium culmorum* MCF 21 nit1 (21 nit) and seven independent *TRI6* inverted repeat transgene (IRT) transformants (# 5, 14, 106, 111, 112, 114, 127). (A) Southern blot analysis using the 'sense' *TRI6* IRT fragment of vector pLRM13 to probe *NcoI/HindIII*-digested genomic DNAs, resulting in a 1.7-kb band for the endogenous *TRI6* gene and a 1.4-kb band in the case of *TRI6* IRT integration. (B) Northern blot analysis of *TRI6* expression using a 478-bp-long PCR-amplified *TRI6*-specific probe and control hybridization with the 18S probe. (C, D) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) on expression of the *TRI6* gene (C) and the *TRI5* gene (D). Normalization was achieved by comparing the expression of housekeeping genes β -tubulin and 18S; broken line indicates MCF21 21 nit 1 expression level; all other values correspond to increased or decreased gene expression compared with the latter.

Table 1 *Fusarium culmorum* MCF 21 wild-type and eight independent *TRIG* inverted repeat transgene (IRT) co-transformants. Section 1 contains data from Southern analysis, suggesting the presence of several IRT types which are defined here as follows: ideal IRT, a *TRIG* IRT expressed by a single promoter and bound by a single terminator; promoter-bound IRT, a terminator-less *TRIG* IRT driven by dual *gpdA* promoters; terminator-bound IRT, a promoter-less *TRIG* IRT bound on either side by *trpC* terminators. Section 2 shows the production of deoxynivalenol (DON) and its acetylated derivatives (3-AcDON and 15-AcDON) and the severity of foot and crown rot in durum wheat.

Strain	1					2			
	Ideal IRT	Promoter-bound IRT	Terminator-bound IRT	Various <i>TRIG</i> fragments	Northern <i>TRIG</i> smear	Total DON (ng/mL)*	Difference of means	Disease index (0–100)†	Difference of means
21 wt	0	0	0	0	No	878.1 ± 41.6		69.2 ± 4.5	
252	0	1	0	0	Yes	49.0 ± 22.0	–829.1	30.4 ± 6.7**†	–38.75
253	0	1	0	0	Yes	0	–878.1	44.6 ± 5.4**	–24.58
266	0	0	0	1§	Yes	27.6 ± 12.6	–850.5	37.1 ± 5.3**	–32.08
282	0	0	0	0	No	48.2 ± 21.6	–829.9	69.6 ± 5.1	0.42
255	1	0	0	0	Yes	12 783 ± 830**	11 905.0	97.9 ± 1.6**	28.75
256	1	0	0	0	Yes	24 341 ± 5400**	23 463.4	99.6 ± 0.4**	30.42
257	1	0	0	0	Yes	12 473 ± 3 231**	11 594.9	100**	30.83
260	0	0	1	0	No	12 008 ± 2 637**	11 129.7	98.3 ± 1.7**	29.17

*Pooled data from two independent experiments ($P = 0.468$) are expressed as the sum of DON and its acetylated derivatives (ng/mL of culture broth) ± mean SE after 2 weeks of growth in Vogel's medium.

†Pooled data from two independent experiments, carried out in 2008 and 2009 using wheat cultivars Prometeo and Solex, respectively ($P = 0.799$), are expressed as disease incidence (McKinney index 0–100; McKinney, 1923) ± mean SE 3 weeks after inoculation and sowing under glasshouse conditions.

‡Values in each column followed by two asterisks are significantly different from the MCF 21 wild-type control by Dunnett's test ($P < 0.001$).

§Transformant 266 represents an insertion of the IRT at the native *TRIG* locus.

Table 2 *Fusarium culmorum* MCF 21 nit1 and seven independent *TRIG* inverted repeat transgene (IRT) co-transformants. Section 1 contains data from Southern analysis, suggesting the presence of several IRT types which are defined here as follows: ideal IRT, a *TRIG* IRT expressed by a single promoter and bound by a single terminator; promoter-bound IRT, a terminator-less *TRIG* IRT driven by dual *gpdA* promoters; terminator-bound IRT, a promoter-less *TRIG* IRT bound on either side by *trpC* terminators. As a result of the complexity of the integration patterns, it was not always possible to predict the exact type and number of IRT (i.e. 0–1, 1–2). Section 2 shows the production of deoxynivalenol (DON) and its acetylated derivatives (3-AcDON and 15-AcDON) and the severity of foot and crown rot in durum wheat.

Strain	1					2			
	Ideal IRT	Promoter-bound IRT	Terminator-bound IRT	Various <i>TRIG</i> fragments	Northern <i>TRIG</i> smear	Total DON (ng/mL)*	Difference of means	Disease index (0–100)†	Difference of means
21 nit	0	0	0	0	No	898.1 ± 58.4		97.1 ± 1.9	
5	0	0	1	?	No	890.6 ± 34.8	–7.5	97.9 ± 2.1	0.83
14	0–1	2	2	?	Yes	0**†	–898.1	21.3 ± 4.9**	–75.75
106	1	1	2	0	Yes	0**	–898.1	33.3 ± 6.1**	–63.75
111	1	1	2	?	Yes	0**	–898.1	25.4 ± 3.2**	–71.67
112	0–1	0–1	0	1–2	Yes	96.1 ± 43.1**	–801.9	22.1 ± 7.6**	–75.00
114	1–2	0	0	0	Yes	0**	–898.1	40.4 ± 5.2**	–56.67
127	1–2	0	1–2	0	Yes	0**	–898.1	20.0 ± 5.3**	–77.08

*Pooled data from two independent experiments ($P = 0.171$) are expressed as the sum of DON and its acetylated derivatives (ng/mL of culture broth) ± mean SE after 2 weeks of growth in Vogel's medium.

†Pooled data from two independent experiments, carried out in 2008 and 2009 using wheat cultivars Prometeo and Solex, respectively ($P = 0.626$), are expressed as disease incidence (McKinney index 0–100; McKinney, 1923) ± mean SE 3 weeks after inoculation and sowing under glasshouse conditions.

‡Values in each column followed by two asterisks are significantly different from the MCF 21 nit1 control by Dunnett's test ($P < 0.001$).

whose intensity typically correlated with the qRT-PCR amplification signal (Figs 1B and 2B). In transformants # 282, 260 and 5, no hybridization signal was detected in Northern blots, correlating with their very low *TRIG* expression levels detected by qRT-PCR analysis.

Semi-quantitative RT-PCR with primers *TRIG*probeF1 and *TRIG*probeR2 (Table 3) gave rise to a faint amplification signal of

478 bp for all silenced transformants, except # 255, 256, 257 and 260, which presented a signal comparable with that shown by the reference strain MCF 21 wild-type (Fig. S6, see Supporting Information).

The effect of the *TRIG* silencing construct on the expression of *TRI5* was evaluated by qRT-PCR. The results were fairly congruent with the level of *TRIG* expression: transformants

Application	Primer sequence	Amplicon size (bp)
Vector construction		
TR16senseF- <i>NcoI</i> *	5'-CCTCCATGGTCGTGTTGCGTCTCCCGATCC-3'	570
TR16senseR- <i>AscI</i>	5'-GCAGGCGCGCCACCTGCTAAAGACCCTCAG-3'	
TR16antisenseF- <i>NotI</i>	5'-CTTTGATGCGGCCGCGTCTCCCGATCCTG-3'	570
TR16antisenseR- <i>BamHI</i>	5'-GCATGGGATCCACCCTGCTAAAGACCCTCAG-3'	
Real-time qRT-PCR		
TR15forb	5'-ACCCTCAATTCCTTCGTCGTATG-3'	141
TR15revb	5'-CCCAAACCATCCAGTTCTCCATC-3'	
TR16forb	5'-TTATCGCCCTCCACCTTAC-3'	90
TR16revb	5'-TAAAGTCCCGTCCGCTCTCAAAG-3'	
18Sforb	5'-TTGACCCGTTCCGGCACCTTAC-3'	75
18Srevb	5'-AAGTTTCAGCCTTGCACCATAC-3'	
tubfor	5'-TTCCAAATCACCACTCTC-3'	104
tubrev	5'-GAAAGTTGCCATCATACGG-3'	
Probes		
TR16probeF1	5'-GACTTTGACAACCTCCCCACAT-3'	478
TR16probeR2	5'-AGTGATCTCGCATGTTATCCAC-3'	
18S-Forward	5'-CCTTAACGAGGAACAATTGGAG-3'	514
18S-Reverse	5'-CCCTAGTCGGCATAGTTTATGG-3'	
Restriction analysis of <i>TRI4-TRI6-TRI5</i> cluster		
H-11 For4	5'-GTGAACTTCGCGGGCGTTACTC-3'	5408
H-11 Rev13	5'-TCCGGCTTGAAGGTCGTCAAAAT-3'	

*Restriction sites are given in italic.

252, 253, 266, 5, 14, 106, 111, 112, 114 and 127, which showed more or less strongly smeared *TRI6*-specific signals in Northern blots, showed correspondingly more or less decreased *TRI5* expression compared with the recipient strains MCF 21 wild-type and MCF 21 nit1, respectively (Figs 1D and 2D).

Transformants # 255, 256 and 257 revealed a completely different pattern, displaying a significantly increased *TRI5* expression compared with MCF 21 wild-type. Transformant # 260 showed almost the same level of *TRI6* expression as MCF 21 wild-type and a slightly, but not significantly, increased *TRI5* expression (Fig. 1D).

Production of trichothecenes *in vitro* by transformed *F. culmorum* strains

Based on a previous report by Boutigny *et al.* (2009), who demonstrated that strain MCF 21 wild-type is able to produce predominantly 3-AcDON and, to a lesser extent, DON when grown in liquid synthetic medium, we focused our high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) analysis on DON and its acetylated derivatives 3-AcDON and 15-AcDON. In a preliminary experiment, the average (mean of six replicates \pm SD) production of type B trichothecenes (ng/mL culture filtrate) by this strain was 212.6 \pm 74.2 DON, 523.0 \pm 98.9 3-AcDON and 16.3 \pm 3.9 15-AcDON after 14 days of growth in Vogel's medium at 25 °C. This pattern of distribution was confirmed in subsequent analyses.

Table 3 Primers used throughout this study.

In Tables 1 and 2, pooled data from two independent experiments carried out with MCF 21 wild-type-derived transformants, or with MCF 21 nit1-derived transformants (*P* values between two equivalent experiments of 0.468 and 0.171, respectively), are expressed as the sum of DON, 3-AcDON and 15-AcDON in ng/mL culture filtrate \pm SE. Regression was linear over the tested concentration range (5–250 ng/mL), with an average correlation coefficient *R*² of 0.9982 (\pm SD = 0.001), calculated from five calibration curves.

In MCF 21 wild-type-derived transformants # 252 and 253, the production of type B trichothecenes was reduced by 95% and 100%, respectively (Table 1). In transformants # 266 (homologous recombination with the endogenous *TRI6* gene) and 282 (no apparent *TRI6* IRT integration), type B trichothecene production was reduced to 3.1% and 5.4% with respect to the recipient strain. Interestingly, transformants # 255, 256, 257 and 260—which showed increased *TRI5* expression—produced 14–28-fold more trichothecenes than the MCF 21 wild-type strain, corresponding to average concentrations ranging from 12 008 \pm 2637 to 24 341 \pm 5400 ng/mL of culture filtrate (Table 1).

Among *TRI6* IRT transformants derived from the nitrate reductase mutant MCF 21 nit1, only transformant # 5 did not differ from the recipient strain for the production of type B trichothecenes, whereas, in transformant 112, trichothecene production was reduced by approximately 90% (Table 2). In all other *TRI6* IRT transformants (i.e. # 14, 106, 111, 114 and 127), the production of type B trichothecenes was completely suppressed (Table 2).

Virulence of *TRI6* IRT transformants on durum wheat

In order to ascertain whether altered trichothecene production by *TRI6* IRT transformants affected their virulence, inoculation on durum wheat was carried out with both MCF 21 wild-type- and MCF 21 nit1-derived transformants using two different cultivars (Prometeo and Solex; *P* values between two equivalent experiments of 0.799 and 0.626, respectively). Indeed, among the 15 transformants tested, only # 282 did not differ significantly from the recipient strain MCF 21 wild-type, despite a significant reduction in its DON production (Table 1), whereas # 5 produced the same amount of trichothecenes and displayed the same virulence as the nontransformed strain MCF 21 nit1 (Table 2). In all other transformants, significant changes (i.e. increase or decrease) in type B trichothecene production reflected corresponding differences in virulence (Tables 1 and 2).

DISCUSSION

Together with *F. graminearum* and *Fusarium avenaceum*, the plant pathogenic fungus *F. culmorum* is ranked among the three most important wheat head blight pathogens on a global scale (Wagacha and Muthomi, 2007). Although considerable efforts have been devoted by the research community to dissect the pathogenicity and mycotoxin production of *G. zeae* (Goswami and Kistler, 2004), the pathogenicity determinants of *F. culmorum* and the role played by trichothecenes in the severity of CFR disease on wheat by this pathogen are still poorly understood. Although DON is considered as an important virulence factor in *F. culmorum* head blight disease (McCormick, 2003; Wagacha and Muthomi, 2007), little is known of the role of DON in CFR. Therefore, the main objective of this work was to elucidate the relationship between DON production by *F. culmorum* and its aggressiveness towards durum wheat seedlings.

To suppress DON production through an RNA silencing approach in *F. culmorum*, we generated an RNA interfering construct targeted at the endogenous regulatory gene *TRI6*. This gene encodes a Cys₂-His₂-type transcription factor binding to the promoter DNA sequence motif TNAGGCCT of the trichodiene synthase-encoding gene *TRI5* (Hohn *et al.*, 1999). The same approach has been applied already to *G. zeae* by McDonald *et al.* (2005), who reported four *TRI6* IRT transformants with reduced DON production and decreased virulence on wheat heads.

In this study, which represents the first report of the suppression of gene expression via RNA silencing in *F. culmorum*, a series of *TRI6* IRT transformants was obtained from the highly virulent strain MCF 21 wild-type (syn. INRA 117) and its nitrate reductase-deficient mutant MCF 21 nit1.

The main achievement of this report is that, with only a few exceptions, a tight relationship exists between trichothecene production in culture and virulence on durum wheat seedlings.

This was demonstrated to hold true in both directions, i.e. most of the transformants with a reduced *TRI5* expression signal as measured by qRT-PCR also displayed reduced DON production and virulence, whereas four trichothecene-overproducing transformants showed increased *TRI5* signals in qRT-PCR experiments and significantly higher virulence on durum wheat compared with the recipient MCF 21 wild-type strain.

During the course of the experiments, the level of expression of the target gene appeared to be unpredictable: almost all the transformants displayed an apparently increased *TRI6* expression by both Northern analysis and qRT-PCR compared with the respective recipient strain. We interpreted this puzzling result as the accumulation of silencing IRTs consequent to the adoption of the constitutive promoter *gpdA*. Truncated transcripts of several sizes are generated by the silencing complex, before passing on to complete fragmentation and elimination from the cell. This assumption was substantiated by the appearance of a smeared hybridization signal in Northern blots. Silenced RNAs may act as a substrate for qRT-PCR, given the small size—i.e. 90 bp—of the expected amplicon, hence the appearance of an increased level of *TRI6*-specific amplification in the transformants compared with the recipient strain. Indeed, RT-PCR experiments targeted at a 478-bp amplicon showed a fainter signal in most silenced transformants compared with the MCF 21 wild-type (see Supporting Information). Moreover, in most MCF 21 nit1-derived transformants, stronger *TRI6*-hybridizing smears and *TRI6*-specific amplification signals corresponded to a reduced expression of the trichodiene synthase gene *TRI5*, suggesting that *TRI6* silencing and subsequent *TRI5* suppression indeed occurred.

Among the MCF 21 wild-type-derived transformants, four strains were unexpectedly obtained with significantly increased *TRI5* expression. These strains were able to produce an impressively large amount of DON (i.e. 14–28-fold more than that of the wild-type strain, corresponding to 12–24 µg/mL of culture filtrate). We first speculated that the *gpdA* promoter used in the *TRI6* IRT could have recombined with the endogenous *TRI6* locus, generating a series of *gpdA-TRI6* recombinant strains. However, Southern analysis with a *TRI6* probe and comparative restriction analysis of the *TRI4-TRI6-TRI5* locus (see Supporting Information) confirmed that the endogenous *TRI6* locus was intact. These superproducing transformants are now being analysed at the proteome level, as the *gpdA* promoter could have recombined with a new positive regulatory gene, possibly suggesting alternative avenues in the regulation of trichothecene biosynthetic genes.

An additional finding of Southern analysis was that recombination between IRTs may occur quite frequently on integration into the *F. culmorum* genome. The silenced strains displayed a promoter-bound IRT, a terminator-bound IRT or an 'ideal' IRT with additional undetermined IRT fragments. Surprisingly, the overexpressing transformants appear to be among the simplest

integrations, showing evidence for only one IRT. Moreover, the level of silencing did not correlate with the copy number of the IRT construct integrated into the genome: MCF 21 nit1-derived transformants having integrated single or multiple copies of pLMR13 showed similarly reduced *TRI5* expression levels and DON production. In one case (transformant # 5), *TRI6* IRT integration did not generate any apparent modification in type B trichothecene biosynthesis. This is not surprising, as the same situation has been reported with *Ophiostoma floccosum* by Tanguay *et al.* (2006) and *Aspergillus fumigatus* by Henry *et al.* (2007), who highlighted the disadvantages of the RNA silencing approach compared with classical gene disruption by gene replacement. Thus, in the present work, we show, for the first time, that a functional RNA silencing pathway may be active in the phytopathogenic fungus *F. culmorum*, but, at the same time, we provide evidence for unpredictable patterns of IRT integration and silencing efficiency.

Our results demonstrate that, together with pectolytic enzymes (Aleandri *et al.*, 2007; Kang and Buchenauer, 2002), type B trichothecenes play an important role as virulence factors in the CFR disease of durum wheat caused by *F. culmorum*, thus confirming this biosynthetic pathway as a suitable molecular target for the development of new CFR control tools. Modulation of the accumulation of trichothecenes in the plant tissues opens up new perspectives for the development of cereal varieties at reduced 'mycotoxin risk', through the action of plant endogenous compounds (Boutigny *et al.*, 2008), or by delivering gene-targeted RNA silencing triggers into the host plant (McDonald *et al.*, 2005). Alternatively, a biocontrol approach could be envisaged that uses silenced atoxigenic mutants with low or null virulence. The latter strategy has been applied successfully to control aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* through competitive exclusion by atoxigenic isolates (Cotty *et al.*, 2007).

Indubitably, before a biocontrol approach can be conceived, a thorough risk assessment is needed to ensure the stability of the integrated silencing construct and to avoid the possibility of unwanted recombination events involving the constitutive promoter, the *TRI* locus or other regulatory genes acting on the *TRI* cluster. Although our experiments were carried out in the laboratory or in contained facilities, the unpredictable generation of superproducing transformants opens up a new scenario for the definition of a biosafety paradigm in silencing experiments.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains and culture conditions

Fungal spores were obtained from: (i) a highly virulent strain of *F. culmorum* (W.G. Smith) Sacc. (strain ISPaVe MCF 21 wild-type; syn. strain INRA 117), isolated in 1989 from triticale grown in Foggia, Apulia, southern Italy; (ii) its nitrate reductase-deficient

mutant MCF 21 nit1; and (iii) transformants derived by growing in a medium containing Campbell's V8 Vegetable juice (Giobbe *et al.*, 2007) for 7 days at 25 °C with agitation (150 rpm). Cultures were filtered and conidia were collected by centrifugation. Spores were then resuspended in 10% glycerol at 10⁶/mL and stored at -80 °C until needed.

In liquid culture, strain MCF 21 produces predominantly 3-AcDON and, to a lesser extent, DON (Boutigny *et al.*, 2009). To monitor the production of DON, 3-AcDON and 15-AcDON, and the expression of *TRI5* and *TRI6* genes, each strain was used to inoculate 8 mL of Vogel's medium (Vogel, 1956) with spore suspensions to achieve a final concentration of 10⁴ conidia/mL. Fungal liquid cultures were incubated in the dark at 25 °C by gentle shaking at 30 rpm. Cultures were performed in triplicate and each experiment was repeated at least twice. Cultures were sampled after 7 days of incubation for RT-PCR and qRT-PCR (mycelium) and after 14 days for HPLC-MS analysis (filtrates).

Construction of the silencing vector

The primers used in vector construction are listed in Table 3. A 570-bp fragment of the *TRI6* gene of *F. culmorum* (GenBank accession number AF480836) was amplified from genomic DNA, using a forward primer containing a *Nco*I site (*TRI6*senseF-*Nco*I) and a reverse primer containing an *Asc*I site (*TRI6*senseR-*Asc*I). The PCR product was digested and ligated into the *Nco*I/*Asc*I sites of pTMH44.2 (McDonald *et al.*, 2005) to produce pTRM20. A similar *TRI6* fragment of 570 bp was amplified by PCR, using a forward primer containing a *Not*I site (*TRI6*antisenseF-*Not*I) and a reverse primer containing a *Bam*HI site (*TRI6*antisenseR-*Bam*HI). This PCR product was digested and ligated in reverse orientation into the *Not*I/*Bam*HI sites in pTRM20 to obtain pLRM13 (Fig. 3).

Transformation experiments

Fungal protoplasts were isolated from germinated microconidia. For this purpose, 10–12 plates containing potato dextrose agar (PDA), covered with a sheet of sterile cellophane, were each inoculated with 10⁶ conidia of *F. culmorum* MCF 21 wild-type or MCF 21 nit1, and incubated at 25 °C for 16–18 h. Young thalli were then harvested with a sterile spatula and transferred into 20 mL of digestion solution consisting of 1.2 M MgSO₄, pH 5.8, containing 10 mg/mL of lysing enzymes (L1492, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After 3–3.5 h of incubation at room temperature and shaking at about 50 rpm, protoplasts were purified according to Langin *et al.* (1990) and then co-transformed with 10 µg of the silencing vector pLRM13 and 10 µg of the hygromycin B resistance-carrying vector pUCH2-8 (Alexander *et al.*, 1998) as described by Hua-Van *et al.* (2001). Aliquots of 50 µL of the transformation mixture were transferred into 4–5 mL of

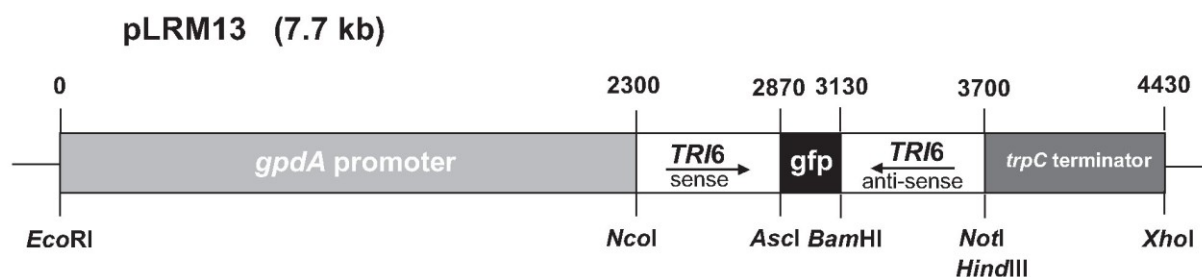


Fig. 3 Schematic representation of *Fusarium culmorum* *TRI6* inverted repeat transgene (IRT) construct. Light grey, *gpdA* promoter of *Aspergillus nidulans*; dark grey, *trpC* terminator of *A. nidulans*; black, *gfp* spacer element. A 570-bp fragment of the *F. culmorum* *TRI6* gene was placed in sense and antisense directions on the two sides of the *gfp* spacer element in the vector pTMH44.2, generating vector pLRM13.

preheated (37 °C) top agar [7.3 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgSO_4 , 6.5 mM KCl, 36 μM FeSO_4 , 23.5 mM NaNO_3 , 2% (w/v) glucose, 0.8% (w/v) technical agar] and plated onto Petri dishes containing PDAS H50 medium [potato dextrose agar containing 20% (w/v) sucrose and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hygromycin B]. After incubation at 25 °C for 5–7 days, hygromycin B-resistant transformants were selected for the integration of pUCH2-8 and purified by monospore culturing, followed by Southern blot analysis to control the correctness of pLRM13 integration events.

Southern analysis of transformants

Selection for hygromycin B-resistant co-transformants carrying the pLRM13 vector was performed by Southern blot analysis. Genomic DNA was purified from lyophilized mycelium by a mini-prep method described previously (Migheli *et al.*, 1996). Ten micrograms of genomic DNA were digested with 50 U each of *Hind*III, *Nco*I, *Nco*I/*Hind*III and *Eco*RI/*Xba*I (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) at 37 °C for 15–18 h, separated by 1.0% agarose gel electrophoresis and transferred onto nylon membranes (Hybond-N, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) using a vacuum blotter (Vacuum Blotter Model 785, Bio-Rad Laboratories, Milan, Italy) according to standard procedures (Sambrook *et al.*, 1989).

The blots were then hybridized with a 570-bp probe, complementary to the *TRI6* sense fragment of the vector pLRM13. One microgram of pLRM13 (Fig. 3) was digested with 20 U each of *Ascl* and *Nco*I in a volume of 100 μL at 37 °C for 3 h; digested DNA was precipitated and then loaded onto a 2.0% agarose gel. The 570-bp DNA band was recovered with a sterile scalpel directly from the gel, followed by a silica column-based purification step using the Jet Quick Gel extraction spin kit (Genomed GmbH, Löhne, Germany). Labelling, hybridization and detection reactions were carried out with the Gene Images Random Prime Labelling® and Gene Images CDP Star Detection® modules (Amersham Biosciences Europe GmbH, C. Monzese, Italy), as described in the manufacturer's protocols. Briefly, the modules

work with a chemiluminescent signal, incorporating F1-dUTP molecules in the future probe by a PCR approach. After this labelling step, the DNA probe was applied in an overnight hybridization step at 55–60 °C. Following stringency washes and blocking of nonspecific sites on the membrane, the chemiluminescent signal was activated with an alkaline phosphatase conjugate after incubation with the CDP Star detection substrate. The membranes were exposed to X-ray radiographic films at room temperature for 1–2 h and then developed.

Sequencing and restriction analysis of the *TRI4–TRI6–TRI5* locus in *F. culmorum*

To evaluate whether the endogenous *TRI6* locus could be affected by the integration of the silencing vector, the 7.6-kb region spanning the complete *TRI4–TRI6–TRI5* genes in the *F. culmorum* MCF 21 nit1 strain was sequenced by a PCR-based approach. Fifteen primer pairs generating overlapping amplicons of 500–700 bp in this region were designed based on the *G. zeae* H-11 *TRI* locus (GenBank accession number AF336366). PCR was carried out as follows: 1 \times Platinum® *Pfx* DNA Polymerase amplification buffer (Invitrogen, Invitrogen S.R.L., San Giuliano Milanese (MI), Italy), 1 mM MgSO_4 , 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 0.5 μM of forward and reverse primers, 1.0 U of Platinum® *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen) and 300 ng of template DNA were mixed in a final volume of 50 μL and denatured at 95 °C for 3 min, followed by 32 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 45 s and elongation at 68 °C for 1 min, concluded by a final elongation step at 68 °C for 7 min.

Amplification products were examined on agarose gel for their integrity and specificity, purified and then sent for sequencing to BMR Genomics srl (Padua, Italy). Every amplification product was sequenced in both forward and reverse directions. Quality control of the single sequences and their assembly to the complete sequence were carried out with Sequence Scanner v1.0 and CLC Sequence Viewer 6 software. GenBank accession number: BankIT 1344398, HM131844 (Fig. S7, see Supporting Information).

A comparative restriction analysis of the 5.4-kb region, including the final stretch of the *TRI4* gene, the complete *TRI6* gene, the initial stretch of the *TRI5* gene and the two intergenic regions comprised between them, was carried out with the *F. culmorum* MCF 21 wild-type, MCF 21 nit1 and 15 derived IRT transformants. The 5.4-kb region was amplified with the primers H-11For4 and H-11Rev13 (Table 3) applying the Expand Long Template PCR System Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) following the manufacturer's protocol. The following restriction enzyme combinations were tested: *HindIII*, *NcoI*, *HindIII/NcoI*, and *EcoRI/XbaI* (New England Biolabs).

RNA purification and cDNA synthesis

Total RNA was extracted using the PureLink™ Micro-to-Midi total RNA purification system (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions for RNA purification from plant tissue. A DNase treatment to remove genomic DNA contamination from the samples was performed using the 'RQ1 RNase-freeDNase' (Promega, Madison, WI, USA). The concentration of RNA was determined spectrophotometrically using GeneQuant (Amersham Biosciences). For cDNA synthesis, 0.5 µg of RNA were retrotranscribed with the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories). The cDNA was either used directly for real-time qRT-PCR or stored at 4 °C.

qRT-PCR analysis

The ICycler iQ system coupled to the SYBR® Green Kit (Bio-Rad Laboratories) was used for qRT-PCR. The real-time qRT-PCR efficiencies were determined for each gene by measuring C_T to a specific threshold (Walker, 2002) for five serial 1 : 2 dilutions of the *F. culmorum* strain MCF 21 wild-type cDNA. Primers applied for the amplification of *TRI5*, *TRI6*, 18S rRNA and β -tubulin in the qRT-PCR approach had efficiencies of 98.7%, 96.0%, 90.7% and 96.4%, respectively. The specificity of each primer set was examined and the amplification of a specific transcript was confirmed by the appearance of a single peak in the melting curve analysis following completion of the amplification reaction. The relative level of expression of each gene of interest (C_T) was then normalized against the relative gene expression level of the RNA coding for the reference genes β -tubulin and 18S rRNA determined in each sample ($\Delta\Delta C_T$).

Primers (Table 3) were designed using the software Molecular Beacon (Bio-Rad Laboratories). Primers used for the amplification of *TRI5* (*TRI5forb/TRI5revb*) and *TRI6* (*TRI6forb/TRI6revb*) were derived from conserved regions in *F. culmorum* (GenBank accession numbers AY130291 and AF480836). Primers used for the amplification of the 18S rRNA gene (*18Sforb/18Srevb*) were derived from *G. zeae* (accession number AB250414). Primers used for the amplification of the β -tubulin gene (*tubfor/tubrev*) were derived from *F. culmorum* (accession number EU490256).

The reaction mixtures contained 1 µL of cDNA diluted 1 : 10 (=2.5 ng), 1 µL of each primer (400 nM), 12.5 µL of iQ™ SYBR® Green Supermix and 9.5 µL of Milli-Q H₂O in a final volume of 25 µL.

In all the experiments, appropriate negative controls containing no template were subjected to the same procedure to exclude or detect any possible contamination or carry-over. Each sample was amplified three times for each experiment and all the experiments were repeated at least twice. The programme used included one step at 95 °C for 3 min, and 40 cycles consisting of 95 °C for 10 s and 60 °C for 30 s, followed by gradual heating (0.5 °C every 30 s) from 50 to 85 °C in order to generate the melting curve.

RT-PCR analysis

In a semi-quantitative approach, the cDNA of MCF 21 wild-type and 15 *TRI6* IRT transformants was subjected to RT-PCR analysis, applying primers spanning almost the entire *TRI6* gene (*TRI6probeF1/TRI6probeR2*; Table 3). One-hundred nanograms of cDNA of each sample were amplified in a reaction volume of 50 µL with 1 × TopTaq™ DNA Polymerase amplification buffer (Qiagen, Qiagen S.p.A., Milan, Italy), 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM of forward and reverse primers and 2.0 U of TopTaq™ DNA Polymerase (Qiagen). Different numbers of amplification cycles were tested to ascertain that the PCR products did not represent a saturated signal in the following gel electrophoresis. Samples were denatured at 95 °C for 3 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 48 °C for 45 s and elongation at 72 °C for 1 min, with a final elongation step at 72 °C for 7 min. For all samples, a control reaction was carried out with 18S primers (*18S-Forward/18S-Reverse*; Table 3).

Northern analysis

For Northern blot hybridization experiments, mycelia of strains MCF 21 wild-type and derived transformants # 252, 253, 255, 256, 257, 260, 266 and 282, as well as MCF 21 nit1 and derived transformants # 5, 14, 106, 111, 112, 114 and 127, were harvested after 7 days of growth in Vogel's medium, as described previously, flash-frozen by dipping in liquid nitrogen, ground to a fine powder and total RNAs were isolated according to the guanidinium-thiocyanate/phenol method (Chomczynski and Sacchi, 1987). Twenty micrograms of total RNA of each sample to be tested were separated on a 1.2% formaldehyde gel and transferred onto nylon membranes (Hybond-N, Amersham Biosciences) using a vacuum blotter (Vacuum Blotter Model 785, Bio-Rad Laboratories) according to standard procedures (Sambrook *et al.*, 1989).

Expression levels of the *TRI6* gene were detected for all strains by hybridization with a *TRI6*-specific probe (478 bp). In addition,

a control hybridization was carried out with an 18S rRNA probe to evaluate the basal quantity and quality of the RNA signal. DNA fragments for the future probes were amplified by PCR on the cDNA template of MCF 21 wild-type strain applying the following primers: TRI6probeF1/TRI6probeR2, 18S-Forward/18S-Reverse (Table 3). Labelling, hybridization and detection reactions were carried out with the Gene Images Random Prime Labelling® and Gene Images CDP Star Detection® modules (Amersham Biosciences), as described previously.

HPLC-MS analysis of trichothecenes

Standard mixtures including NIV, DON, 15-AcDON and 3-AcDON were obtained from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). The samples (8 mL) were extracted with 5 mL of ethyl acetate. After centrifugation, the organic phase was evaporated to dryness and redissolved in 1 mL of LC-MS mobile phase. An Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) 1100 series LC-MSD, equipped with a diode-array detector and an autosampler, was used for LC separation. Chromatographic separation was achieved using a Luna C18 column (150 mm × 2.1 mm, 3 µm; Phenomenex, Castelmaggiore (BO), Italy) fitted with a C18 security guard cartridge. The column temperature was maintained at 40 °C. The mobile phase consisted of Eluent A (water with 0.01% acetic acid) and Eluent B (acetonitrile). The separation was performed in a run time of 20 min under gradient conditions with a flow rate of 0.4 mL/min. MS detection was performed using an Agilent (Palo Alto, CA, USA) G1946 (MSD 1100) single-stage quadrupole instrument equipped with an electrospray atmospheric pressure ionization source. To construct standard curves, stock solutions of B-trichothecene were prepared by dissolution in the standard mixture of 10 mL of acetonitrile (final concentration, 1000 ng/mL). Working solutions of GE-B5 were prepared daily by diluting aliquots of stock solutions with the solvent system (Eluent A), and were used to spike samples. Six different concentrations of B-trichothecene (5, 10, 25, 50, 100 and 250 ng/mL) were obtained by adding appropriate concentrations of working solutions to the solvent system.

Data are reported as mean values ± SE of three biological replications. Trichothecene yields (sum of DON and its acetylated derivatives 3-AcDON and 15-AcDON) are expressed as ng/mL of culture filtrate. The data were subjected to one-way analysis of variance, followed by multiple comparison by Dunnett's test, using Minitab® for Windows release 12.1.

Pathogenicity assay

A monospore culture of each *F. culmorum* strain was grown on PDA (Difco, Detroit, MI, USA) at 25 °C with a photoperiod of 12 h for 7 days. Plugs (1.2 cm in diameter) of PDA colonized by the fungus were cut with a sterile cork borer and used as inoculum.

One plug was placed in the centre of a plastic sowing pot (diameter, 4.5 cm; capacity, 55 mL) containing sterilized (121 °C for 60 min on two successive days) potting mix (Humin-Substrat N17, Neuhaus, Germany). One seed of durum wheat (*Triticum durum* cvs. Prometeo or Solex, kindly provided by Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali, CRA-QCE, Rome, Italy) was placed onto each PDA plug and covered by sterilized soil. For each treatment, three replicates (10 seeds for each replicate) were used. Pots were watered daily and the average temperature was 25 °C (minimum, 15 °C; maximum, 35 °C). Seedling emergence was checked every 7 days for 3 weeks. After the last survey, the plant height and disease severity were evaluated. The severity of disease was calculated using the McKinney index (McKinney, 1923), which expresses the percentage of the maximum severity of disease (i.e. 100) according to the formula: $I = [\sum(c \times f)/n \times N] \times 100$, where c is the disease class, f is the frequency, n is the number of observations and N is the highest value of the empirical scale adopted, estimating the severity of symptoms on the stem. Five classes were set: class 0, healthy stem; class 1, mild browning on the stem; class 2, browning on one half of the stem; class 3, complete browning of the stem; class 4, plant death after emergence or plant not emerged in comparison with the emergence of the uninoculated control treatment.

Each experiment was repeated at least twice. The data were subjected to one-way analysis of variance, followed by multiple comparison by Dunnett's test, using Minitab® for Windows release 12.1.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Ministry of University and Research (PRIN 2007: Transposon tagging and RNA silencing in the wheat pathogen *F. culmorum*). MO acknowledges receipt of a fellowship from Regione Autonoma della Sardegna (Borse di Ricerca destinate a giovani ricercatori. Legge Regionale 7 agosto 2007, n. 7 'Promozione della ricerca scientifica e dell'innovazione tecnologica in Sardegna'). This work was also partially funded by the University of Wisconsin Graduate School (Hatch Funds) and the US Department of Agriculture under Agreement no. 59-0790-3-081 through a cooperative project with the US Wheat & Barley Scab Initiative to NPK and TMH. The authors wish to thank Corrado Di Mauro for assisting in statistical analysis, and Lane Milde and Tami McDonald for help in vector construction.

REFERENCES

- Aleandri, M.P., Magro, P. and Chilosi, G. (2007) Modulation of host pH during the wheat–*Fusarium culmorum* interaction and its influence on the production and activity of pectolytic enzymes. *Plant Pathol.* **56**, 517–525.
- Alexander, N.J., Hohn, T.M. and McCormick, S.P. (1998) The *Tri111* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P-450 monooxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 221–225.

- Alexander, N.J., Proctor, R.H. and McCormick, S.P. (2009) Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Rev.* **28**, 198–215.
- Bai, G.H., Desjardins, A.E. and Plattner, R.D. (2002) Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia*, **15**, 91–98.
- Bottalico, A. and Perrone, G. (2002) Toxicogenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**, 611–624.
- Boutigny, A.L., Richard-Forget, F. and Barreau, C. (2008) Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *Eur. J. Plant Pathol.* **121**, 411–423.
- Boutigny, A.L., Barreau, C., Atanasova-Penichon, V., Verdal-Bonnin, M.N., Pinson-Gadais, L. and Richard-Forget, F. (2009) Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and *Tri* gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycol. Res.* **113**, 746–753.
- Cariddi, C. and Catalano, M. (1990) Water stress and *Fusarium culmorum* infections on durum wheat. *Phytopathol. Mediterr.* **29**, 51–55.
- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G. and Cogoni, C. (2000) Transcription: gene silencing in worms and fungi. *Nature*, **404**, 245.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 56–59.
- Cogoni, C. (2001) Homology-dependent gene silencing mechanisms in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 381–406.
- Cogoni, C. and Macino, G. (1997) Conservation of transgene-induced post-transcriptional gene silencing in plants and fungi. *Trends Plant Sci.* **2**, 438–443.
- Corazza, L., Balmes, V., Santori, A., Vitale, S., Luongo, L. and Maccaroni, M. (2002) Head blight and foot rot of wheat in Italy. *Petria*, **12**, 25–36.
- Cotty, P.J., Antilla, L. and Wakelyn, P.J. (2007) Competitive exclusion of aflatoxin producers: farmer driven research and development. In: *Biological Control: A Global Perspective* (Vincent, C., Goettel, M.S. and Lazarovits, G., eds), pp. 241–253. Wallingford, Oxfordshire: CAB.
- Denli, A.M. and Hannon, G.J. (2003) RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 196–201.
- Desjardins, A.E., Hohn, T.M. and McCormick, S.P. (1993) Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiol. Rev.* **57**, 596–604.
- Desjardins, A.E., Proctor, R.H., Bai, G., McCormick, S.P., Shaner, G., Buechley, G. and Hohn, T.M. (1996) Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **9**, 775–781.
- Desjardins, A.E., Bai, G., Plattner, R.D. and Proctor, R.H. (2000) Analysis of aberrant virulence of *Gibberella zeae* following transformation-mediated complementation of a trichothecene-deficient (*TRI5*) mutant. *Microbiology*, **146**, 2059–2068.
- Desmond, O.J., Manners, J.M., Stephens, A.E., Maclean, D.J., Schenk, P.M., Gardiner, D.M., Munn, A.L. and Kazan, K. (2008) The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 435–445.
- Gardiner, D.M., Kazan, K. and Manners, J.M. (2009) Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* **46**, 604–613.
- Giobbe, S., Marceddu, S., Scherm, B., Zara, G., Mazzarello, V., Budroni, M. and Migheli, Q. (2007) The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *FEMS Yeast Res.* **7**, 1389–1398.
- Goswami, R.S. and Kistler, H.C. (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol.* **5**, 515–525.
- Harris, L.J., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Nicholson, P., Butler, G., Young, J.C., Weston, G., Proctor, R.H. and Hohn, T.M. (1999) Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Dis.* **83**, 954–960.
- Henry, C., Mounya, I. and Latgé, J.P. (2007) Testing the efficacy of RNA interference constructs in *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Genet.* **51**, 277–284.
- Hohn, T.M. and Beremand, P. (1989) Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene*, **79**, 131–138.
- Hohn, T.M., Krishna, R. and Proctor, R.H. (1999) Characterization of a transcriptional activator controlling trichothecene toxin biosynthesis. *Fungal Genet. Biol.* **26**, 224–235.
- Hua-Van, A., Pamphile, J.A., Langin, T. and Daboussi, M.J. (2001) Transposition of autonomous and engineered *impala* transposons in *Fusarium oxysporum* and a related species. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 724–731.
- Jansen, C., von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.H., Felk, A. and Maier, F.J. (2005) Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 16892–16897.
- Kang, Z. and Buchenauer, H. (2002) Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**, 653–660.
- Langin, T., Daboussi, M.J., Gerlinger, C. and Brygoo, Y. (1990) Influence of biological parameters and gene transfer technique on transformation of *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* **17**, 313–319.
- Maier, F.J., Miedaner, T., Haderl, B., Felk, A., Salomon, S., Lemmens, M., Kassner, H. and Schäfer, W. (2006) Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (*Tri5*) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Mol. Plant Pathol.* **7**, 449–461.
- McCormick, S.P. (2003) The role of DON in pathogenicity. In: *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley* (Leonard, K.J. and Bushnell, W.R., eds), pp. 165–183. St. Paul, MN: APS Press.
- McDonald, T., Brown, D., Keller, N.P. and Hammond, T.M. (2005) RNA silencing of mycotoxin production in *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **18**, 539–545.
- McKinney, H.H. (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J. Agric. Res.* **26**, 195–217.
- Migheli, Q., Friard, O., Del Tedesco, D., Musso, M.R. and Gullino, M.L. (1996) Stability of transformed antagonistic *Fusarium oxysporum* strains *in vitro* and in soil microcosms. *Mol. Ecol.* **5**, 641–649.
- Nakayashiki, H., Hanada, S., Nguyen, B.Q., Kadotani, N., Tosa, Y. and Mayama, S. (2005) RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genet. Biol.* **42**, 275–283.
- Nakayashiki, H. and Nguyen, Q.B. (2008) RNA interference: roles in fungal biology. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 494–502.
- Pickford, A.S. and Cogoni, C. (2003) RNA-mediated gene silencing. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 871–882.
- Proctor, R.H., Hohn, T.M., McCormick, S.P. and Desjardins, A.E. (1995) Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene biosynthetic gene. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **8**, 593–601.
- Proctor, R.H., Desjardins, A.E., McCormick, S.P., Plattner, N.J., Alexander, N.J. and Brown, D.W. (2002) Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**, 691–698.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Smiley, R.W. and Patterson, L.M. (1996) Pathogenic fungi associated with *Fusarium* foot rot of winter wheat in the semiarid Pacific Northwest. *Plant Dis.* **80**, 944–949.
- Sudakin, D.L. (2003) Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicol. Lett.* **143**, 97–107.
- Tanguay, P., Bozza, S. and Breuil, C. (2006) Assessing RNAi frequency and efficiency in *Ophiostoma floccosum* and *O. piceae*. *Fungal Genet. Biol.* **43**, 804–812.
- Vogel, H.J. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microb. Genet. Bull.* **13**, 42–43.
- Wagacha, J.M. and Muthomi, J.W. (2007) *Fusarium culmorum*: infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Prot.* **26**, 877–885.

- Walker, N.J. (2002) A technique whose time has come. *Science*, **296**, 557–559.
- Ward, T.J., Clear, R.M., Rooney, A.P., O'Donnell, K., Gaba, D., Patrick, S., Starkey, D.E., Gilbert, J., Geiser, D.M. and Nowicki, T.W. (2008) An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 473–484.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B. and Lough, T. (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, **411**, 834–842.
- Wei, C.M. and McLaughlin, C.S. (1974) Structure–function relationship in the 12,13-epoxytrichothecenes. Novel inhibitors of protein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **57**, 838–844.
- Wiese, M.V. (1987) *Compendium of Wheat Diseases*. St. Paul, MN: APS Press.
- Yang, G.H., Jarvis, B.B., Chung, Y.J. and Pestka, J.J. (2000) Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p8 MAPK, and SAPK/JNK activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **164**, 149–160.
- Zhang, H., Zhang, Z., van der Lee, T., Chen, W.Q., Xu, J., Xu, J.S., Yang, L., Yu, D., Waalwijk, C. and Feng, J. (2010) Population genetic analyses of *Fusarium asiaticum* populations from barley suggest a recent shift favoring 3ADON producers in southern China. *Phytopathology*, **100**, 328–336.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Southern hybridization analysis of *Fusarium culmorum* MCf 21 wild-type (wt), MCf 21 nit1 (nit) and 15 *TRI6* inverted repeat transgene (IRT) transformants using the 'sense' *TRI6* IRT fragment of vector pLRM13 to probe *Hind*III-digested genomic DNAs; selected molecular weights of the 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen) indicate the range of the band pattern.

Fig. S2 Southern hybridization analysis of *Fusarium culmorum* MCf 21 wild-type (wt), MCf 21 nit1 (nit) and 15 *TRI6* inverted repeat transgene (IRT) transformants using the 'sense' *TRI6* IRT fragment of vector pLRM13 to probe *Nco*I-digested genomic DNAs; selected molecular weights of the 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen) indicate the range of the band pattern.

Fig. S3 Southern hybridization analysis of *Fusarium culmorum* MCf 21 wild-type (wt), MCf 21 nit1 (nit) and 15 *TRI6* inverted repeat transgene (IRT) transformants using the 'sense' *TRI6* IRT fragment of vector pLRM13 to probe *Hind*III/*Nco*I-digested genomic DNAs; selected molecular weights of the 1 kb

plus DNA ladder (Invitrogen) indicate the range of the band pattern.

Fig. S4 Southern hybridization analysis of *Fusarium culmorum* MCf 21 wild-type (wt), MCf 21 nit1 (nit) and 15 *TRI6* inverted repeat transgene (IRT) transformants using the 'sense' *TRI6* IRT fragment of vector pLRM13 to probe *Eco*RI/*Xba*I-digested genomic DNAs; selected molecular weights of the 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen) indicate the range of the band pattern.

Fig. S5 Plasmid pLRM13 recombination model. (A) pLRM13. (B) Recombination could occur between two molecules of pLRM13. One possibility is that the plasmids recombine in *Fusarium culmorum* before integration into the genome. A theoretical break point between the forward *TRI6* fragment in one plasmid and the reverse *TRI6* fragment in another plasmid is shown. (C) Expected product after recombination as proposed in (B). The distances between the restriction enzymes of the recombined plasmids allow for band DNA fragment sizes consistent with many of the transformants analysed in this study. Depending on how the recombined plasmid integrates into the genome, a transformant could end up with a 'promoter-bound' inverted repeat transgene (IRT) (left) or a 'terminator-bound' IRT (right). Broken lines represent additional plasmid sequences.

Fig. S6 Analysis of *TRI6* gene expression by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. cDNA of *Fusarium culmorum* MCf 21 wild-type and of 15 *TRI6* inverted repeat transgene (IRT) transformants was amplified with the primer pair *TRI6*probeF1/*TRI6*probeR2 (Table 3). Samples were denatured at 95 °C for 3 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 48 °C for 45 s and elongation at 72 °C for 1 min; final elongation was at 72 °C for 7 min. A control reaction was carried out with 18S primers (18S-Forward/18S-Reverse; Table 3).

Fig. S7 Alignment of sequences of the *TRI4–TRI6–TRI5* locus for *Fusarium culmorum* MCf 21 wild-type (HM131844) and *Gibberella zeae* H-11 (AF336366).

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

CAPITOLO II
IL RUOLO DEL GENE *STUA* NELLE PRINCIPALI ATTIVITÀ FISIOLOGICHE E
METABOLICHE DEL FUNGO FITOPATOGENO *FUSARIUM CULMORUM*

4.1 Sintesi

In questo progetto abbiamo scelto come gene bersaglio il gene *stuA* in quanto è un importante fattore di trascrizione fondamentale nel controllo dei principali processi di sviluppo nei funghi ascomiceti. Contiene un dominio APSES di origine virale, caratterizzato da una struttura ad elica-ansa-elica, specifico per i funghi, altamente conservato di circa 100 amminoacidi. In *F. graminearum* e *F. oxysporum*, due funghi che dalla recente analisi del genoma hanno rivelato circa l'80 % di regioni sinteniche ad alta identità di sequenza, la delezione del gene *stuA* ha portato a differenti comportamenti nel controllo dei meccanismi di patogenicità. Infatti in *F. graminearum* la delezione del gene ha portato alla mancata comparsa di sintomi nelle spighe inoculate con il ceppo mutato, mentre in *F. oxysporum* i mutanti non hanno ridotto la loro aggressività e virulenza. Pertanto, ci siamo interessati a conoscere quale sia il ruolo del gene *stuA* nel regolare la virulenza e i processi infettivi e di colonizzazione nella malattia del “mal del piede” e quale sia la sua funzione nelle principali attività metaboliche del fungo *F. culmorum*.

La delezione del gene *stuA* è stata realizzata mediante split-marker recombination in due ceppi wild-type: il ceppo *F. culmorum* Fc UK99 produttore di deossinivalenolo e il ceppo lussemburghese *F. culmorum* Fc 233 B precedentemente caratterizzato come incapace di produrre tossina *in vitro*.

In totale sono stati ottenuti 18 trasformanti dal ceppo Fc UK99 e 2 dal ceppo Fc 233 B. Nei mutanti è stata soppressa l'espressione del gene *stuA* per inserzione della cassetta igromicina. Analisi PCR hanno evidenziato che su 20 trasformanti ottenuti solo 3 erano ectopici, ossia, presentavano resistenza all'igromicina ma avevano il gene *stuA* funzionante e mostravano fenotipo analogo a quello del rispettivo ceppo wild-type. L'analisi Southern condotta su 11 trasformanti ha confermato i risultati ottenuti dalle analisi PCR.

Successivamente, le prove di patogenicità allestite in serra con semenzali di frumento duro hanno consentito di dimostrare che in *F. culmorum*, così come in *F. graminearum* il gene *stuA* svolge un ruolo importante nel regolare i meccanismi di patogenicità e nel modularne l'aggressività. Infatti le cariossidi cresciute a contatto con il micelio dei mutanti *stuA* non hanno mostrato alcuna sintomatologia mentre quelle a contatto con i ceppi ectopici, come atteso, hanno fatto registrare dati analoghi ai rispettivi wild-type.

L'ipotesi che l'interruzione del gene *stuA* potesse danneggiare in qualche modo la capacità patogena del fungo *F. culmorum* è stata rafforzata dalla sua scarsa abilità nel colonizzare tessuti vegetali di differente consistenza e natura quali mela, patata e pomodoro.

L'interruzione del gene *stuA* nel contesto genomico del fungo *F. culmorum* non ha influenzato esclusivamente i meccanismi di patogenicità e virulenza, ma ha portato anche a una serie di cambiamenti fenotipici e morfologici. Rispetto al ceppo selvaggio e al trasformatante ectopico nei mutanti *FcstuA* i conidi si sono sviluppati direttamente dalle ife invece che da rami coniofori monofialidici, mostrando quindi un'alterazione della conidiogenesi. Inoltre abbiamo riscontrato una ridotta idrofobicità del micelio, caratterizzato da una struttura poco robusta con ife esili e contorte, e una ridotta sporificazione associata a un minor numero di spore in germinazione. Nei mutanti ottenuti dal ceppo FcUK99 la produzione di tossine *in vitro* era significativamente ridotta. Molto interessante è stata la valutazione dell'attività enzimatica delle poligalatturonasi, enzimi pectolitici prodotti dal fungo patogeno durante le prime fasi di infezione della pianta ospite. È stata una stima di tipo qualitativo, ma ha perfettamente indicato che il gene *stuA* non è coinvolto nel controllo dei meccanismi di degradazione della matrice pectica, suggerendo che la diminuzione di patogenicità non è legata al controllo delle pectinasi.

FCSTUA FROM *FUSARIUM CULMORUM* CONTROLS WHEAT CROWN ROT IN A TOXIN AND PECTOLYTIC ENZYME SECRETION INDEPENDENT MANNER

*Pasquali¹ M., *Spanu² F., Scherm² B., Balmas² V., Hoffman¹ L., Migheli² Q.

¹CRP - Gabriel Lippmann, 41, rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg.

²Dipartimento di Protezione delle Piante - Unità di ricerca Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Università degli Studi di Sassari, Via E. De Nicola 9, I-07100 Sassari, Italy.

*The first two authors have equally contributed to the present work.

ABSTRACT

Fusarium culmorum is one of the most harmful pathogen of durum wheat, causal agent of the crown and foot rot (CFR) disease. It produces deoxynivalenol that is involved in pathogenic mechanism. The role of *FcstuA*, a *stuA* ortholog protein with a APSES domain having 99% of homology to the *FgstuA* protein, was determined by functional characterization of deletion mutants obtained from two *F. culmorum* wild-type strains, FcUK99 (a highly pathogenic deoxynivalenol producer) and Fc233B (unable to produce toxin with a mild pathogenic behaviour). *FcStuA* mutants originating from both strains showed common phenotypic characters including stunted vegetative growth, loss of hydrophobicity of mycelium, altered pigmentation on solid medium, higher sensitivity to oxidative stress, absence of conidiophores with reduced conidiation, delayed germination patterns and complete loss of pathogenicity. Toxin production in mutants from FcUK99 strain was significantly decreased *in vitro* (20 times factor). Both set of mutants showed their inability to colonise different plant tissues (apple, potato and tomato). No differences between mutants and ectopic and wild-type strains were observed in relation to pectolytic enzymes secretion suggesting that this set of enzymes is not controlled by *FcstuA*. It is argued that possible mechanisms determining $\Delta FcstuA$ in the mutants inability to cause crown rot in wheat include sensitivity to oxidative stress and impairment of germination process.

Key-words: filamentous fungi, pathogenicity, metabolic/functional traits, deoxynivalenol, APSES proteins, transcription factor

INTRODUCTION

In ascomycete fungi, APSES proteins are an important class of transcription factors involved in the control of the main developmental processes and in the regulation of cell-cycle. All members that belong to the APSES protein have a ~100-residue sequence-specific basic helix-loop-helix DNA-binding domain (Miller *et al.*, 1991; Dutton *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997; Massari and Murre, 2000). APSES proteins are similar to viral KIL-N-domains having probably a viral origin due to an ancestral infection of a fungal cell (Iyer *et al.*, 2002). *Asm-1* (*Neurospora crassa*; Aramayo *et al.*, 1996), *Phd1p* and *Sok2p* (*Saccharomyces cerevisiae*; Gimeno and Fink, 1994), *Efg1p* and *Efh1p* (*Candida albicans*; Stoldt *et al.*, 1997) *StuAp* (*Aspergillus nidulans*; Wu and

Miller, 1997) are the main identified genes belonging to APSES proteins. In *S. cerevisiae* and in *C. albicans* *Phd1p*, *Sok2p* and *Efg1p*, *Efh1p* regulate genetic physiological and biochemical mechanisms responsible to dimorphic transition (Gimeno and Fink, 1994; Ward *et al.*, 1995; Merson-Davies and Odds, 1992). *Asm-1* controls sexual and asexual reproduction. In general *stuA* homologous regulate sporulation mechanisms, cellular differentiation, morphogenetic processes, mycelial growth, virulence of organisms but their role changes according to fungal species.

Fusarium crown and root rot together with fusarium head blight are two diseases of complex etiology caused by soil-borne fungi such as *F. culmorum*, *F. graminearum* and *F. pseudograminearum* (Beccari *et al.*, 2011).

F. culmorum is an important cereal pathogen widespread and able to produce mycotoxin which are dangerous to humans and animals (Beccari *et al.*, 2011; Wagacha and Muthomi, 2007; Wang *et al.*, 2006). The main mycotoxins produced belong to type B trichothecenes. Chemically, the trichothecenes are sesquiterpenoid compounds able to inhibit protein synthesis in eukariotic cells and induce apoptosis (McMullen *et al.*, 2003; Sudakin, 2003; Maras *et al.*, 1984; Desmond *et al.*, 2008). Moreover the trichothecenes may play an important role during infection of plant host (Hohn and Desjardins, 1992; Harris *et al.*, 1999; Proctor *et al.*, 1995; Maier *et al.*, 2006). Mudge *et al.* (2006) and Beccari *et al.* (2011) have shown that deoxynivalenol (DON) plays a role during infection and colonization of stem base and seedling root.

Recently, the analysis conducted by confocal laser scanner microscopy (CLSM) showed the infection processes and mechanisms of penetration by *F. culmorum* in root rot and crown rot diseases. Initially, the fungal hyphae follow an apoplastic intercellular pathway and then colonize the cortex by a simplastic intercellular pathway. Nevertheless *F. culmorum* doesn't penetrate into the stele of roots. Instead section analysis of the stem showed that *F. culmorum* penetrates through the stomata of the leaf sheaths that wrap around the stem base as already observed in the coleoptile by Malalasekera *et al.* in 1973 (Beccari *et al.*, 2011). Knowledge on pathogenicity factors in *F. culmorum* is limited, therefore it is worth studying the effect of potential key regulators in its genome. It has been shown that DON production play an important role in crown rot symptoms (Scherm *et al.*, 2011). Here we identified and characterized the role of *FcStuA* in *F. culmorum* trying to understand its role in foot and crown rot pathogenicity, in the biosynthesis of pectolytic enzymes such as polygalacturonase and in the metabolic or morphological processes.

MATERIALS AND METHODS

Strains and culture conditions

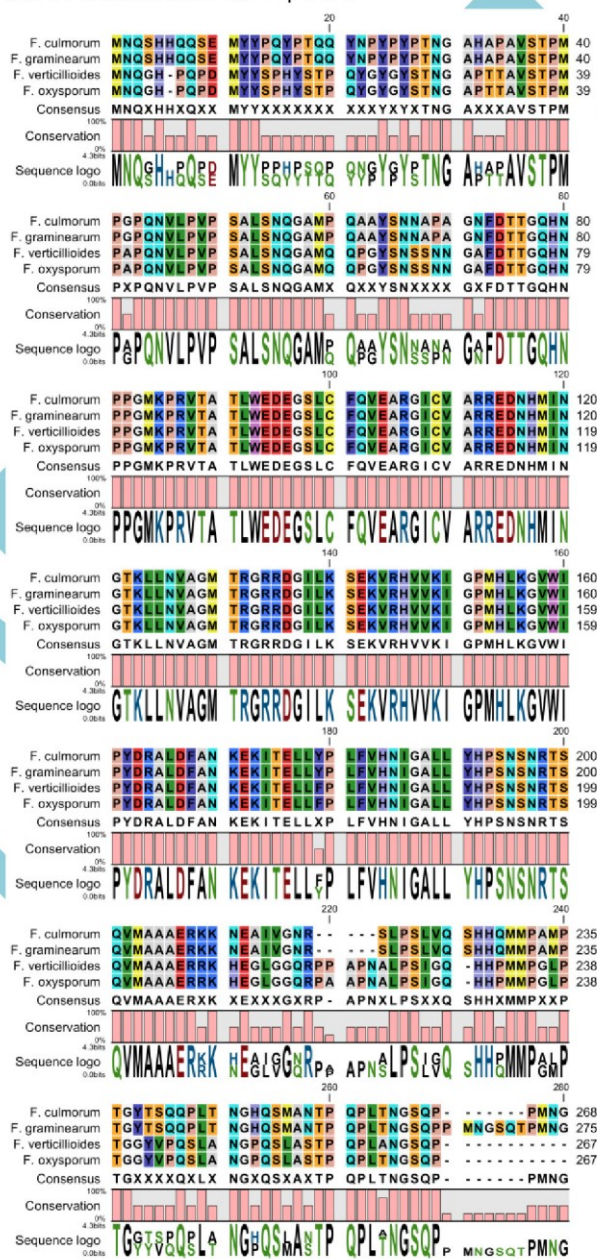
Transformation experiments were conducted with two *F. culmorum* wild-type strains: FcUK99 (Rothamsted Research, UK), a DON-producer; and Fc233B (Centre de Recherche Publique Gabriel Lippmann, Luxembourg), previously characterized as being unable to produce toxin *in vitro* (Pasquali *et al.*, unpublished). Toxin production in Fc233B strain was verified according to the analytical procedure described in Giraud *et al.* (2010) in media derived from Jiao *et al.* (2008), (sugar source saccharose) and from Gardiner *et al.* (2009).

Morphological characterization of wild-type and mutant strains was carried out on potato dextrose agar (PDA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); synthetic low-nutrient agar medium (SNA, Nirenberg, 1990) in weight/volume consisting of: 0.1% KH₂PO₄, 0.1% KNO₃, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.05% KCl, 0.02% glucose, 0.02% sucrose, and 2% agar; carboxy-methyl cellulose liquid medium (CMC; Cappellini and Peterson, 1965), Czapek-Dox broth (C1551; Sigma-Aldrich). Lyophilised mycelium for DNA extraction was obtained by growing fungi in liquid complete medium (CM; Correll *et al.*, 1987). For polygalacturonase (PG) activity induction the Szécsi medium was used (Szécsi, 1990): NH₄H₂PO₄ 0.09%(w/v), (NH₄)₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, KCl 0.05%, pectin ICN 1%. Cup plate analysis (100 mM acetate buffer pH 4.0, 0.5% polygalacturonic acid, 0.8% agarose; Taylor and Secor, 1998) was performed to evaluate polygalacturonase expression.

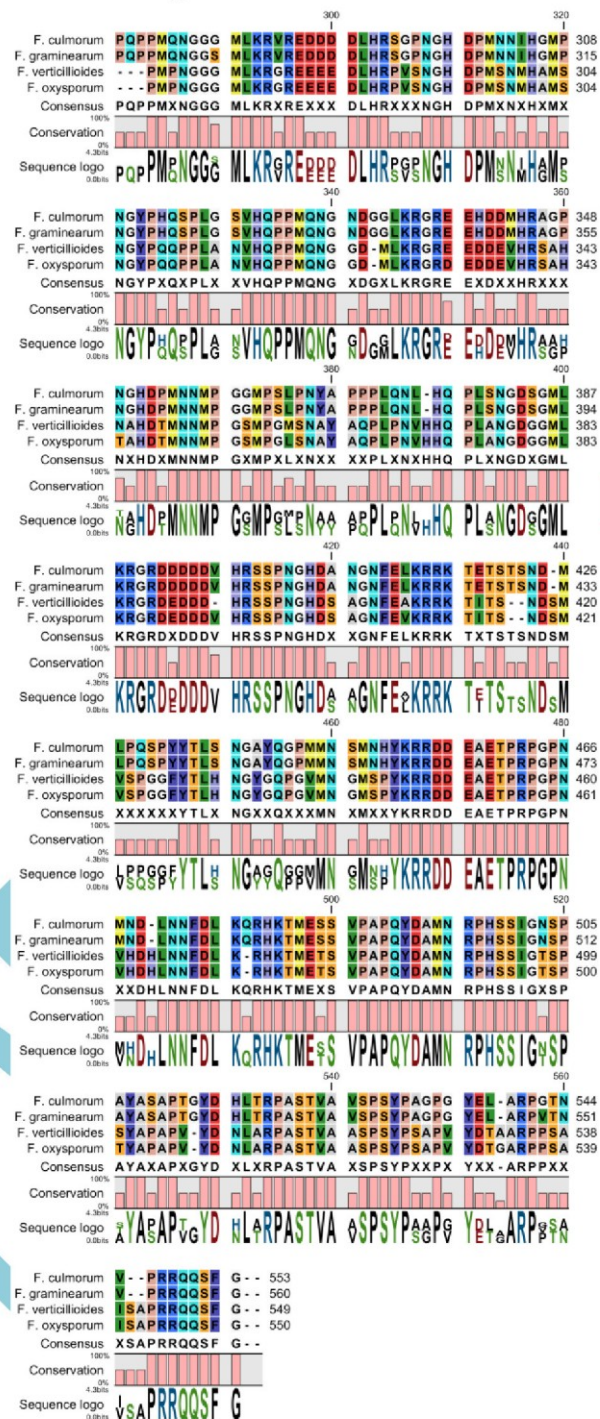
Split-Marker Recombination and collection of *Fcstua* mutants

Conserved region of the *stuA* gene in the three species of *Fusarium* so far sequenced (*F. graminearum* PH-1, *Fusarium oxysporum* 4287 and *Fusarium verticillioides* 7600) were identified by Muscle alignments search performed using the CLC Main Workbench v 6.01 software (CLC bio Aarhus, Denmark) aligning both DNA sequences and protein derived sequences (**Figure1**). The primers were designed by the same software to obtain the corresponding *stuA* gene sequence in *F. culmorum*. The upstream gene region was obtained from the sequencing project of *F. culmorum* (kindly provided by professor Kim Hammond-Kosack Rothamsted Research, UK). Split-marker recombination (Catlett *et al.*, 2003) was used for *Fcstua* deletion in FcUK99 and in Fc233B (**Figure 2**) using primers listed in **Table 1**.

Figure1: Muscle alignment of *Fcstua* protein sequence. Homologous gene from *F. graminearum*, *F. oxysporum* and *F. verticillioides* are reported.



Continued of Figure 1



Fungal protoplasts were obtained from macroconidia germinated on PDA. Typically, 12-14 plates of PDA medium were overlaid with a disk of sterile cellophane (model 583 Gel Dryer; Bio-Rad Hercules, CA, USA) and inoculated with 10^6 conidia of *F. culmorum* FcUK99 or Fc233B and incubated at 25°C for about 16-18 hours. Then, the young mycelium was scraped from the cellophane surface using a sterile spatula and transferred into 2 Petri dishes (90 Ø) each one containing 10 mL of lysis solution consisting in 10 mg/mL of Lysing enzymes (L1492, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in $MgSO_4$ 1.2 M (pH 5.8).

After 3-4 hours of incubation at room temperature and slow (50-60 rpm) agitation the protoplasts were purified according to Langin *et al.* (1990) and used directly in fungal transformation essentially as described by Breakspear *et al.* (2011).

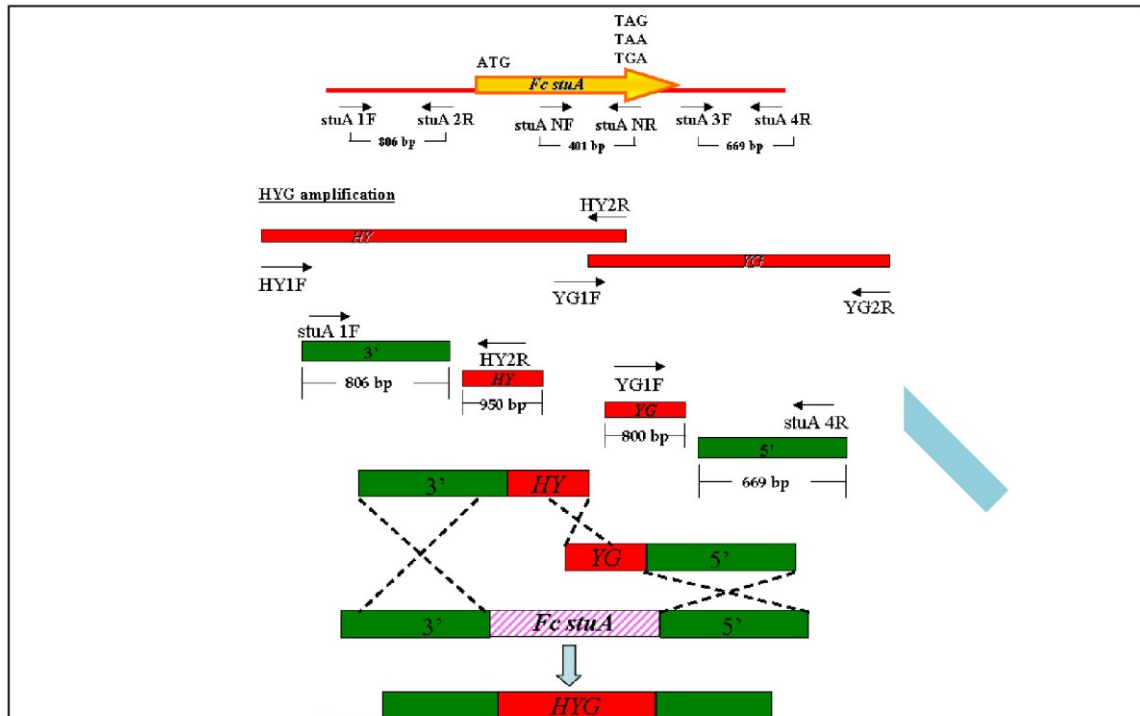


Figure 2: *FcstuA* gene deletion scheme: black arrows indicate primers used for split marker recombination (scheme modified from Catlet *et al.*, 2003).

Identification of *FcstuA* deletion mutants

To verify whether in the 20 transformants obtained from *F. culmorum* strains FcUK99 and Fc233B *FcstuA* was correctly deleted by the *hph* gene, which confers resistance to hygromycin B, a screening on selective medium (PDA amended with 200 µg/mL of hygromycin B) was performed. Monosporic transformants were further checked by direct specific PCR analysis (Pasquali *et al.*, 2010a) and only 11 transformants (S2-S9-S11-S12-S13-S16-S17-S21-S22 from FcUK99 and S19-S20 from Fc233B) were selected for Southern blot analysis. Primer sequences used in this study are listed in **Table 1**.

Genomic DNA was obtained by a standard extraction method (Migheli *et al.*, 1996) from mycelium grown in 50-70 mL of CM at 25°C with gentle shaking (100-120 rpm) during 5 days. Then, the mycelium was filtered with Miracloth membrane (475855 Calbiochem, Merck Darmstadt, Germany) and freeze-dried for 3 days. For Southern blot analysis, a total of 5 µg of each genomic DNA was digested at 37°C for 16-18 hours with 50 units of *EcoRV* (New England Biolabs) in a final volume of 100 µL. Subsequently, digested DNA was separated by electrophoresis on a 1.2% agarose gel and transferred to nylon membrane (Hybond-N Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA) using a vacuum blotter (Model 785, Bio-Rad) according to standard procedures (Sambrook *et al.*, 1989). The membrane was then hybridized and the specific probes were detected with Dig High Prime DNA labelling kit and Detection Starter II (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) as described in the manufacturer's protocols. To identify *FcstuA* gene deletion the membrane was labelled by a left flank probe (806 bp) and after stripping the membrane was labelled by a partial gene *stuA* probe (401 bp). The left flank probe was amplified using the TopTaq™ DNA Polymerase kit (Qiagen S.p.A., Milan, Italy) in 100 µL of total volume containing: 1X TopTaq™ DNA Polymerase amplification

buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.5 μ M of primer stuA 1F, 0.5 μ M of primer stuA 2R and 2.5 U of TopTaq™ DNA Polymerase, 50 ng of FcUK99 DNA. The reaction was performed according to the following protocol: 94°C for 3 min, then 35 cycles of 94°C for 20 sec, 53°C for 20 sec and 72°C for 1 min, followed by a final elongation step at 72°C for 5 min. Instead the partial gene *stuA* probe was obtained from DNA of FcUK99 as template with primers stuA NF-stuA NR and Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer (New England Biolabs) at the following conditions: 98°C for 2 min, then 33 cycles of 98°C for 20 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 50 sec, followed by a final elongation step at 72°C for 5 min.

Table 1: Primer sequences used to obtain the transforming constructs and to identify mutants by PCR and Southern blotting

Split-marker recombination	Primer sequence
HY1F	5'-GGCTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGTCAA-3'
HY2R	5'-GCCGAACCCGCTCGTCTGGCTAAGA-3'
YG1F	5'-GATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCT-3'
YG2R	5'-GAACCCGCGGTCGGCATCTACTCTAT-3'
StuA 1F	5'-CCGTTCTTAAACTTTGAAGCTCTATT-3'
StuA 2R	5'-TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCGAAAGCAGTCGTGATAAATGAAGAT-3'
StuA 3F	5'-GAATAGAGTAGATGCCGACCGCGGGTTCTATGCTTGCGAAATTGTAGATCAT-3'
StuA 4R	5'-GTGAGTCGAGGGAGTTACTGATTT-3'
Identification of mutants by PCR	Primer sequence
StuA NF	5'-CTTGATAAACGGCAGTGGAGA-3'
StuA NR	5'-GAATCTGTTCCGAACCTCATCATT-3'
StuA 1F	5'-CCGTTCTTAAACTTTGAAGCTCTATT-3'
StuA 4R	5'-GTGAGTCGAGGGAGTTACTGATTT-3'
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
Probes	Primer sequence
StuA NF	5'-CTTGATAAACGGCAGTGGAGA-3'
StuA NR	5'-GAATCTGTTCCGAACCTCATCATT-3'

Pathogenicity tests

FcstuA deletion mutants confirmed by Southern blot analysis were tested on durum wheat seedlings to evaluate the role of *FcstuA* in the pathogenic process by the soil-borne fungus *F. culmorum*.

Mycelium plugs bearing one seed of durum wheat (*Triticum durum* cv. Claudio, kindly provided by Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali, CRA-QCE, Rome, Italy) were placed into a plastic sowing pot and covered by sterile soil. Pathogenicity tests were conducted according to Balmas *et al.* (2006) in a greenhouse at 25-30°C and three weeks after inoculation the severity of disease was assessed using the McKinney index (McKinney, 1923).

Moreover, the ability of *FcstuA* deletion mutants to colonize other substrates (namely, apple, potato and tomato fruit) was compared with the respective wild-type and ectopic transformants. Thus, apple (cv. Golden Delicious), potato (cv. Spunta olandese) and tomato (cv. Altavilla) were washed under tap water and then disinfected into a fume hood with a 2% sodium hypochlorite solution for 5 minutes and rinsed in sterile water at least twice. Later, plant tissues (except tomato) were cut into slices about 1 cm thick. Slices were placed in sterile Petri dishes and 10

μL of a spore suspension concentrated 10^5 conidia/mL were pipetted on the surface. Inoculated samples were incubated in a dark room at 25°C and daily monitored for fungal growth. The pathogenicity experiments were repeated two times.

Morphological analysis and oxidative stress

From each of the *F. culmorum* FcUK99 and Fc233B wild-type strains, respectively, single-spore *FcstuA* deletion mutants (S9-S12 and S19) and an ectopic transformant (S2 and S20) were chosen for morphological characterization.

To evaluate mycelium hydrophobicity, a single drop (20 μL) of sterile H_2O was deposited on the surface of colonies grown on PDA for 5 days. The time elapsed to absorb the drop by *FcstuA* deletion mutants and by ectopic transformants was compared to the respective wild-type strain.

Hyphal structures, sporodochia development, conidiogenesis, and timing of spore germination were observed by optical microscope (Olympus BX41) after growth in CMC liquid medium or SNA solid substrate. These experiments were replicated three times.

Briefly, 3 mycelium plugs were inoculated into 50-70 mL of liquid CMC medium in the dark at room temperature and 100-120 rpm shaking for 5 days. The spore suspension was filtered with Miracloth membrane and then washed twice with sterile water. The filtrate was centrifuged to collect conidia and subsequently the concentration was estimated using a Bürker-Türk hemacytometer. The growth on SNA was performed at 25°C with a photoperiod of 24 hours for 18 days (Skovgaard *et al.*, 2003) to check sporodochia production. To determine the timing of spore germination 1 mL of spore suspension (10^6 conidia/mL) was inoculated into Erlenmeyer flasks containing 30 mL of Czapek-Dox broth. The evaluation was made at time 0 of inoculation and after 2 hours and 4 hours of incubation at 25°C in the dark with slow shaking (100 rpm).

To verify the ability of *FcstuA* mutants to grow in oxidative stress condition the strains were cultured for 5 days at room temperature on CM plates amended with 0.02% of H_2O_2 . Moreover vegetative growth and pigment colour were evaluated on PDA. Ten μL of a spore suspension (10^6 conidia/mL) were spotted in the middle of each plate. After 3 days of incubation at room temperature the radial development was measured.

Microscopic observations of durum wheat kernels

To analyse the development of fungal hyphae during the first step of colonization, pathogenicity test conditions were reproduced *in vitro*. Ten mycelium disks (from the same set of strains indicated before) bearing one seed were placed into a Petri dish, incubated 3 days in the dark.

The observations were conducted by a Scanning electron microscope ZEISS EVO LS with environmental control in low vacuum conditions (pressure 600 Pa, temperature 2°C , humidity 85%).

Toxin analysis

Mycelium handling and toxin inducing conditions were described by Pasquali *et al.* (2010b). The test was conducted on FcUK99 wild-type, the ectopic S2 and the mutants S9, S12, S13. Toxin measure was performed using the AgraQuant® DON test kit (Romerlab, Tuln, Austria) according to manufacture procedures. The absorbance of each well was determined at 630 and 450 nm using a Genios reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland).

To fit the toxin range sensitivity of the kit wild-type and ectopic growth media were diluted in water 20 times. Three biological replicates were performed.

Statistical analysis

The descriptive statistics and the one-way of variance, followed by multiple comparison applying the Dunnett's test, were performed using Minitab® for Windows release 12.1 software. We evaluated the percentage of seedling emergence, the disease severity and the vegetative growth on CM amended with 0.02% H_2O_2 . The *FcstuA* mutants and the ectopic cotransformants were compared with the respective wild-type strains as a control. The confidence level was equal to 95%.

“Cup-plate” analysis

The diffusion assay on agarose gel called also “cup-plate” allows a visual estimate of polygalacturonase (PG) content produced by phytopathogenic fungi. For this analysis the

following strains were chosen: FcUK99, S12, S9, S2 and Fc233B, S19, S20. Five mycelium plugs (5 mm of diameter) for each sample was inoculated in 250 mL Erlenmeyer flask with 50 mL of Szécsi medium at 25°C with gentle shaking (100-120 rpm) during 3 days to induce PG activity. Then, the cultures were filtered by two layers of filter papers and 100 µL of solution were inoculated into the holes of 0.8 mm of diameter which were made on the surface plate. The agarose gel Petri dishes were incubated at 30°C for 20 hour in the dark. After incubation with 6-10 mL of 6 N HCl for 15 minutes the plates were washed by distilled water. The enzyme activity was measured according to the size of the inhibition halo formed around the holes as a result of peptic matrix degradation by polygalacturonase enzyme.

RESULTS

Obtainment of *FcstuA* deletion mutants

The selectable marker *hph* allowed a rapid screening of hygromycin B-resistant transformants: colonies grown on PDA amended with 100 µg/mL of hygromycin B were checked by specific PCR analysis. Primers ITS1 and ITS4 allowed to ascertain the quality of DNA, while the following primer pairs: *StuA* NF-*StuA* NR, *StuA* 1F-*StuA* 4R, *StuA* 1F-*StuA* NR, *StuA* NF-*StuA* 4R (Table 1) identified transformants where the *FcstuA* gene was deleted (Figures 3A and 3B). From a collection of 20 *hph* resistant transformants, 17 showed a *FcstuA* deletion and 3 were ectopic transformants. This result was confirmed by Southern blot analysis of 11 randomly selected transformants. The hybridization with the left flank probe allowed to verify deletion of *FcstuA* gene as a result of the insertion of the hygromycin gene (size 1,600 bp): all *FcstuA* mutants showed a band of 3,400 bp whereas the wild-type controls and the ectopic transformants showed the expected band of 2,240 bp (Figure 4). The same results were obtained by hybridization with the partial gene *stuA* probe as a confirmation of the deletion of *FcstuA* gene (data not shown). Overall, 16 *FcstuA* deletion mutants and 2 ectopic transformants were obtained from FcUK99, while 1 *FcstuA* deletion mutant and a single ectopic transformant were obtained from Fc233B.

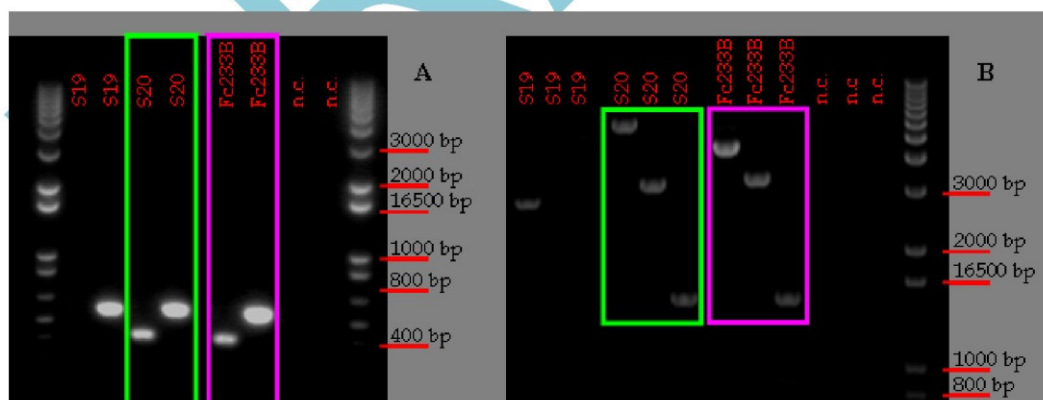


Figure 3: Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained from a *FcstuA* mutant strain (S19), ectopic transformant (S20) and wild-type strain (Fc233B). Primers *stuA* NF and *stuA* NR allowed to verify *FcstuA* gene deletion. The *FcstuA* mutant did not show the band of 401 bp corresponding to the endogenous *FcstuA* gene, while this was amplified in wild type (pink box) and in ectopic transformant (green box). The primers ITS1 and ITS4 were used as a control of DNA quality (A). Further PCR analysis with the following primer pairs: *StuA* 1F-*StuA* 4R, *StuA* 1F-*StuA* NR, *StuA* NF-*StuA* 4R was performed to confirm the deletion of *FcstuA* gene (B).

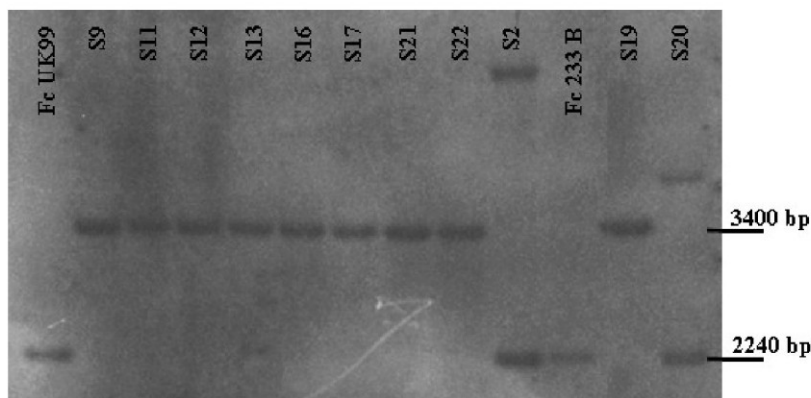


Figure 4: Southern blot analysis of 11 *FcstuA* transformants. Genomic DNAs were digested with *EcoRV* and after the membrane was labelled with a left flank probe (806 bp). The expected fragment sizes were: 3,400 bp and 2,240 bp for *FcstuA* mutants and for control (wild-type strains and ectopic transformants), respectively.

Deletion of *FcstuA* results in loss of pathogenicity in *Fusarium culmorum*

Pathogenicity behaviour of FcUK99 and Fc233 B was confirmed to differ by 50%. The deletion of *FcstuA* gene from both strains caused a complete impairment of pathogenicity. Statistical analysis indicates significant reduction of crown and root rot on durum wheat seedlings disease in all 10 mutants tested, while ectopic transformants did not differ significantly from the wild-type reference strains as expected (Table 2) (Figure 5).

In addition, the *FcstuA* deletion mutants showed a reduced colonization ability on different plant tissues (Figure 6). This result further strengthens the hypothesis that disruption of *FcstuA* gene has a major impact on fungal pathogenicity, including *F. culmorum*.

Table 2: Emergence (%) and severity (McKinney disease index 0-100) of foot and crown rot in durum wheat (cv Claudio) caused by *Fusarium culmorum* FcUK99 and Fc233B wild-type strains and their respective *FcstuA* deleted or ectopic transformants.

Strains	Disease index	Emergence
Non inoculated	6.7±5.7**	93.3±5.8**(2)
FcUk99 wt	100.0±0.0	3.3±5.8
<i>FcstuA</i> mutant 9	10.8±1.4**	90.0±0.0**
<i>FcstuA</i> mutant 11	10.0±10.0**	90.0±10.0**
<i>FcstuA</i> mutant 12	10.0±10.0**	90.0±10.0**
<i>FcstuA</i> mutant 13	20.0±10.0**	80.0±10.0**
<i>FcstuA</i> mutant 16	3.3±5.8**	96.7±5.7**
<i>FcstuA</i> mutant 17	10.0±10.0**	90.0±10.0**
<i>FcstuA</i> mutant 21	13.3±15.3**	86.7±15.3**
<i>FcstuA</i> mutant 22	3.3±5.8**	96.7±5.8**
<i>FcstuA</i> ectopic 2	100.0±0.0	0.0

Strains	Disease index	Emergence
Non inoculated	6.7±5.8**	93.3±5.8**
Fc233B wt	70.8±15.1	43.3±15.3
<i>FcstuA</i> mutant 19	6.7±5.8**	93.3±5.8**
<i>FcstuA</i> ectopic 20	69.2±19.4	53.3±15.3

(1) Results are expressed as percent emergence and disease incidence (McKinney index 0-100) ± SD after 3 weeks from inoculation (2) Values in each column followed by two asterisks are significantly different from the wild-type control (Dunnett's test with $P < 0.001$)

Figure 5: Pathogenicity tests. The test was performed in three repetitions of 10 mycelium plugs each with one seed of durum wheat. The severity of disease was assessed after three weeks of inoculation at 25°C. The FcUK99 was more virulent than Fc233B. The ectopic transformant (S2-S20) behaved like the wild-type strains. $\Delta FcstuA$ mutant (S9-S12-S19) didn't show any symptoms.

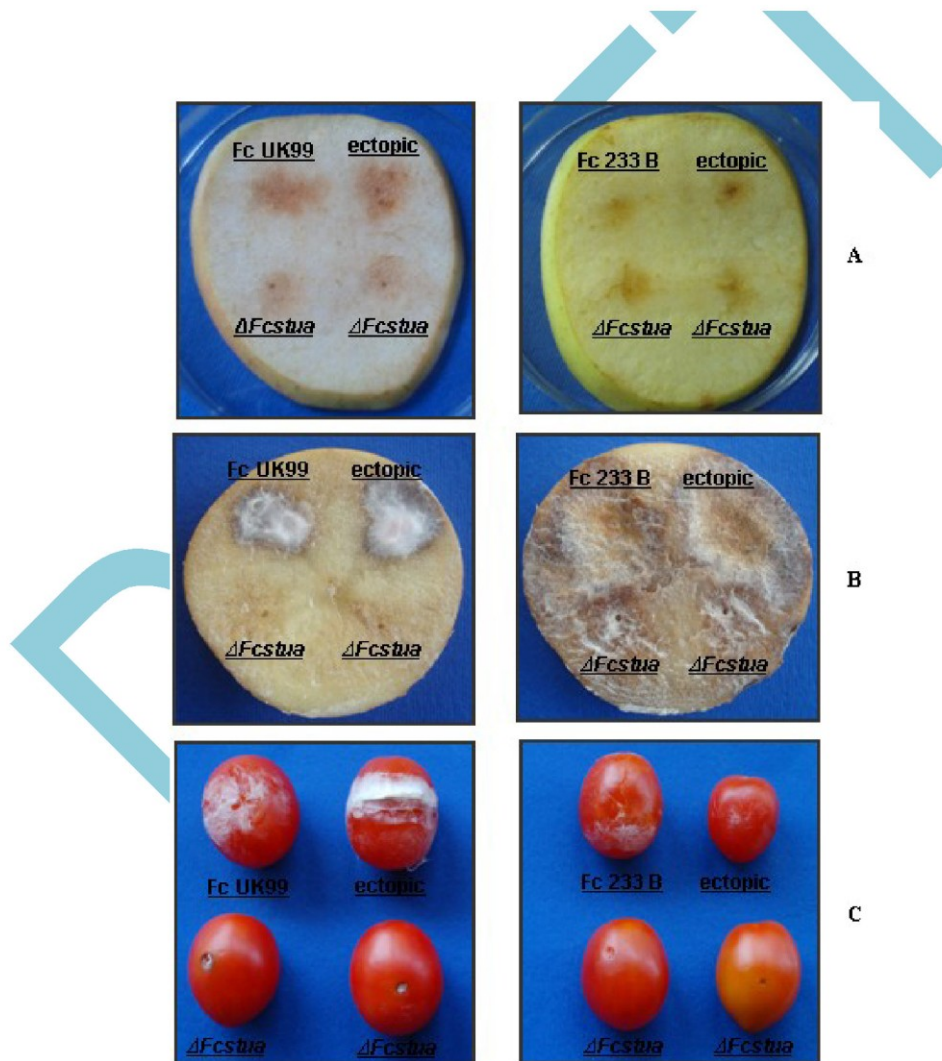
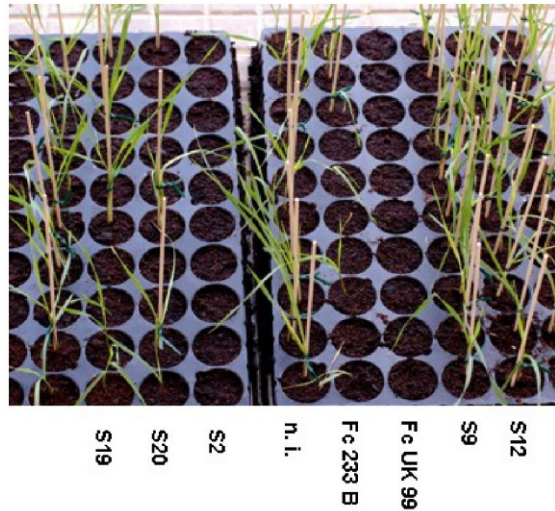


Figure 6: Inability to colonise different plant tissues: apple (A), potato (B) and tomato (C) were inoculated with *FcstuA* deleted mutants, ectopic transformants and wild-type strains and incubated for 4 (apple and tomato) and 7 (potato) days.

FcStuA* deletion induces phenotypic and morphological changes in *F. culmorum

Deletion of *FcstuA* gene seems to play a key role in a series of phenotypic and morphological changes in *F. culmorum*. *FcstuA* deletion mutants grown on PDA showed a phenotype similar to *F. graminearum* mutants (Lysøe *et al.*, 2011). White pigment, sparse mycelium, stunted growth and mycelium embedded in the solid medium were typical phenotypic features of *FcstuA* mutants. Instead, ectopic transformants presented a phenotype similar to the respective wild-type strain (quick growth, aerial mycelium is white to yellow or pale orange, but in older cultures becomes brown to red-brown) but were resistant to hygromycin B.

The mycelial surface of *FcstuA* mutant colonies is characterised by low hydrophobicity unlike wild-type and ectopic strains: the ratio between the times required to absorb a drop of water of wild types compared to their respective $\Delta FcstuA$ strains was 10 for FcUK99 and 3 for Fc233B. In both cases therefore water penetrated more quickly in the knocked out mutants (**Figure 7**).

We also observed differences in the structure of mycelium, especially concerning the robustness of hyphae and the capability and the colonisation mode of a single seed of durum wheat by fungal strains (mutant and wild-type). Conversely to wild-type and ectopic strains, *FcstuA* mutants produce fewer aerial mycelium and the hyphae are thin, winding and shortened. As shown in **Figure 8**, the wild-type strain completely surrounded the seed by forming a complex network of thick and sturdy hyphae, thus preventing germination, (**Figure 8A-8B**) while the developing hyphae of *FcstuA* mutants did not hinder the emergence of root from the caryopsis (**Figure 8C-8D**).

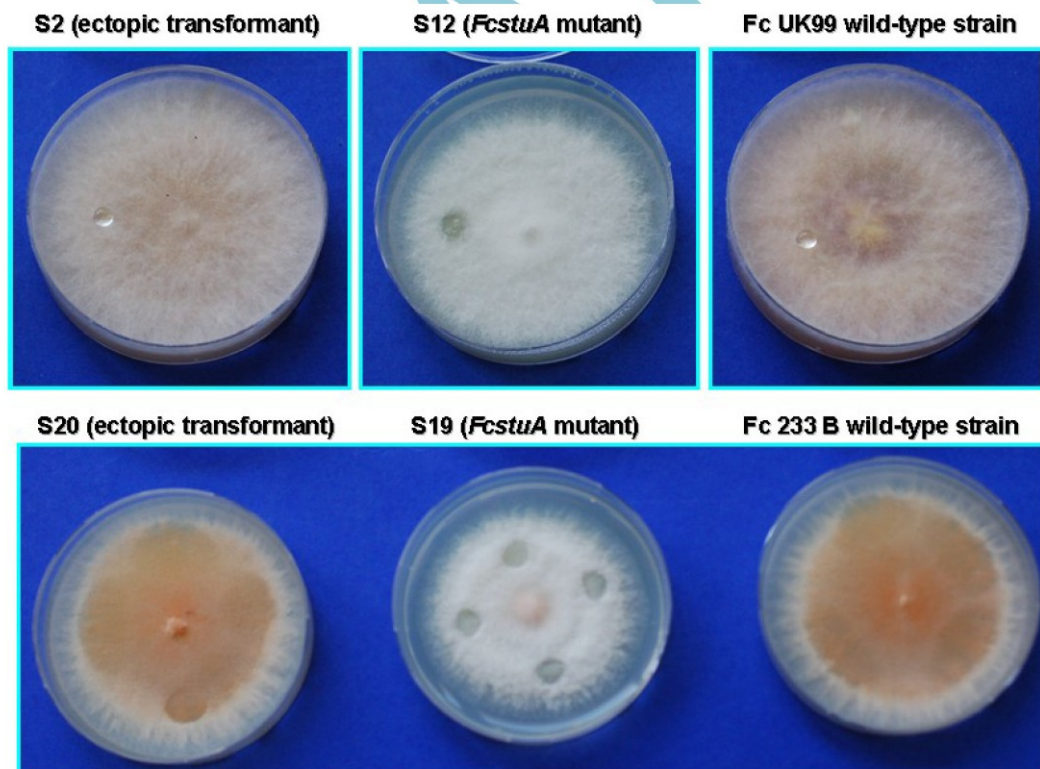


Figure 7: Comparison between *FcstuA* mutants, their wild-type strain and ectopic transformant with respect to hydrophobicity and pigmentation of mycelium.

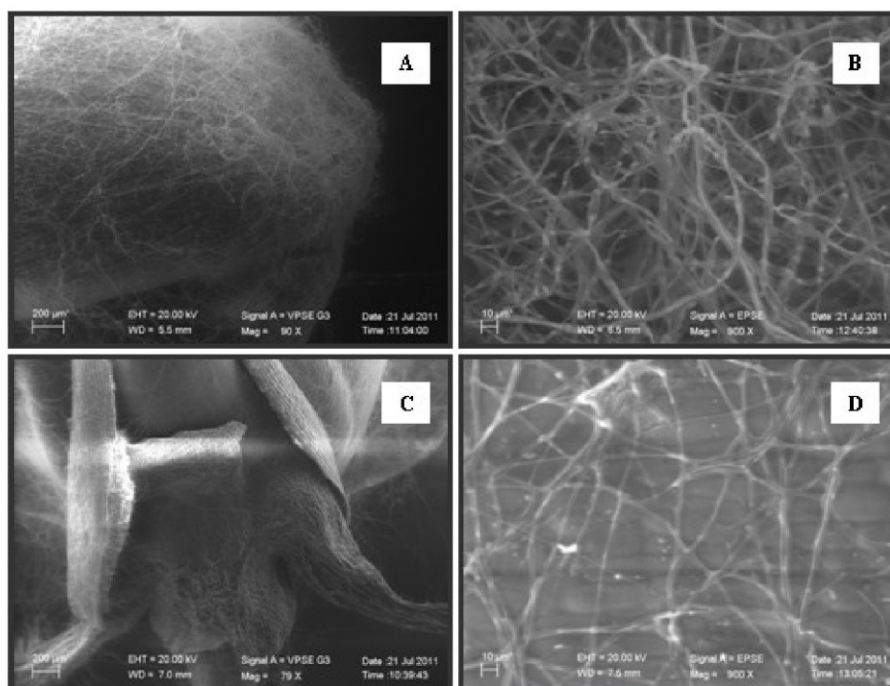


Figure 8: Scanning electron microscope ZEISS EVO LS images showing a seed of durum wheat placed over a mycelium disk of *Fusarium culmorum* Fc UK99 (A and B) and its *FcstuA* mutant (C and D) and incubated at 25°C for 3 days. During observation the samples were subjected to the following conditions: temperature 2°C, humidity 85% and pressure 600 Pa.

FcstuA deletion mutants grown in liquid CMC produced fewer macroconidia/mL than ectopic transformants and wild-type strains: conidiogenesis of *FcstuA* mutants was reduced by 5 to 10 times (**Figure 9**) when compared to original wild-types.

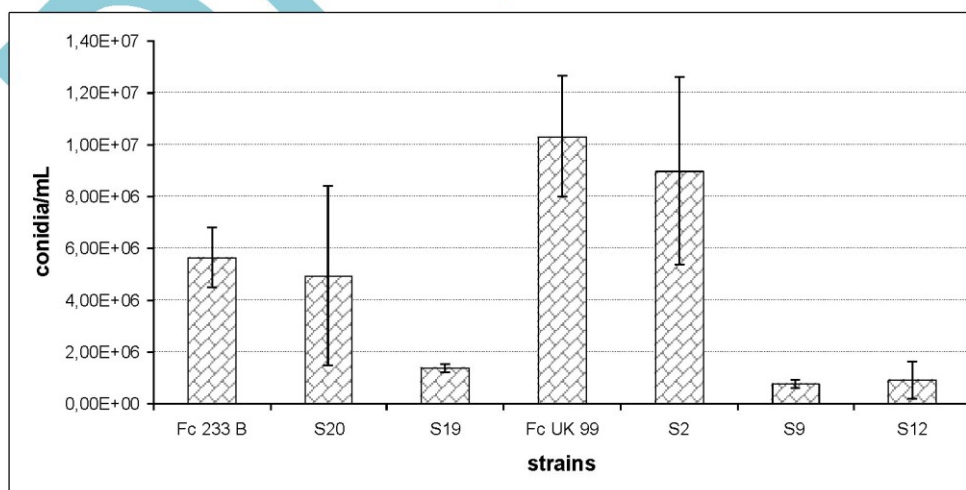


Figure 9: Conidiation of *FcstuA* mutants S18-S19 and S9-S12 and their respective ectopic transformants and wild-type strains after 5 days of incubation on CMC at 25°C in the dark with shaking. All *FcstuA* mutants produced fewer spores than wild-type and ectopic transformants. Data represent the means and standard errors of three replications.

FcstuA mutants showed a decreased germination efficiency of conidia compared to respective ectopic transformants and wild-type strains (**Figure 10**). The decreased germination of $\Delta FcstuA$ conidia did not determine a significant loss of fungal biomass in cultured mycelium after 8 days in toxin inducing medium (data not shown).

Wild-type strains and ectopic transformants grown on SNA produced abundant sporodochia of orange to brown colour, while *FcstuA* deletion mutants do not form sporodochia. Furthermore, in wild-type strains and ectopic transformants macroconidia are generated from monophialides on branches conidiophores, while in *FcstuA* mutants macroconidia are formed directly on slender and twisted hyphae (**Figure 11**).

Statistically significant results (**Table 3**) were recorded for *FcstuA* mutants grown on solid substrate amended with hydrogen peroxide. Indeed, the mutants showed smaller diametral growth than the wild type strain and the ectopic transformant as a consequence of the higher sensitivity to oxidative stress.

FcstuA mutants produced significantly less toxin compared to the wild-type FcUK99 (**Figure 12**) and its ectopic strain. All knock-out mutants had similar decrease of toxin production suggesting the effective role of *FcstuA* in controlling toxin synthesis.

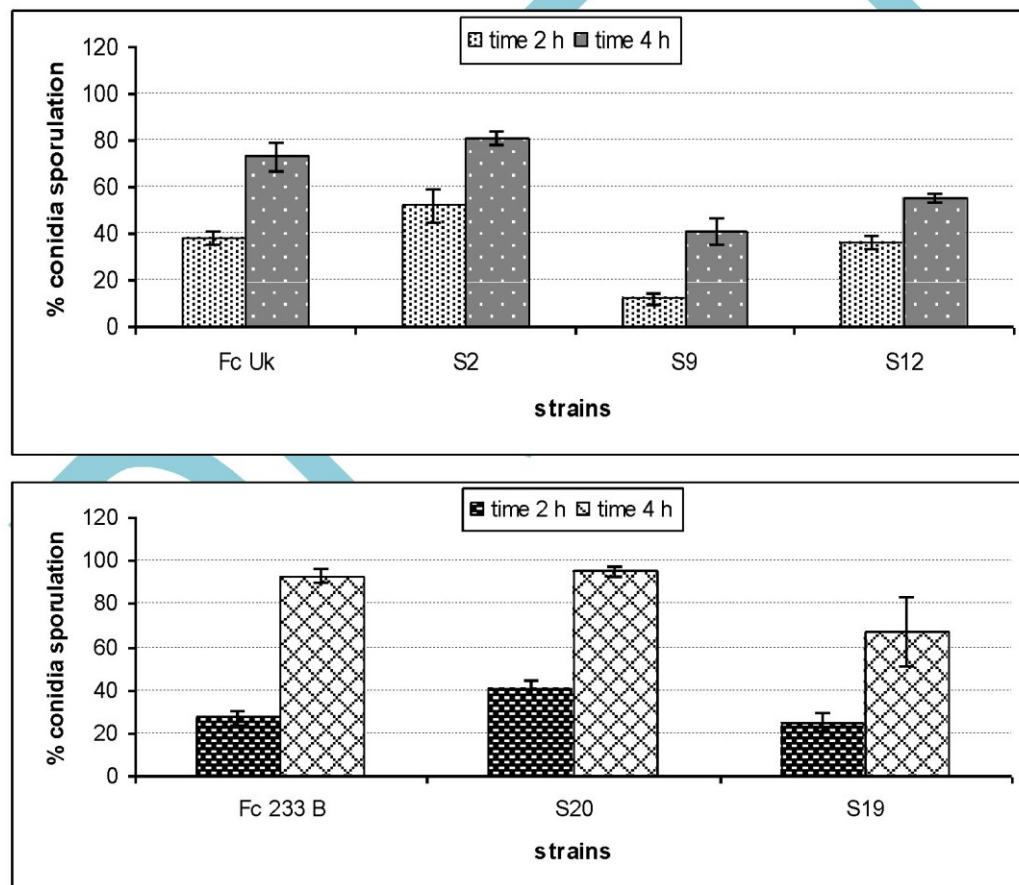


Figure 10: Sporulation trend of *FcstuA* deletion mutants and one ectopic transformant obtained from *Fusarium culmorum* FcUK99 and Fc233B, respectively, by homologous recombination. Data represent the means and standard errors of three replications.

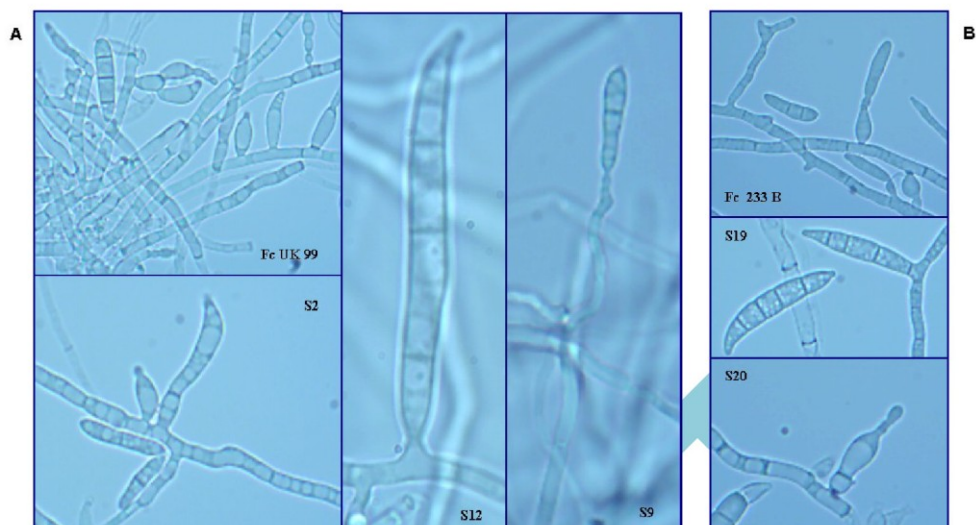


Figure 11: Conidiogenesis by *FcstuA* deletion mutants, ectopic transformants and wild-type strains observed with a light microscope (OLYMPUS BX41) at different resolution (40X-100X). (A) macroconidia of FcUK99 (wild-type) and S20 (ectopic) are formed from monophialides on branched conidiophores, while in S9 and S12 (*FcstuA* mutants) the spores are generated directly from hyphae. (B) The same observations were made for *FcstuA* deletion mutant S19 obtained from strain Fc 233 B. Photos were taken with MOTICAM 2500 5.0MP live resolution (Motic).

Table3: Diametral growth on selective substrate CM amended with 0.02% H₂O₂ of *Fusarium culmorum* FcUK99 and Fc233B wild-type strains and their respective *FcstuA* deleted or ectopic transformants. The incubation was performed at 25°C with a photoperiod of 12 hours for 5 days.

Strains	Diametral growth	Strains	Diametral growth
FcUK99 wt	8.07±0.06	Fc233B wt	7.40±0.0
<i>FcstuA</i> ectopic 2	8.30±0.27	<i>FcstuA</i> ectopic 20	7.20±0.10
<i>FcstuA</i> mutant 9	5.57±0.12**	<i>FcstuA</i> mutant 19	5.57±0.12**
<i>FcstuA</i> mutant 12	5.50±0.10**		

(1) Results are expressed as diametral growth on selective substrate ± Standard Deviation (SD) after 5 days from conidia inoculation.

(2) Values in each column followed by two ($P < 0.001$) asterisks are significantly different from the inoculated control by Dunnett test.

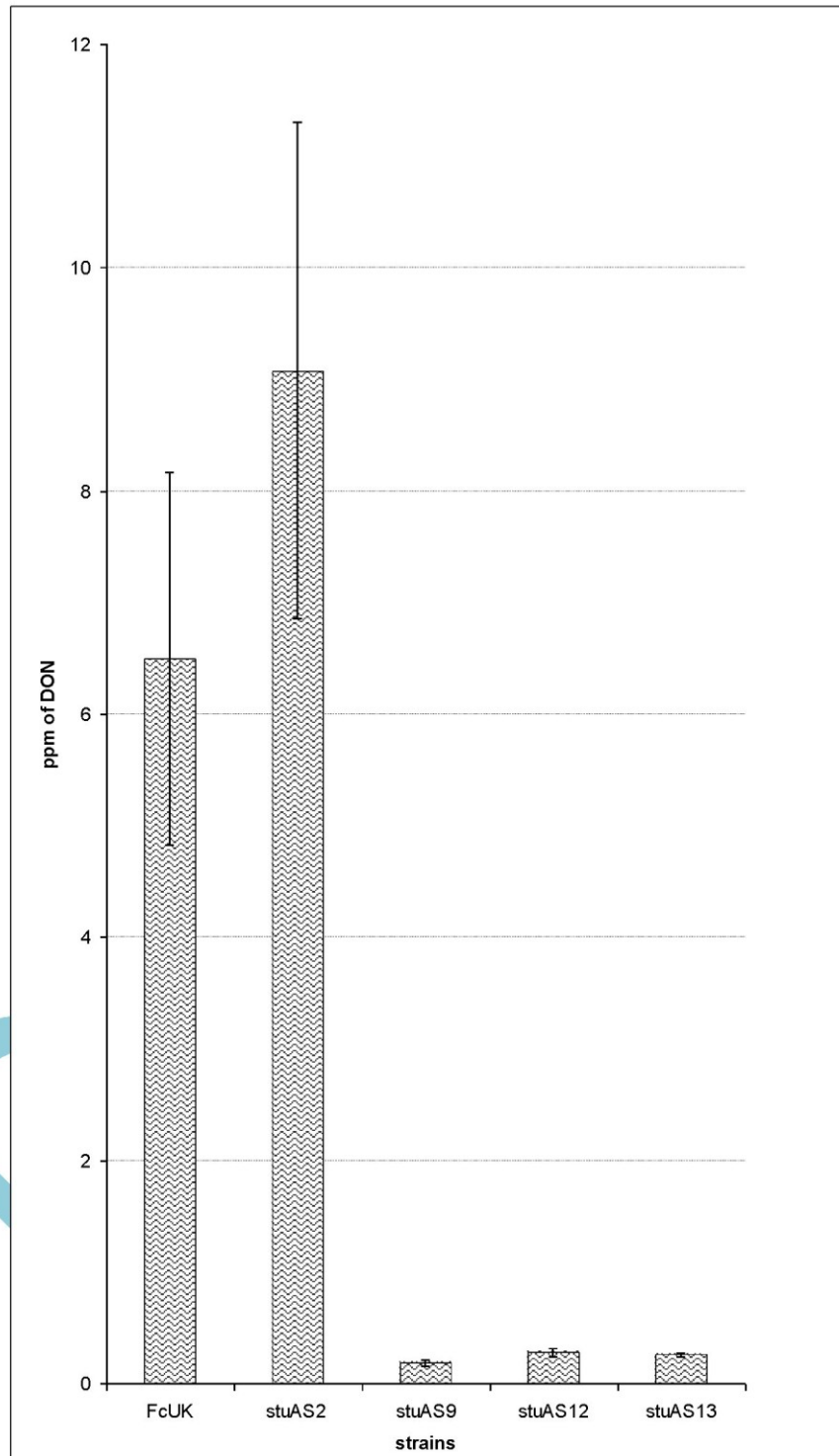


Figure 12: Comparison of deoxinivalenol production by FcUK99, its ectopic strain (S2) and $\Delta FcstuA$ mutant (S9, S12, S13). Toxin measure was performed using the AgraQuant® DON test kit. Data represent the means and standard errors of three replications.

Deletion of *FcstuA* gene does not affect the production of polygalacturonase

Inhibition assay on agarose Petri dishes (cup plate) made it possible to qualitatively estimate and to compare the activity of peptic matrix degradation in *FcstuA* mutants (S12-S9 and S19), ectopic transformants (S2 and S20) and their wild-type strains (FcUK99 and Fc233B). The polygalacturonase enzyme is properly expressed in all strains analyzed and no significant differences were observed between virulent strains and non-pathogenic *FcstuA* mutants (**Figure 13**). Therefore the *FcstuA* gene is not involved in the mechanisms of pectolytic enzyme secretion during infection and colonization of the host.

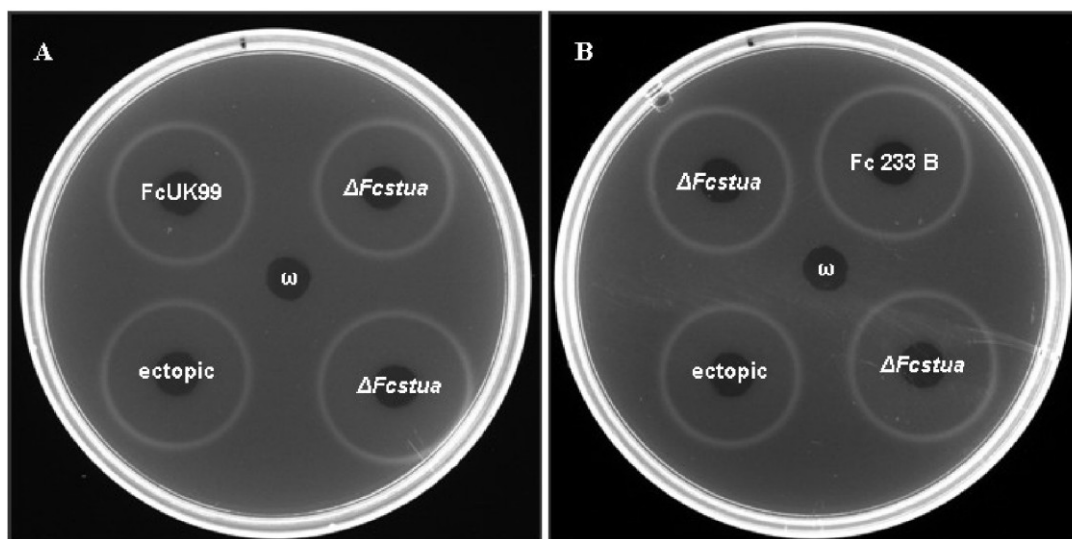


Figure 13: Diffusion assay on agarose gel ("cup plate") for quantifying the polygalacturonase production by *FcstuA* mutants. In each well 100 μ L of filtered PG solution per sample were loaded. The white circle represent the inhibition halo due to PG activity.

DISCUSSION

The identification and functional characterization of a transcription factor containing a highly conserved bHLH-like APSES domain (Aramayo *et al.*, 1996) in *F. culmorum* was carried out in order to investigate the role of the gene in a previously untested pathogenicity mechanism. *FcstuA* showed very high homology with *F. graminearum* *Fgstua* and the lack of significant amino acid differences between the two sequences indicate an identical structure of the two proteins. It was expected therefore that differences in phenotypes among the two species, also observed in Baldwin *et al.* (2010), are due to the genome context and not the properties of the gene itself. The level of conservation of the proteins seems to be higher than average in the context of full genome screening (Spanu *et al.*, unpublished). It is therefore suggested that *FcStua* is under strong selective pressure having a crucial role in cell regulation.

ApSES proteins homologues of *stuAp* from *Aspergillus nidulans* (Miller *et al.*, 1992) were reported to control metabolic, morphological and developmental stages in various fungal species (Ramirez-Zavala and Dominguez, 2008).

In order to understand the function of the gene in *F. culmorum*, morphological and physiological tests on the mutants were performed suggesting that *F. culmorum* behaves, as expected, very similarly to *F. graminearum*. It was possible to confirm that conidiation is controlled by *FcstuA*. The gene is necessary to create conidiophores and phialides as also shown in other models (Lysøe *et al.*, 2011; Borneman *et al.*, 2002; Ohara *et al.*, 2004). The direct conidiation from hyphae can be the cause of reduced number of conidia produced by the mutants.

Secondary metabolite production was also proved to be regulated by *FcstuA* homologous genes (Yin and Keller, 2011). Pigment production was indeed stopped suggesting that aurofusarin and other pigments were not produced in the mutant as in *F. graminearum* results. In both fungi toxin production was drastically reduced *in vitro*. Despite different production

media were used, deoxynivalenol (DON) production in *F. graminearum* was reported to be below 1% compared to the wild-type while in *F. culmorum* the decrease was less significant (5/10% of the wild-type production). Interestingly comparing conidia production a difference in the ratio of decrease of conidia production was observed between *F. graminearum* (1:10000 drop) and *F. culmorum* (1:10 drop). Both results highlight the fact that despite the two homologue genes are in practice identical, different genomic environments may affect the final phenotype. In general *FcstuA* knock-out seems to have milder effects compared to *Fgstua* deletion.

In plant pathogenic fungi *FcstuA* homologues determine the ability to cause symptoms also in distantly related fungal species such as *F. graminearum* (Lysøe *et al.*, 2011), *Ustilago maydis* (Garcia-Pedrajas *et al.*, 2010), *Glomerella cingulata* (Tong *et al.*, 2007) and *Stagonospora nodorum* (Ipcho *et al.*, 2010). In *F. oxysporum*, causal agent of root rot, the mutant was not affected in its pathogenic behaviour (Ohara and Tsuge, 2004). Given the different role played by *stuA* homologues in *F. graminearum* and *F. oxysporum* (the two most closely related sequenced genomes to *F. culmorum*) we investigated the effect of the gene in *F. culmorum* using a different pathosystem (foot crown rot). The development of asymptomatic plants in the $\Delta fcstuA$ mutants obtained from both wild-types used in our study proved that *FcstuA* is essential for causing crown rot in wheat similarly as what it was observed for head blight for *F. graminearum* (Lysøe *et al.*, 2011). Because virulence is a complex character (Sacristán and Arena-Garcia, 2008) that can be influenced by different molecular mechanism and *FcstuA* seems to regulate a huge amount of genes in *F. graminearum* (Lysøe *et al.*, 2011), we compared toxigenic behaviour of a toxin producer and a toxin non producer strain to further investigate the role of toxin in pathogenicity. In both genetic backgrounds pathogenicity was null when *FcstuA* was knocked-out. Interestingly the potential ability to produce small amount of toxin in the FcUK99 $\Delta FcstuA$ mutant did not show significant symptoms, further suggesting that pathogenic behaviour is stopped by other characters controlled by *FcstuA* gene. This is further confirmed by the observation done at the environmental SEM that showed the inability of the mutant to attach and penetrate the seed.

Morphological differences caused by deletion of *FcstuA* included slow growth on solid medium as well as in apple, potato and tomato tissues and on the seed surface. On the contrary growth rate was not influenced *in vitro*. Interestingly a significant smaller amount of conidia from the $\Delta fcstuA$ mutants were able to germinate in liquid medium confirming indirectly that budding factors are influenced by the gene (Borneman *et al.*, 2002).

Lack of hydrophobicity at the mycelium surface was observed in *F. culmorum* as well as in other fungi. In *Penicillium chrysogenum* (Sigl *et al.*, 2011) the *FcstuA* mutant showed bundled hyphae at the surface that would reduce the network effect blocking the waterdrop. This was not observed on agar medium in our electron scanning microscopy experiment (not shown) suggesting that lack of hydrophobicity of the mycelium may be better explained in *F. culmorum* $\Delta Fcstua$ mutants as a reduced expression of hydrophobins (Teertstra *et al.*, 2006) as observed in *F. graminearum* and *Glomerella cingulata* (Lysøe *et al.*, 2011; Tong *et al.*, 2007).

Resistance to oxidative stress was also significantly decreased in the mutants confirming previous result (Lysøe *et al.*, 2011). Because colonization of plant tissues requires the ability to cope with oxidative stress resulting from plant defense mechanisms it is probable that *FcstuA* mutants do not respond efficiently to the stress. It can be hypothesised that the lack of response to H₂O₂ stresses and the inability to produce toxin belong to the same molecular pathway linking environmental sensing and toxin production (Reverberi *et al.*, 2010) in the fungus and that therefore *FcstuA* may control key oxidative stress sensor. Further investigations in this direction are warranted.

To further investigate the possible cause of inability to colonize seeds by the deleted mutant, polygalacturonase production was investigated given the crucial role of these enzymes in penetration of plant cells and hence in pathogenicity (Kang *et al.*, 2000; Jaroszuk-Ścisiel *et al.*, 2011; Aleandri *et al.*, 2007; 2008). No significant difference in production was found between mutants and wild types ruling out the hypothesis that enzymes necessary for plant penetration are regulated by *FcstuA* gene. Therefore it is more probable that factors determining lack of pathogenicity in $\Delta fcstuA$ mutants are linked to the coping with plant defence mechanism.

Despite numerous attempts, it was impossible to complement the gene back in the mutants due to the impossibility to clone within a bacterial strain the full gene as observed also in the case of *U. maydis* (García Pedrajas *et al.*, 2010), *Stagonospora nodorum* (Ipcho *et al.*, 2010) and in *F.*

graminearum (Lysøe, personal communication). We are indeed confident that all the effects presented here are solely due to the lack of the *FcstuA* gene because all mutants showed the same phenotype while both ectopic strains were similar to respective wild-types. Moreover effects of *FcstuA* gene loss were confirmed on genetic background of two *F. culmorum* strains with different geographic origin and behaviour, further providing a proof that the effects described are solely due to the loss of the transcription factor.

Concluding, this work represent the identification of a pathogenicity factor in *F. culmorum* that adds to the few other genes know to play a role in pathogenic behaviour in this species (Skov *et al.*, 2004; Baldwin *et al.*, 2010). Together with trichothecenes (Schermer *et al.*, 2011), it is the only known pathogenicity factor involved in foot crown rot disease. Our work confirms that *FcstuA* controls different pathways within the cell including morphological development, stress coping activity and toxigenic production. By using two strains differing for virulence and toxin production we were able to show that pathogenic behaviour is not simply determined by the lack of toxin production nor by production of polygaracturose enzymes in *FcstuA* mutants and that other known and unknown mechanisms may determine the lack of pathogenity in *FcstuA* mutants. It is tempting to speculate that decreased germination efficiency (decreasing the inoculum) and sensitivity to oxidative stress can be among the causes of inability to overcome plant defense mechanisms.

REFERENCES

- Aleandri M.P., Magro P., Chilosi G. (2007). Modulation of host pH during wheat-*Fusarium culmorum* interaction and its influence on pectolytic enzymes production and activity. *Plant Pathology* 56: 517–525
- Aleandri M.P., Magro P., Chilosi G. (2008). Influence of environmental pH modulation on efficiency of apoplastic PR proteins during *Fusarium culmorum*-wheat seedling interaction. *Plant Pathology* 57: 1017–1025
- Aramayo R., Peleg Y., Addison R., Metzenberg R. (1996). *Asm-1*, a *Neurospora crassa* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Genetics* 144: 991–1003
- Baldwin T.K., Urban M., Brown N., Hammond-Kosac K. (2010). A role for topoisomerase I in *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* pathogenesis and sporulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 566–577
- Balmas V., Delogu G., Esposito S., Rau D., Migheli Q. (2006). Use of a complexation of tebuconazole with β -cyclodextrin for controlling foot and crown rot of durum wheat incited by *Fusarium culmorum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 480–484
- Beccari G., Covarelli L., Nicholson P. (2011). Infection processes and soft wheat response to root rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology* 60: 671–684
- Borneman A.R., Hynes M.J., Andrianopoulos A. (2002). A basic helix-loop-helix protein with similarity to the fungal morphological regulators, *Phd1p*, *Efg1p* and *StuA*, controls conidiation but not dimorphic growth in *Penicillium marneffe*. *Molecular Microbiology* 44: 621–631
- Breakspear A., Pasquali M., Broz K., Dong Y., Kistler H.C. (2011). *Npc1* is involved in sterol trafficking in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 48: 725–730
- Cappellini R.A., Peterson J.L. (1965). Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57: 962–966
- Catlett N.L., Lee B.N., Yoder O.C., Turgeon B.G. (2003). Splitmarker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. *Fungal Genetics Newsletters* 50: 9–11
- Correll J.C., Klittich C.J.R., Leslie J.F. (1987). Nitrate non-utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77: 1640–1646

- Desmond O.J., Manners J.M., Stephens A.E., Maclean D.J., Schenk P.M., Gardiner D.M., Munn A.L., Kazan K. (2008). The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Molecular Plant Pathology* 9: 435–445
- Dutton J.R., Johns S., Miller B.L. (1997). *StuAp* is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *EMBO Journal* 16: 5710–5721
- García-Pedrajas M.D., Baeza-Montañez L., Gold S.E. (2010). Regulation of *Ustilago maydis* dimorphism, sporulation, and pathogenic development by a transcription factor with a highly conserved APSES domain. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 211–222
- Gardiner D.M., Kazan K., Manners J.M. (2009). Novel genes of *Fusarium graminearum* that negatively regulate deoxynivalenol production and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 1588–1600
- Gimeno C.J., Fink G.R. (1994). Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PHD1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Molecular and Cellular Biology* 14: 2100–2112
- Giraud F., Pasquali M., El Jarroudi M., Vrancken C., Brochot C., Cocco E., Delfosse P., Hoffmann L., Bohn T. (2010). Fusarium head blight and associated mycotoxin occurrence on winter wheat in Luxembourg in 2007/2008. *Food Additives and Contaminants Part A*, 27: 825–835
- Harris L.J., Desjardins A.E., Plattner R.D., Nicholson P., Butler G., Young J.C., Weston G., Proctor R.H., Hohn T.M. (1999). Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Disease* 83: 954–960
- Hohn T.M., Desjardins A.E. (1992). Isolation and gene disruption of the *Tox5* gene encoding trichodiene synthase in *Gibberella pulicaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: 249–256
- Ipcho S.V.S., Tan K.C., Koh G., Gummer J., Oliver R.P., Trengove R.D., Solomon P.S. (2010). The transcription factor *stuA* regulates central carbon metabolism, mycotoxin production, and effector gene expression in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *Eukaryotic Cell* 9: 1100–1108
- Iyer L.M., Koonin E.V., Aravind L. (2002). Extensive domain shuffling in transcription regulators of DNA viruses and implications for the origin of fungal APSES transcription factors. *Genome Biology* 3: 1–11
- Jaroszuk-Scisel J., Kurek E., Slomka A., Janczarek M., Rodzik B. (2011). Activities of cell wall degrading enzymes in autolyzing cultures of three *Fusarium culmorum* isolates: growth-promoting, deleterious and pathogenic to rye (*Secale cereale*). *Mycologia* 103: 929–945
- Jiao F., Kawakami A., Nakajima T. (2008). Effects of different carbon sources on trichothecene production and *Tri* gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS Microbiology Letters* 285: 212–219
- Kang Z., Buchenauer H. (2000). Ultrastructural and cyto-chemical studies on cellulose, xylan and pectin degradation in wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *Journal of Phytopathology* 148: 263–275
- Langin T., Daboussi M.J., Gerlinger C., Brygoo Y. (1990). Influence of biological parameters and gene transfer technique on transformation of *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics* 17: 313–319
- Lysøe E., Pasquali M., Breakspear A., Kistler H.C. (2011). The transcription factor *FgStuAp* influences spore development, pathogenicity, and secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 54–67
- Maier F.J., Miedaner T., Hadelar B., Felk A., Salomon S., Lemmens M., Kassner H., Schäfer W. (2006). Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (*Tri5*) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology* 7: 449–461
- Malalasekera R.A.P., Sanderson F.R., Colhoun J. (1973). Fusarium diseases of cereals XI. Penetration and invasion of wheat seedlings by *Fusarium culmorum* and *F. nivale*. *Transactions of the British Mycological Society* 60: 453–462

- Marasas W.F.O., Nelson P.E., Toussoun T.A. (1984). Toxigenic *Fusarium* species: identity and mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press, University Park, USA
- Massari M.E., Murre C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Molecular and Cellular Biology* 20: 429–440
- McKinney H.H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 26: 195–217
- McMullen M. (2003). Impacts of *Fusarium* Head Blight on the North American agricultural community: the power of one disease to catapult change. In: *Fusarium Head Blight of wheat and barley* (Leonard K.J., Bushnell W.R., eds), pp 484–503. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota
- Merson-Davies L.A., Odds F.C. (1992). Expansion of the *Candida albicans* cell envelope in different morphological forms of the fungus. *Journal of General Microbiology* 138: 461–466
- Migheli Q., Friard O., Del Tedesco D., Musso M.R., Gullino M.L. (1996). Stability of transformed antagonistic *Fusarium oxysporum* strains *in vitro* and in soil microcosms. *Molecular Ecology* 5: 641–649
- Miller K.Y., Toennis T.M., Adams T.H., Miller B.L. (1991). Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans* stunted (*stuA*) gene. *Molecular and General Genetics* 227: 285–292
- Miller K.Y., Wu J.G., Miller B.L. (1992). *Stua* is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes and Development* 6: 1770–1782
- Mudge A.M., Dill-Macky R., Dong Y., Gardiner D.M., White R.G., Manners J.M. (2006). A role for the mycotoxin deoxynivalenol in stem colonisation during crown rot disease of wheat caused by *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 73–85
- Ohara T., Tsuge T. (2004). *FoSTUA*, encoding a basic helix-loop-helix protein, differentially regulates development of three kinds of asexual spores, macroconidia, microconidia, and chlamydospores, in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic cells* 3: 1412–1422
- Pasquali M., Giraud F., Brochot C., Cocco E., Hoffmann L., Bohn T. (2010a). Genetic *Fusarium* chemotyping as a useful tool for predicting nivalenol contamination in winter wheat. *International Journal of Food Microbiology* 137: 246–253
- Pasquali M., Giraud F., Lasserre J.P., Planchon S., Hoffmann L., Bohn T., Renaut J. (2010b). Toxin induction and protein extraction from *Fusarium* spp. cultures for proteomic studies. *Journal of Visualized Experiments* doi: 10.3791/1690
- Proctor R.H., Hohn T.M., McCormick S.P. (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 593–601
- Ramirez-Zavala B., Dominguez A. (2008). Evolution and phylogenetic relationships of APSES proteins from Hemiascomycetes. *Federation of European Microbiological Societies* 8: 511–519
- Reverberi M., Ricelli A., Zjalic S., Fabbri A.A., Fanelli C. (2010). Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 899–911
- Sacristán S., García-Arenal F. (2008). The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular Plant Pathology* 9: 369–384
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Scherm B., Orrù M., Balmas V., Spanu F., Azara E., Delogu G., Hammond T.M., Keller N.P., Migheli Q. (2011). Altered trichothecene biosynthesis in *TR16*-silenced transformants of *Fusarium culmorum* influences the severity of crown and foot rot on durum wheat seedlings. *Molecular Plant Pathology* 12: 759–771

- Sigl C., Haas H., Specht T., Pfaller K., Kürnsteiner H., Zadra I. (2011). Among developmental regulators, *stuA* but not *brlA* is essential for Penicillin V production in *Penicillium chrysogenum*. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 972–982
- Skov J., Lemmens M., Giese H. (2004). Role of a *Fusarium culmorum* ABC transporter (*FcABC1*) during infection of wheat and barley. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64: 245–254
- Skovgaard K., Rosendahl S., O'Donnell K., Nirenberg H.I. (2003). *Fusarium commune* is a new species identified by morphological and molecular phylogenetic data. *Mycologia* 95: 630–636
- Stoldt V.R., Sonneborn A., Leuker C., Ernst J.F. (1997). *Efg1*, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO Journal* 16: 1982–1991
- Sudakin D.L. (2003). Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters* 143: 97–107
- Szécsi A. (1990). Analysis of pectic enzyme zymograms of *Fusarium* Species II. Comparison of polygalacturonase zymograms of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum*. *Journal of Phytopathology* 130: 188–196
- Taylor R.J., Secor G.A. (1998). An improved diffusion assay for quantifying the polygalacturonase content of *Erwinia* culture filtrates. *Phytopathology* 78: 1101–1103
- Teertstra W.R., Deelstra H.J., Vranes M., Bohlmann R., Kahmann R., Kamper J., Wosten H.A. (2006). Repellents have functionally replaced hydrophobins in mediating attachment to a hydrophobic surface and in formation of hydrophobic aerial hyphae in *Ustilago maydis*. *Microbiology* 152: 3607–3612
- Tong X.Z., Zhang X.W., Plummer K.M., Stowell K.M., Sullivan P.A., Farley P.C. (2007). *GcSTUA*, an APSES transcription factor, is required for generation of appressorial turgor pressure and full pathogenicity of *Glomerella cingulata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1102–1111
- Wagacha J.M., Muthomi J.W. (2007). *Fusarium culmorum*: infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection* 26: 877–885
- Wang H., Hwang S.F., Eudes F., Chang K.F., Howard R.J., Turnbull G.D. (2006). Trichothecenes and aggressiveness of *Fusarium graminearum* causing seedling blight and root rot in cereals. *Plant Pathology* 55: 224–230
- Ward M.P., Gimeno C.J., Fink G.R., Garrett S. (1995). *SOK2* may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Molecular and Cellular Biology* 15: 6854–6863
- Wu J., Miller B.L. (1997). *Aspergillus* asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating *stunted* gene expression. *Molecular and Cellular Biology* 17: 6191–6201
- Yin W., Keller N.P. (2011). Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *Journal of Microbiology* 49: 329–339

CAPITOLO III
MUTAGENESI MEDIATA DA TRASPOSONI NON AUTONOMI PER “ETICHETTARE” GENI
NEL PATOGENO DEL FRUMENTO *FUSARIUM CULMORUM*

5.1 Sintesi

In questa parte della tesi di dottorato di ricerca è stata valutata l'efficacia di un sistema di mutagenesi inserzionale a doppia componente basato sull'elemento trasponibile eterologo *mimp1* di *F. oxysporum*, che presenta caratteristiche proprie dei MITEs (miniature inverted-repeat transposable elements), un gruppo particolare di elementi trasponibili descritti inizialmente nelle piante e, successivamente, in molti altri organismi, inclusi i funghi filamentosi. L'elemento *mimp1* non è autonomo e in questo sistema viene trans-mobilizzato dalla trasposasi di *impala*.

Protoplasti fungini del ceppo altamente virulento e micotossigenico *F. culmorum* MCF 21 nit1, che presenta una mutazione stabile all'interno del gene endogeno della nitrato riduttasi, sono stati cotrasformati con due vettori: il plasmide pNm1H18 recante l'elemento trasponibile non autonomo *mimp1* inserito nel primo introne del gene *niaD* di *A. nidulans* e il plasmide pHEO62 recante la trasposasi *impalaE*, clonata tra il promotore *gpdA* e il terminatore *trpC* di *A. nidulans* insieme al marker di selezione *hph* che conferisce la resistenza all'igromicina B. Su un totale di 56 trasformanti ottenuti solo 38 hanno integrato entrambe i plasmidi. Un saggio fenotipico basato sul ripristino dell'attività nitrato riduttasica ha permesso il recupero di eventi di escissione in terreno minimo contenente nitrato come unica fonte di azoto. La frequenza di escissione non è stata molto alta, per ciascuna piastra sono stati isolati da un minimo di 5 a un massimo di 15 revertanti. Successive analisi PCR e Southern blot hanno mostrato che solo il cotrasformante M7 ha integrato il costrutto in copia unica e dei 61 revertanti analizzati ben 58 hanno reinsertito il trasposone *mimp1* con una frequenza pari al 97% dei casi. Una collezione di 1300 revertanti ottenuti dal cotrasformante monocopia M7 è stata saggiata su semenzali di frumento duro in serra per selezionare eventuali mutanti non patogeni o alterati nella loro patogenicità. L'analisi delle sequenze fiancheggianti la copia trasposta, ottenute mediante la tecnica splinkerette-PCR e analizzate con il software CLC Main Workbench v 6.01 sono state inserite nel "Fusarium graminearum genome database" disponibile presso il centro informazioni di Monaco per sequenze proteiche (MIPS) per ricercare sequenze omologhe e conoscere la distribuzione dell'elemento *mimp1* nei 4 cromosomi di *F. graminearum*. Analogamente a quanto in precedenza osservato in *F. graminearum* dal gruppo di ricerca coordinato dalla professoressa Daboussi, l'elemento non autonomo *mimp1* ha dimostrato di trasportare in

F. culmorum secondo un meccanismo di taglia e incolla in corrispondenza del dinucleotide TA, che viene duplicato dopo l'inserimento e di distribuirsi omogeneamente su tutti e 4 i cromosomi. Il trasposone si è reinserito in regioni geniche per il 23% (cioè, 14 su 61) e precisamente 10 volte in una fase aperta di lettura (ORF) e 4 volte in un introne. Solo un campione ha mostrato un'alta omologia con *F. verticillioides* e *F. oxysporum* e nessuna con *F. graminearum* mentre un altro non ha mostrato alcuna omologia con i genomi conosciuti e questo probabilmente sta a significare che si tratti di una regione genica esclusiva in *F. culmorum*.

Pertanto il sistema *mimp1/impala* ha permesso di individuare sia zone specifiche del genoma che geni coinvolti in processi metabolici che alterano il fenotipo di crescita di alcuni revertanti se fatti crescere in differenti condizioni di stress osmotico, salino e ossidativo. Nel revertante Y127, l'elemento trasponibile *mimp1* si è inserito nella fase aperta di lettura del gene fg 02321, uno dei geni coinvolti nella sintesi dell'aurofusarina. Nessuno dei revertanti saggiati in serra ha presentato una riduzione statisticamente significativa della virulenza e possiamo concludere che nessuno dei geni fino ad ora identificati con questa tecnica, in *F. culmorum*, svolge un ruolo chiave nella regolazione dei meccanismi di patogenicità.

Sulla base di queste osservazioni è possibile affermare che questo sistema di mutagenesi e marcatura genica è perfettamente funzionante nella specie eterologa *F. culmorum* in quanto presenta una elevata potenzialità, sia per la frequenza di reinserzione, sia per la possibilità di generare mutazioni sull'intero genoma, senza nessuna preferenza di inserzione. Pertanto rappresenta uno strumento promettente per lo sviluppo di un efficiente sistema di marcatura in questo patogeno.

TRANSPOSITION OF THE MINIATURE INVERTED-REPEAT TRANSPOSABLE ELEMENT *MIMP1* IN THE WHEAT PATHOGEN *FUSARIUM CULMORUM*

Spanu¹ F., Pasquali² M., Scherm¹ B., Balmas¹ V., Marcello¹ A., Hoffman² L., Dufresne³ M., Daboussi⁴ M.J., Migheli¹ Q.

¹Dipartimento di Protezione delle Piante - Unità di ricerca Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Università degli Studi di Sassari, Via E. De Nicola 9, I-07100 Sassari, Italy. ²CRP - Gabriel Lippmann, 41, rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg. ³Institut de Biologie des Plantes, Bâtiment 630 et ⁴Institut de Génétique et Microbiologie, Bâtiment 400, Université Paris Sud 11, F-91405 Orsay Cedex, France.
E-mail: qmigheli@uniss.it

ABSTRACT

The genome of *Fusarium culmorum*, incitant of crown and foot rot on wheat and type B tricothecene producer, is now being sequenced. The number of predicted genes is estimated to exceed 10,000 and for many of them the function is still unknown. Consequently, there is a strong need for a high-throughput method for functional genomic analysis. Our aim was to test the efficacy of a double component system based on the ability of the *impala* transposase to transactivate the miniature inverted-repeat transposable element *mimp1* of *Fusarium oxysporum*. In this paper we report for the first time on the application of a tagging system based on an heterologous transposon and on the application of the splinkerette-PCR to identify the flanking region of transposon in the filamentous fungus *F. culmorum*. Similarly to what was previously observed in *Fusarium graminearum*, *mimp1* was shown to transpose in *F. culmorum* by a cut-and-paste mechanism into TA dinucleotides, which are duplicated upon insertion. Our results also show that *mimp1* reinserts in an open reading frame in 16.4 % (i.e., 10 over 61) of the flanking sequences analysed, spanning throughout the entire genome of *F. culmorum*. Therefore the *mimp1/impala* double-component system is an efficient tool for gene tagging in *F. culmorum* as confirmed phenotypically for a putative aurofusarin gene. This system allowed also to identify two genes putative involved in oxidative stress coping capabilities in *F. culmorum* as well as a specific sequence to this fungus suggesting the valuable exploratory role of this tool.

Key-words: Transposon tagging, filamentous fungi, splinkerette-PCR, heterologous transposon, *Triticum durum*, crown and foot rot

INTRODUCTION

F. culmorum (W.G. Smith) Sacc. is an ubiquitous soil-borne fungus able to cause crown and foot rot (CFR) and head blight (FHB) especially in durum wheat (Corazza *et al.*, 2002; Wagacha and Muthomi, 2007; Beccari *et al.*, 2011). Commonly, *F. culmorum* is a heterothallic fungus and has no known sexual stage (Mishra *et al.*, 2003; Toth *et al.*, 2004; Kerényi *et al.*, 2002). In the absence of host or under adverse environmental condition *F. culmorum* lives as a saprophyte several crop residues. Since chlamydospores can persist in soil for months. Together with *F. graminearum* Schwabe (teleomorph *Gibberella zeae*) and *F. pseudograminearum* O'Donnell and Aoki (teleomorph *Gibberella coronicola*), *F. culmorum* is the main pathogen of wheat in the

world (Wagacha and Muthomi, 2007; Wang *et al.*, 2006; Goswami e Kistler, 2004). *F. culmorum* can be considered a mesophilic fungus and the optimum conditions for its development and aggressiveness are dry soils, water stress of plant hosts, warm temperature and moisture during the infection stages (Balmas *et al.*, 2006; Doohan *et al.*, 2003). In Italy, *F. culmorum* is predominant in the central and Southern areas where climatic conditions are always predisposing crown and foot rot (Cariddi *et al.*, 1990; Strunnikova *et al.*, 2000). The propagules are usually dispersed by rain splash, by wind and sometimes through animals (Parry *et al.*, 1995; Osborne *et al.*, 2007). *F. culmorum* produces type B trichothecenes such as deoxynivalenol (DON), nivalenol and zearalenone which are secondary metabolites of filamentous fungi. Mycotoxins that are present in food and feed at high concentrations may cause in humans and animals serious poisoning (Marasas *et al.*, 1984; Goswami and Kistler, 2004; McMullen *et al.*, 2003; Sudakin, 2003). Recently, in *F. culmorum* Scherm *et al.* (2011) have determined that DON plays an important role in pathogenicity and disease virulence in crown and foot rot.

Currently, the genome of *F. culmorum* is being sequenced but for many genes the function is yet unknown. Its genome seems to consist of over 10,000 genes distributed over 5 chromosomes. Therefore, a high-throughput strategy for gene identification and for functional genomics analysis is needed.

Moreover, *F. culmorum* is a haploid filamentous fungus and random insertional mutagenesis or target gene mutation have been successfully used because the mutation of only one allele has an immediate effect on the phenotype.

Thus we decided to adopt a system for random insertional mutagenesis using heterologous transposons, referred to as “transposon tagging”. This was made possible after the discovery of active transposable elements in filamentous fungi (Daboussi and Capy, 2003). Transposon tagging is based on the obtainment of a mutant phenotype due to a transposon insertion into the gene promoter region or gene coding region which “tags” the gene of interest. The transposon flanking sequences obtained by PCR (TAIL-PCR, iPCR, splinkerette PCR) allow to identify the gene (Daboussi, 1996). The main advantage of this method is to clone genes whose function is unknown. In contrast to the Restriction enzyme mediated integration (REMI), the monocopy transformant is stable and can generate a virtually infinite number of revertants (Kuspa, 2006; Brown and Holden, 1998).

The transposable elements (TEs) of fungi are divided into two main classes by their mode of transposition and structural organization. Class I elements, called retroelements, transpose by a “copy-and-paste” mechanism by the reverse transcription of an RNA intermediate. Class II TEs, also called DNA transposons, a specific transposase flanked by two terminal inverted repeats (TIR) transpose directly from chromosome to chromosome through a DNA form by a “cut-and-paste” mechanism (Finnegan, 1989; Daboussi, 1997; de Lima Fávoro *et al.*, 2005).

Ten years ago the *mimp1* transposon has been identified in *F. oxysporum* (Hua-Van *et al.*, 2000). This element shows terminal inverted repeats (TIR) like the *impala* transposon and belongs to the *Tc1/mariner* superfamily. *mimp1* doesn't have a transposase gene and so it is incapable to move autonomously (Hua-Van *et al.*, 2000).

Recently a double component transposon tagging system based on the *mimp1* element trans-mobilized by the transposase of *impala* has shown exciting results in *F. graminearum*. The reinsertion frequency of *mimp1* was about 83-91% within or next to ORF/genes (Dufresne *et al.*, 2007; Dufresne *et al.*, 2008).

Our aim was to evaluate the functionality and effectiveness of the double component system *mimp1/impala* in *F. culmorum*. New acquired data and information will allow the characterization of genes involved in different physiological and metabolic processes of the fungus and to identify genomic regions yet unknown.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth condition

MCf 21 nit1 is a nitrate reductase-deficient mutant obtained from a highly virulent strain of *F. culmorum* (W.G. Smith) Sacc. (strain ISPaVe MCf 21 wild-type; syn. INRA 117), isolated in 1989 from triticale grown in Foggia, Apulia, Italy (Scherm *et al.*, 2011). The strain MCf 21 nit1

and cotransformant strains, derived from it, were routinely cultured on potato dextrose agar medium (PDA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Spore production was performed in Campbell's V8 liquid Vegetable juice (Giobbe *et al.*, 2007) or on carboxy-methyl cellulose liquid medium (CMC, Cappellini and Peterson, 1965) at 25°C with moderate shaking (120-150 rpm) for 3-4 days. Macroconidia and PDA plugs with mycelium were kept in glycerol at -80°C in the strain collection of Centro di Biodiversità Vegetale (CBV) of the University of Sassari. Phenotypic assay was performed on minimal medium agar Petri dishes amended with 50 µg/mL of hygromycin B (MM-nitrate H50, Migheli *et al.*, 2000) [2% (w/v) glucose, 7.3 mM KH₂PO₄, 2mM MgSO₄, 6.5 mM KCl, 36 mM FeSO₄, 23.5 mM NaNO₃]. Revertants deriving from the M7 monocopy cotransformant were checked by stress phenotypic analysis on complete medium plates (CM, Correll *et al.*, 1987), CM 1 M sorbitol, CM 0,01% SDS, CM 0,7% NaCl and CM 0,02% H₂O₂.

Cotransformation experiments

The *F. culmorum* MCf 21 nit1 has a putatively stable mutation in the endogenous gene of nitrate reductase and was cotransformed with two plasmids. The plasmid pNm1H18 carries the non autonomous *mimp1* element located in the first intron of the heterologous *niaD* gene of *Aspergillus nidulans* (Maladier *et al.*, 1989) and the plasmid pHEO62 carries the *impalaE* trasposase, cloned between the *gpdA* promoter and the *trpC* terminator of *A. nidulans*, with the *hph* selectable marker conferring resistance to hygromycin B (Dufresne *et al.*, 2007) (**Figure1**).

The fungal protoplasts were obtained from macroconidia germinated on PDA. Typically, 12-14 plates of PDA medium were overlaid with a disk of sterile cellophane (model 583 Gel Dryer; Bio-Rad Hercules, CA, USA), inoculated with 10⁶ conidia of *F. culmorum* MCf nit1, and incubated at 25 °C for about 16-18 hours. Then, young thally were scraped from the cellophane surface using a sterile spatula and transferred into 2 Petri dishes (90 mm diam.) each one containing 10 mL of lysis solution consisting in 10 mg/mL of Lysing enzymes (L1492, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in MgSO₄ 1.2 M (pH 5.8) (Scherin *et al.*, 2011).

After 3-4 hours of incubation at room temperature and slow agitation (50-60 rpm) the protoplasts were purified according to Langin *et al.* (1990) and used directly in fungal cotransformation essentially as described in Migheli *et al.* (1996).

Selection of cotransformants

To verify if both plasmids were integrated in the *F. culmorum* MCf21 nit1 genome, a screening was performed on selective medium (PDA supplemented with 50-100 µg/mL of hygromycin B). After monospore culturing, hygromycin B-resistant transformants expressing the *hph* gene contained in the pHEO62 plasmid, were further checked by specific PCR analysis. Genomic DNA was prepared by a standard extraction method (Migheli *et al.*, 1996) from mycelium grown on 50 mL of V8 liquid Vegetable juice. The integration of pNm1H18 was identified by PCR analysis using primers *niaD144* and *niaD754r* (Dufresne *et al.*, 2007) (**Table 1**). The PCR conditions were as follows: 94°C for 3 min, then 30 cycles of 94°C for 30 sec, 59°C for 45 sec and 72°C for 1 min, followed by a final elongation step at 72°C for 7 min. The PCR was performed with a GeneAMP system 9600 (Perkin-Elmer) in a total volume of 25 µL containing: 1X TopTaq™ DNA Polymerase amplification buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM of primer forward, 0.5 µM of primer reverse and 1U of TopTaq™ DNA Polymerase and 50 ng of DNA (DNA Polymerase kit Qiagen S.p.A., Milan, Italy).

Phenotypic assay for *mimp1* excision

The cotransformants were tested using a phenotypic assay to easily recovered the excision events on minimal medium containing sodium nitrate as nitrogen source amended with 50 µg/mL of hygromycin B (MM-nitrate H50). One-hundred µL of a spore suspension (10⁶-10⁷ CFU/mL) were spatulated onto the selective solid medium. The spore suspension was obtained by a filtered fungal culture grown on V8 liquid Vegetable juice after two washings with sterile distilled water. Four mycelium plugs (0.5 cm diam.) for each cotransformant were inoculated in 30 mL of V8 liquid Vegetable juice at 25°C with gentle shaking (100 - 120 rpm) for 5 days.

An alternative method used to perform the phenotypic assay was to transfer on the surface of substrate 4 tufts of filamentous mycelia of each cotransformant.

The MM-nitrate H50 plates were incubated at 25°C up to 1 month. The first events of excision usually appear after 15 days of incubation (**Figure1**).

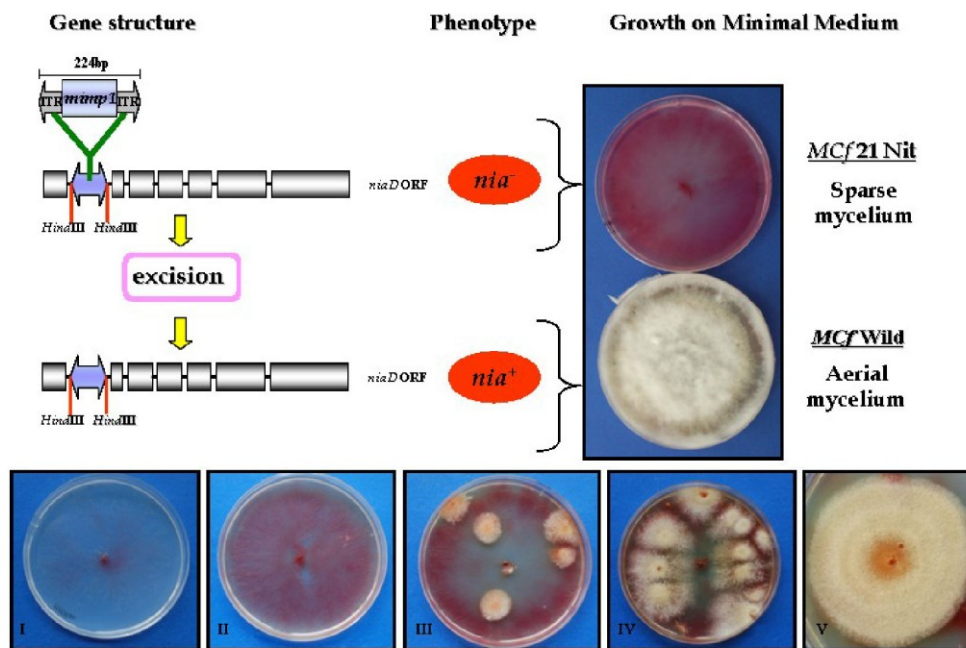


Figure 1: Phenotypic assay of transformed MCf 21 nit strains on Minimal Medium (MM-nitrate) with NO_3 as sole nitrogen source (I-V). Excision events lead to reacquisition of the nitrate-reductase activity, hence leading to a spot with aerial growth of mycelium. The so called “revertant strain” is then to be analysed for the site of *mimp1* excision and reinsertion in the genome.

PCR and Southern blot analysis of cotransformants and revertants

Selection for monocopy hygromycin B-resistant *mimp1/impala* cotransformants and identification of excision/reinsertion events were performed initially by PCR analysis for a rapid screening and then confirmed by Southern blotting experiments. At least one single-spore revertant strain deriving from each cotransformant was analysed.

PCR with primers *niaD144* and *niaD754r* (Dufresne *et al.*, 2007) (Table 1) allowed to identify excision events. The expected amplicon sizes for cotransformants and revertants were 717 bp and 493 bp, respectively (PCR conditions: see “Selection for cotransformants”). Further, PCR primers *mi1* and *SacF* (Dufresne *et al.*, 2007) (Table 1) were used to analyse the reinsertion events. Samples were denatured at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 sec, annealing at 59 °C for 30 sec and elongation at 72 °C for 1 min, with a final elongation step at 72 °C for 7 min. The amplicon size expected for revertants carrying the reinserted *mimp1* transposable element was 197 bp, and the MCf 21 nit1 was used as negative control.

For Southern blot analysis, 5 µg of each genomic DNA was digested at 37°C overnight with 50 units of *Xba*I (New England Biolabs, Beverly, USA) in a final volume of 100 µl, separated by electrophoresis on a 1.2% agarose gel and transferred to nylon membrane (Hybond-N Amersham Biosciences, GE Healthcare, USA) using a vacuum blotter (Model 785, Bio-Rad Laboratories, Italy) according to standard procedures (Sambrook *et al.*, 1989). The membrane was then hybridized and the specific probe was detected with Dig High Prime DNA labeling kit and detection starter II (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) as described in the manufacturer’s protocols.

To identify the excision of the transposable element *mimp1* from the *niaD* gene the membrane was labelled with a *niaD*-specific probe (size 419 bp). The probe was obtained by PCR using primers *niaCG1* and *niaCG2* (Dufresne *et al.*, 2007) (Table 1) on the pAN301 plasmid at the following condition: 94°C for 2 min, then 30 cycles of 94°C for 30 sec, 59°C for 30 sec and 72°C for 1 min, followed by a final elongation step at 72°C for 7 min. Reinsertion events were determined using the probe *mimp1* (120 bp) amplified from the pNm1h18 plasmid by using the primers *mi1* and *SacF* as described previously.

These analyses allowed us to evaluate the frequency of *mimp1* reinsertion events in the *F. culmorum* genome.

Table 1: List of primers used in this study

Identification of transformants by PCR	Primer sequence
niaD144	5'GTTTCATGCCGTGGTCGCGC3'
niaD754r	5'AGTTGGAATGTCCTCGTCG3'
mi1	5'TACAGTGGGATGCAATAAGTTTGAATAC3'
SacF	5'GGCTAGATCGAGCTCCCTCCTCAG3'
Probes	Primer sequence
mi1	5'TACAGTGGGATGCAATAAGTTTGAATAC3'
SacF	5'GGCTAGATCGAGCTCCCTCCTCAG3'
niaCG1	5'CACTAGTATGTGCAGGCAAC3'
niaCG2	5'GTTTGAATACCTTTTGATTTG3'
Splinkerette PCR	Primer sequence
SPLNK-BOT	5'CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACCGTGG CTGAATGAGACTGGTGTCGACACTAGTGG3'
SPLNK-GATC-TOP	5'GATCCCACTAGTGTGACACCAGTCTCTAATTT TTTTTTTCAAAAAA3'
SPLNK#1	5'CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACC3'
SPLNK#2	5'GTGGCTGAATGAGACTGGTGTCGAC3'
2R	5'CTGAGGAGGGAGCTCGATCTTAGCC3'
3R	5'GTAGCGTGGCTCAAAGAGGC3'
M1Div53F	5'GCCTCTTTGAGCCACGCTAC3'
SacF	5'GGCTAGATCGAGCTCCCTCCTCAG3'

Pathogenicity tests on wheat seedlings

A large-scale screening of 1,300 revertants obtained from the cotransformant M7 upon transposition of the *mimp1/impala* heterologous system was conducted to select those impaired in their pathogenic potential on durum wheat. Plugs of mycelium with one seed of durum wheat (*Triticum durum* cv. Claudio kindly provided by Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali, CRA-QCE, Rome, Italy) were placed into a plastic sowing pot and covered by sterile soil. Test was conducted in a greenhouse at 25-30°C and three weeks after inoculation the severity of disease was assessed using the McKinney index (McKinney, 1923; Balmas *et al.*, 2006). Revertants showing a McKinney index below 60% during a first pre-screening were tested again in three repetitions of 10 plugs each. The emergence of young seedlings and the severity of disease were monitored weekly during 4 weeks from sowing. The pathogenicity trend was evaluated by one-way analysis of variance, followed by multiple comparison applying the Dunnett's test, performed using Minitab® for Windows release 12.1 software.

Molecular analysis of insertion sites of *mimp1/impala*

To identify sequences flanking the reinserted *mimp1* element a splinkerette-PCR (sp-PCR) approach was used (Potter *et al.*, 2010). Briefly, genomic DNA (2.5 µg) was digested at 37°C for 4 h with 25 units of *Bam*HI or *Bgl*II restriction enzyme (New England Biolabs) in a final volume of 50 µl. These enzymes do not cut within the *mimp1* sequence. After purification by spin columns (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen S.p.A., Milan, Italy) (not necessary for *Bgl*II enzyme) 35 µl of the digestion were ligated to annealed splinkerette oligonucleotide with T4 DNA ligase (New England Biolabs) at room temperature for at least 2 hours. An annealing Splinkerette Oligonucleotide contains a compatible sticky end, a stable hairpin loop, and is unphosphorylated (Potter *et al.*, 2010). After ligation nested PCR was carried out directly according to the protocol described by Potter *et al.* (2010) using Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer (M0531L Biolabs New England, Beverly, USA). The primers used for

sp-PCR are listed in **Table 1**. To obtain the right flanking sequences of *mimp1* we have used the following primers: M1Div53F (annealing temperature: 63°C) in round 1 PCR and SacF (annealing temperature: 57°C) in round 2 PCR. Conversely, to know the left flanking sequences of transposon we have used the 2R primer (annealing temperature: 57.5°C) in round 1 PCR and 3R primer (annealing temperature: 63°C) in round 2 PCR. The PCR product contains the flanks of genomic DNA of interest between the transposon *mimp1* insertion site and the specific enzyme restriction site. Finally, the PCR products were separated by electrophoresis on a 1.2% agarose gel and, after purification, these were sequenced with BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and ABI Big Dye Terminator X purification kit (Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, CA, USA).

Bioinformatic analysis

Flanking regions were analysed with CLC Main Workbench v. 6.01 software (CLC bio, Aarhus, Denmark) using standard parameters. Sequences were then blasted in the “*Fusarium graminearum* genome database” available at Munich Information Centre for Protein Sequences (MIPS) (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/fusarium>) (Wong *et al.*, 2010) and in the *Fusarium* Comparative Database-Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/fusariumgroup/MuktiHome.html>) by algorithm BlastN or BlastX (Basic local alignment search tool; Altschul *et al.*, 1990) to screen for homologous sequences and to know the distribution of *mimp1* transposable element throughout the four chromosomes of *F. graminearum*. Blasting with the *Fusarium* Comparative Genomics Platform (FCGP) (Seogchan Kang’s Lab, *Fusarium* Research Center, and Fungal Bioinformatics Laboratory, Pennsylvania State University), allowed us to report on the supercontigs position established in MIPS database chromosome specific location. An excel conversion file was developed to position correctly the insertion sites. The FGsub (Sun *et al.*, 2010) and YLoc (Briesemeister *et al.*, 2010) (www.multiloc.org/YLoc) were used to predict *F. graminearum* protein subcellular localizations which were homologous of *F. culmorum*.

Test for phenotypic change

In order to characterize a putative role of genes tagged by the *mimp1* element in *F. culmorum*, 10 revertants carrying reinsertion events of *mimp1* within an open reading frame were grown in different metabolic conditions (osmotic stress, oxidative stress and thermal stress). Ten µL of a conidial suspension (10⁵ conidia/mL) were inoculated in the middle of Petri dishes. To test thermal stress resistance the strains were cultured on PDA at 33°C (maximum level tolerated by *F. culmorum*) in the dark for 10 days. Phenotypic analyses were carried out also on the following substrates: CM amended with 1 M sorbitol and CM amended with 0.7% NaCl (for osmotic stress), CM amended with 0.01% SDS and CM amended with 0.02% H₂O₂ (for oxidative stress). After inoculation, the Petri dishes were incubated at room temperature with a photoperiod of 12 hours for 3-5 days. The growth of each revertant was estimated by measuring the diameter of the colony. All experiments were conducted in triplicate at least twice.

A one-way analysis of variance followed by multiple comparison applying the Dunnett’s test at 95% of confidence level were carried out with Minitab® for Windows release 12.1 software.

RESULTS

Obtainment of cotransformants *mimp1/impala* and their molecular analysis

The PCR analysis conducted with primers *niaD754r* and *niaD144* (**Table 1**) showed that 38 out of 56 cotransformants had integrated in their genome the *mimp1/impala* construct. The cotransformants showed identical phenotypes compared to *F. culmorum* MCf 21 *nia*⁻ (nia⁻ colony) when grown on MM without hygromycin B. The transposition of the transposon element allowed the reacquisition of nitrate-reductase and the *nia*⁺ colonies (called revertant strains) were easily detected as patches of aerial mycelium with a wild-type phenotype. Only the cotransformant M7 among the 38 tested in the pre-screening showed a monocopy of the *niaD::mimp1* construct. The frequency of excision events, observed in several independent phenotype assay, was about 5 to 15 revertants per each inoculated plates. Southern blot analysis confirmed the monocopy insertion and the *nia*⁺ phenotype in 11 revertants of M7

(Figure 2A). The revertants showed a single *niaD* band of 1.7 kb, 200 bp shorter than the corresponding band of the cotransformant (approximately 1.9 kb), thereby demonstrating the excision of *mimp1* from the nitrate reductase gene (Figure 2A).

Frequency of reinsertion events

Sixty-one randomly chosen revertants obtained from the M7 cotransformant were checked by specific PCR with primers mi1 and SacF (Table 1) to estimate the rate of reinsertion frequency. In 97% of tested cases (i.e., 58 over 61 revertants) the *mimp1* reinserted in different parts of the genome. PCR results were confirmed by Southern blotting analysis for 11 revertants. Hybridization with the *mimp1* probe evidenced when an excision event was followed by the reinsertion of the *mimp1* element (Figure 2B).

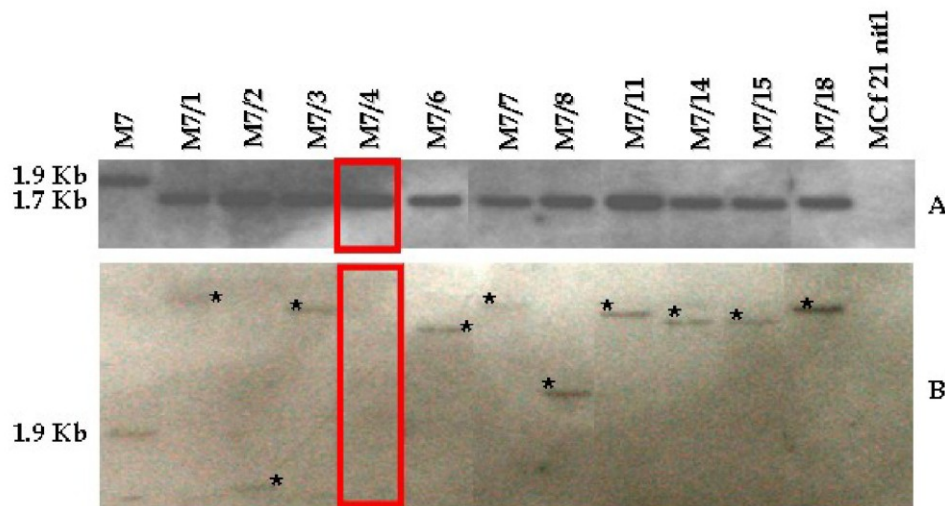


Figure 2: Southern blot analysis of revertants *mimp1/impala*. Genomic DNA of cotransformant M7 and the respective revertants were digested by *Xba*I and membranes were successively probed with a 419 bp-long *niaD*-probe (A) and with a 120 bp long *mimp1*-specific (B) probe. The asterisks indicate the reinsertion sites of the *mimp1* element in different loci of the genome. In lane 5 (red rectangle) the excision of *mimp1* was not followed by a reinsertion event.

Flanking sequence analysis and distribution of *mimp1* transposon in the *Fusarium graminearum* genome

The splinkerette-PCR proved to be an excellent method to identify and clone the flanking sequences of *mimp1* transposon. The sp-PCR set after a digestion enzyme with *Bgl*II to amplify the flanking region showed an efficiency of 71% (43 out of 61) while using *Bam*HI digestion enzyme efficiency was lower (54%; 33 out of 61). The average size of *Bgl*II splinkerette products was 1,700 bp while it was 1,000 bp with *Bam*HI. *Mimp1* distribution was calculated based on the similarity with the *F. graminearum* genome, being the *F. culmorum* genome not yet available. Its distribution was even throughout the entire genome all four chromosomes. *Mimp1* transposes in *F. culmorum* by a “cut-and-paste” mechanism into TA dinucleotides, which are duplicated upon insertion in all sites sequenced (Figures 3A and 3B).

Detailed bioinformatic analysis showed that *mimp1* was reinserted within genic regions in 23% (i.e., 14 over 61) of the flanking sequences analysed, and namely 10 times within an open reading frame (ORF) and 4 times within an intron (Figure 4). Furthermore, the insertion sites of *mimp1* in *F. graminearum* genome were observed for 19 times close to 500 bp at upstream or downstream of a gene region, 20 times at a distance greater than 1000 bp and 6 times between 1000 and 500 bp (Figure 4). The identity between *F. culmorum* sequences and *F. graminearum* genome, determined in percentage, was 95.5% indicating conserved protein structure and function. Only two flanking sequences did not show any homology with *F. graminearum* genome. The flanking sequence of revertant M7/14 showed homology with *F. verticillioides* 7600 genome and to a lesser extent with *F. oxysporum* 4287 genome, while one of the sequences (revertant 12A) displayed no homology with any known genome, indicating that it

might be a specific putative sequence of *F. culmorum* (Table 2). As reported in Table 2, the transposon was inserted within or near a gene encoding a “hypothetical protein” or “conserved hypothetical protein” in most cases. One *mimp1* reinsertion was in the homologue of *aurO* gene, one out of eleven genes involved in the biosynthesis process of aurofusarin with rubrofusarin as an intermediate in *F. graminearum* (Table 2) (Frandsen *et al.*, 2006; 2011).

All the flanking sequences were deposited in the Genome sequence Service database from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbGSS/>).

Pathogenicity test

In order to determine whether the trans-activated *mimp1* element moved into a promoter region or into a putative ORF involved in the pathogenic process or in other physiological traits relevant during infection, a collection of 1,300 revertants was tested on durum wheat seedlings. In a preliminary screening, only a small group of 32 revertants showed a moderate reduction of disease incidence which was related to higher seedling emergence. The weekly trend of other two independent experiments did not confirm a slower symptom appearance, which was related to slower seedling emergence, but this difference was flattened definitely at the third-fourth week (Figure 5). Therefore no significant *mimp1* insertion could be linked to the pathogenicity phenotype unequivocally.

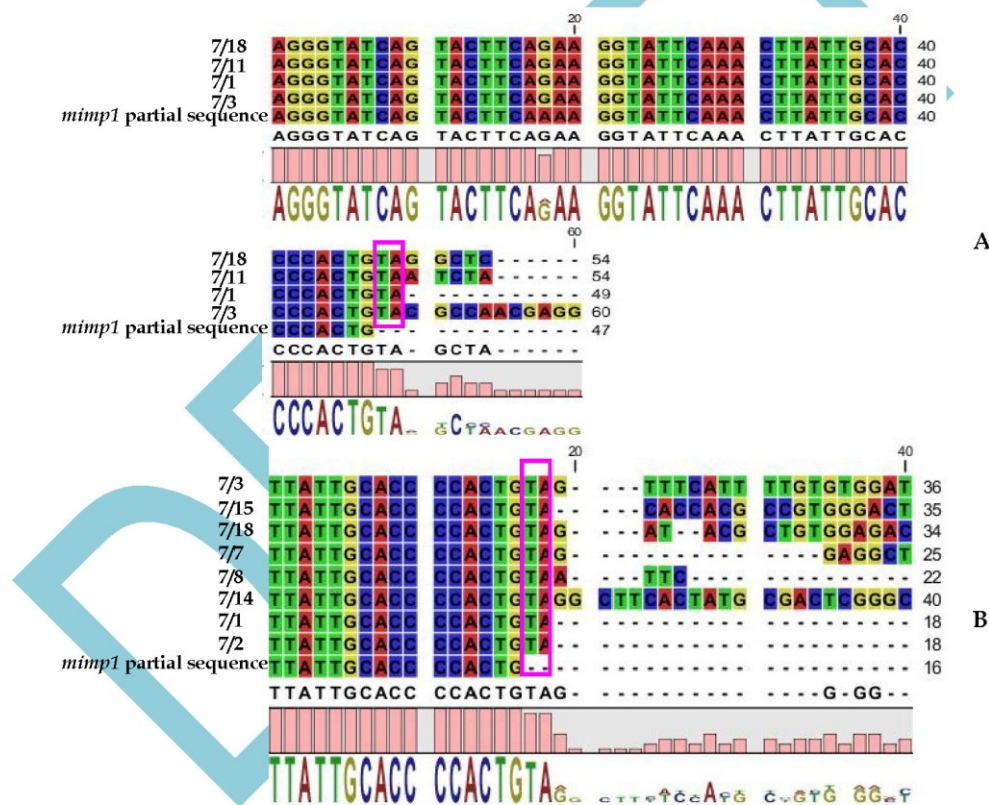


Figure 3: Insertion site preference of *mimp1* in a cut-and-paste mechanism into TA dinucleotides (pink boxes). Alignments on the right (A) and on the left (B) flanking sequence of some revertants and *mimp1* partial sequence are shown.

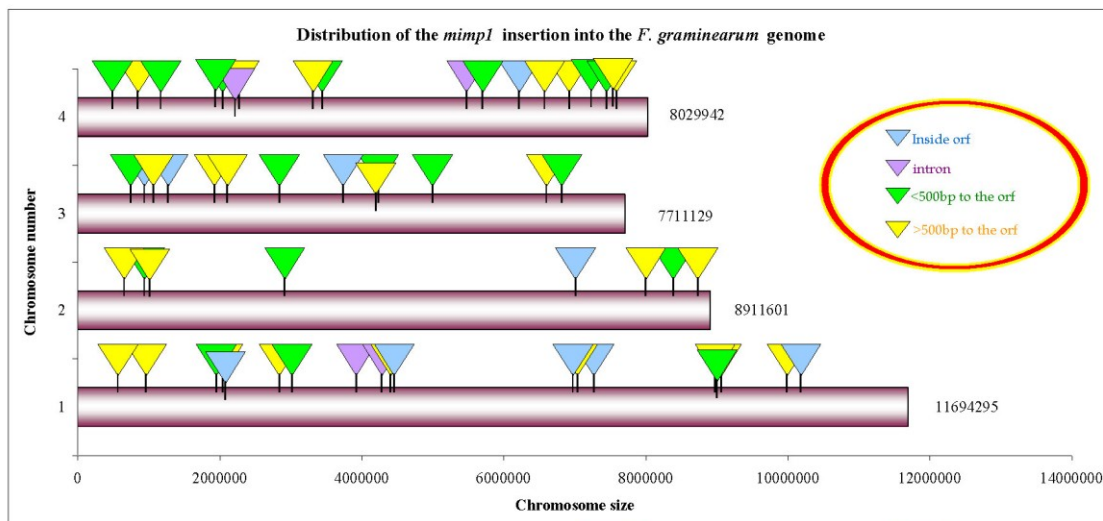


Figure 4: Reinsertion of *mimp1* into the genome of *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*). The transposon reinserted evenly in all four chromosomes of *G. zeae* and was located in 23% of the analysed flanking regions within an ORF or an intron.

Screening of revertants for phenotypic changes

In the thermal stress assay we have first identified the maximum level of temperature (33°C) at which *F. culmorum* is able to grow. Revertants strains grown on PDA at 33°C showed substantial growth reduction (1 cm of diameter after 10 days of incubation) similar to the cotransformant M7 therefore no temperature resistant mutants could be identified. On the contrary the system *mimp1/impala* has allowed to identify genes involved in metabolic processes that alter the phenotype of growth of some revertants developed under different stress conditions (osmotic and oxidative stress). The *mimp1* inactivation of gene *aurO*, homologous of *F. graminearum* (fg 2321), caused an accumulation of rubrofusarin, an intermediate of biosynthetic pathway of aurofusarin as observed in strain Y127. When grown on various substrates (PDA, CM amended with 1 M sorbitol and CM amended with 0.7% NaCl, CM added with 0.01% SDS and CM added with 0.02% H₂O₂) Y127 developed a yellow-orange colour mycelium probably due to the shift of the rubrofusarin/aurofusarin ratio (Malz *et al.*, 2005; Frandsen *et al.*, 2006).

Revertants Y4 and Y203 were altered in their growth properties if grown under stress oxidative condition (CM containing 0.02% of H₂O₂). Both of them showed a significant increased of diametral growth after 3 days of incubation at room temperature (Y4= 3.0 ± 0.0 cm; Y203= 2.37 ± 0.40 cm) compared to the reference strain M7 (1.30 ± 0.20 cm).

Bioinformatics analysis showed that in Y4 *mimp1* was inserted within a gene homologous to *F. graminearum* fg 5107 containing a trans-membrane domain conserved in other fungi but not present in yeast. *F. graminearum* protein subcellular localizations (FGsub) analysis showed that the fg 5170 is predicted to be a Golgi or endosome protein. Flanking region analysis of Y203 allowed to identify a conserved hypothetical protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* YFL061w, a metal dependent phosphohydrolase domain expressed in yeast and conserved in all fungi. Function is unknown in pathogenic fungi. Furthermore no secure localization for this gene could be predicted using both of FGsub and Interpretable Subcellular Localization Prediction (YLoc), despite YLoc suggested cytoplasmic localization at a very low confidence level (0.05).

Table 2: Reinsertion sites of the transposable element *mimp1* and homology identities in *F. graminearum* genome

Revertants	Sequence length and identify (%)	>1000bp	1000-500 bp	< 500bp	ORF of gene	Intron of gene	Predicted function
Y26	399 bp (96%)					fg 09054	related to dimethylaniline monooxygenase
Y15	172 bp (98%)	1530 bp to fg 13051					hypothetical protein
Y119	630 bp (96%)				fg 04993		conserved hypothetical protein
Y19	280 bp (97%)		708 bp to fg 00279				conserved hypothetical protein
Y201	558 bp (92%)			278 bp to fg 04913			related to beta-glucosidase
Y20	261 bp (95%)	4037 bp to fg 05037					conserved hypothetical protein
Y122	666 bp (96%)		788 bp to fg 05046				conserved hypothetical protein
Y126	690 bp (98%)	1683bp to fg 00605					conserved hypothetical protein
Y132	531 bp (87%)			461bp to fg 08130			conserved hypothetical protein
Y111	596 bp (97%)	1613 bp to fg 06651					conserved hypothetical protein
Y116	586 bp (98%)			417 bp to fg 13305			hypothetical protein
Y107	718 bp (97%)			50 bp to fg 13619			conserved hypothetical protein
Y108	717 bp (98%)				fg 10216		related to potassium channel beta subunit protein
Y112	419 bp (98%)			493 bp to fg 05677			conserved hypothetical protein
Y113	455 bp (98%)	1576 bp to fg 13909					hypothetical protein
Y11	564 bp (97%)			159 bp to fg 15384			hypothetical protein
Y120	275 bp (98%)	1863 bp to fg 09523					conserved hypothetical protein
Y121	312 bp (96%)					fg 15840	hypothetical protein
Y124	231 bp (96%)			419 bp to fg 06297			related to protein tyrosine phosphatase phi
Y127	381 bp (98%)				fg 02321		oxidoreductase that catalyses the conversion of dimeric 9-hydroxyrubrofusarin to aurofusarin

Continue Table 2

Revertants	Sequence length and identifi (%)	>1000bp	1000-500 bp	< 500bp	ORF of gene	Intron of gene	Predicted function
Y130	572 bp (98%)	1520 bp to fg 09717					related to RING3 kinase
Y131	823 bp (96%)			496 bp to fg 07390			conserved hypothetical protein
Y134	452 bp (98%)	1136 bp to fg 01307					related to GATA transcription factor
Y135	416 bp (97%)			298 bp to fg 17290			hypothetical protein
Y9	319 bp (97%)				fg 13553		hypothetical protein
Y16	502 bp (89%)	2132 bp to fg 00140					related to ankyrin 3
Y203	447 bp (97%)				fg 05897		conserved hypothetical protein
M7/18	1239 bp (98%)			493 bp to fg 17519			related to beta transducin-like protein
M7/15	841 bp (97%)	1118 bp to fg 08811					translation elongation factor 1 alpha
M7/11	986 bp (93%)			143 bp to fg 02893			related to protein-arginine deiminase type II
M7/7	780 bp (93%)			29 bp to fg 09135			conserved hypothetical protein
M7/8	631 bp (96%)		739 bp to fg 08710				probable septin aspE
M7/1	458 bp (97%)			152 bp to fg 11788			hypothetical protein
M7/2	230 bp (95%)	1134 bp to fg 12526					hypothetical protein
M7/3	1285 bp (97%)			437 bp to fg 11855			conserved hypothetical protein
13A	696 bp (92%)	1173 bp to fg 02128					conserved hypothetical protein
11A	887 bp (98%)				fg 00620		probable ammonium transporter MEPa
9A	517 bp (98%)	1254 bp to fg 16476					hypothetical protein
1A	401 bp (98%)			184 bp to fg 09610			conserved hypothetical protein
5A	827 bp (96%)		971 bp to fg 11623				conserved hypothetical protein
6A	479 bp (96%)			286 bp to fg 06546			conserved hypothetical protein

Continue Table 2

Revertants	Sequence length and identify (%)	>1000bp	1000-500 bp	< 500bp	ORF of gene	Intron of gene	Predicted function
8A	85 bp (96%)	1609 bp to fg 16595					probable phosphoglyceromutase
Y562	934 bp (97%)				fg 02115		related to <i>TRI7</i> trichothecene biosynthesis gene cluster
Y560	1003 bp (96%)	1372 bp to fg 09422					related to C-term. of <i>A. nidulans</i> regulatory protein (qutR)
Y424	920 bp (98%)			209 bp to fg 09682			conserved hypothetical protein
Y261	923 bp (98%)	3316 bp to fg 13126					hypothetical protein
Y420	444 bp (98%)				fg 01325		conserved hypothetical protein
Y558	517 bp (98%)					fg 13050	hypothetical protein
Y336	918 (98%)	1718 bp to fg 11775					hypothetical protein
Y29	519 bp (98%)	1536 bp to fg 09716					related to DNA repair protein rhp55
Y27	303 bp (97%)	1820bp to fg 00846					related to suppressor protein PSP1
Y30	639 bp (93%)				fg 03409		related to L-fucose permease
Y28	727 bp (92%)		638 bp to fg 09913				related to dityrosine transporter
Y22	691 bp (95%)			297 bp to fg 06060			related to ferric reductase FRE2 precursor
Y33	330 bp (97%)					fg 11910	hypothetical protein
Y6	257 bp (94%)	1476 bp to fg10135					conserved hypothetical protein
Y4	343 bp (98%)				fg 05107		conserved hypothetical protein
Y32	339 bp (92%)		811 bp to fg 09882				related to short-chain alcohol dehydrogenase
Y25	336 bp (99%)			430 bp to fg 06980			hypothetical protein
12A	No significant similarity found in the standard databases						
7/14	high homology with <i>F. verticillioides</i> 7600 and <i>F. oxysporum</i> 4287						

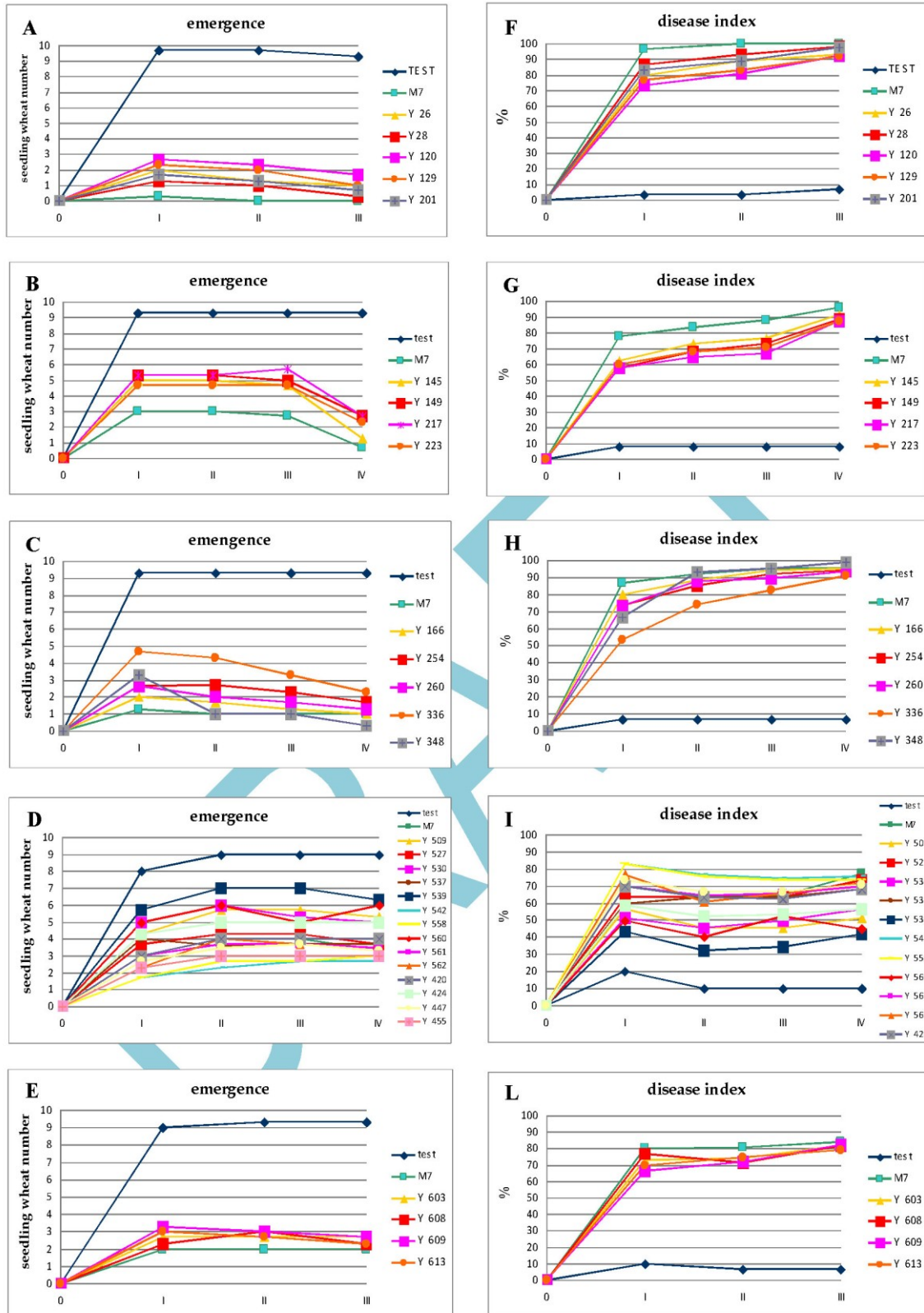


Figure 5: Emergence of durum wheat seedlings (cv Claudio) and *Fusarium* crown and root rot disease index (weekly trend). *F. culmorum* M7 cotransformant and 32 *mimp1/impala* revertants were analysed to evaluate the emergence (A-B-C-D-E) and the disease incidence (F-G-H-I-L) during I-II-III-IV weeks. For the controls non-inoculated seeds were applied into a plastic sowing pot. After 3 to 4 weeks of incubation at 25°C the difference between the M7 cotransformant and the revertants was flattened.

DISCUSSION

In the present work we aimed at investigating the efficiency of a transposon tagging approach based on the double component *mimp1/impala* for labeling and identification of genomic regions in the wheat pathogen *F. culmorum* strain ISPaVe MCF 21 wild-type; syn. strain INRA 117 (Boutigny *et al.*, 2010; Scherm *et al.*, 2011; Aleandri *et al.*, 2008). The genome of *F. culmorum* has not been yet completely sequenced and there is a strong need to develop high efficiency systems allowing the obtainment of several mutants by a single integration event. Transposon tagging, which allows random distribution of the transposable element throughout the whole genome, facilitates the recovery of mutations and should guarantee the smallest number of errors due to rearrangement during insertion (Daboussi and Capy, 2003).

Over a total of 38 cotrasformants obtained from the nitrate reductase mutant MCF 21 nit1, only cotransformant M7 had integrated a single copy of the construct and was therefore selected as a model of investigation. The system *mimp1/impala* in *F. culmorum* showed a high frequency of excision (5-10 revertants per plate inoculated with 1×10^6 spores), which has contributed to obtain a collection of 1,300 revertants from a single transformation event, similar to that observed for the same construct in *F. oxysporum* and *F. graminearum* by Dufresne *et al.* (2007; 2008) and for the *impala* element of *F. oxysporum* in *Penicillium griseoroseum* (de Queiroz *et al.*, 2003). Comparing our results with those of previous studies carried out in heterologous systems, we can say that the frequency of excision is determined by the number of spores inoculated on minimal medium and/or by the characteristics of the transformant and the insertion site, as in the case of *Magnaphorte grisea* (Villalba *et al.*, 2000), and *A. nidulans* (Li Destri Nicosia *et al.*, 2001). It is also noteworthy that in *Aspergillus fumigatus* the temperature can affect the frequency of excision events (Firon *et al.*, 2003).

A very high proportion (97% of the tested revertants) of reinsertion rate followed excision of the *mimp1* element, similar to that observed in *F. graminearum* (Dufresne *et al.*, 2008) but higher than what previously shown in other systems based on the use of the transposable element *impala* (Migheli *et al.*, 2000; de Queiroz *et al.*, 2003; López *et al.*, 2009; Hua Van *et al.*, 2001; Li Destri Nicosia *et al.*, 2001), where the frequency of reinsertion was around 50-75%. Therefore, in *F. culmorum* the dual component system *mimp1/impala* has the potential to be a high-performance system.

Cloning of sequences flanking the *mimp1* element in 61 revertants chosen randomly allowed us to identify the insertion site within the genome of *F. graminearum*. In the present study, the splinkerette-PCR system (Potter *et al.*, 2010), was applied for the first time in the filamentous fungus *F. culmorum*, as an alternative technique to the inverse-PCR (Ochman *et al.*, 1988) and TAIL-PCR (Liu and Whittier, 1995). Analyses conducted in parallel with the splinkerette-PCR and the TAIL PCR (data not shown) proved that the first is a powerful and efficient method for transposon mapping in *F. culmorum*, as it was previously shown by Potter *et al.* (2010), who applied this technique successfully to map the *P-* and *piggyBac* elements in *Drosophila*.

The heterologous transposon *mimp1* was distributed evenly throughout all four chromosomes that represent the genome of *F. graminearum*, without showing any preference for the insertion locus. In *F. graminearum*, a previous analysis of 91 independent transposition events revealed that the *mimp1* element reinserted in a single locus on chromosome 2 for 19 times (Dufresne *et al.*, 2008). The absence of "hot spots", lately detected also in the mobilization of the element *imp160::pyrG* in 200 *niaD* revertants of *A. fumigatus* (Carr *et al.*, 2010) increases the efficiency of this system in *F. culmorum*.

The analysis of the reinsertion sequences confirmed that also in *F. culmorum* the *mimp1* element (which is activated by the transposase of *impala*) transposes with a mechanism of "cut and paste" at the nucleotide doublet TA, which is duplicated upon insertion, similarly to that observed in the *Tc1/mariner* superfamily (Plasterk *et al.*, 1999).

In contrast to that described for other elements of the *MITEs* superfamily (Santiago *et al.*, 2002), *mimp1* showed a greater propensity for non-coding regions of the genome by inserting in only 16% of the tested cases in an open reading frame. Nevertheless, it is important to note that a similar behavior has been observed in other tagging approaches mediated by heterologous transposons of the *Tc1/mariner* superfamily in the ascomycete fungus *A. nidulans* (Li Destri Nicosia *et al.*, 2001) and in the basidiomycete *Ustilago maydis* (Ladendorf *et al.*, 2003). The propensity of transposons not to fit in a heterologous DNA/RNA coding region has been attributed to multiple epigenetic silencing mechanisms such as RIP (repeat-induced point mutation), MIP (methylation-induced premeiotically) and quelling. These gene silencing

mechanisms may represent host defence strategies to prevent genome invasion by transposable elements (Daboussi and Capy, 2003). Reactions of this type were also observed in plasmid-mediated transformation (Diallinas and Scazzocchio, 1989; Tilburn *et al.*, 1990). Another plausible explanation for this behavior may be related to structural features of DNA that can influence the choice of the insertion site, as observed in one of the most active *Tc1/mariner* transposons in vertebrates (*Sleeping Beauty*; Vigdal *et al.*, 2002). We think that such mechanisms may be active also in *F. culmorum* as our analysis showed that for 31% of the transposition events, the transposon was inserted at less than 500 bp upstream or downstream of a gene.

The comparative analysis of sequences flanking the transposon with the genome of *F. graminearum* revealed over 95% homology, with the exception of revertants 7/14 (high sequence identity with the genomes of *F. verticillioides* 7600 and of *F. oxysporum* 4287) and 12A (no homology with genomes currently sequenced).

The proof of the effectiveness of the double component system *mimp1/impala* comes from the fact that the gene *aurO*, homologous of *F. graminearum* (fg 2321), which has been interrupted by *mimp1*, presents an alteration of its expression as the mutant no longer produces aurofusarin but rubrofusarin (Frandsen *et al.*, 2006; 2011), when subjected to various metabolic stresses, as confirmed by the change of color of the mycelium grown on solid substrate.

Based on what we observed for the *aurO* gene we can say that the *mimp1/impala* transposon tagging approach allowed us to identify two genes of unknown function, both potentially involved in the resistance to oxidative stress. The first one is the gene homologous to *F. graminearum* (fg 5170), conserved in other fungi but unknown in terms of structural and functional features in yeast, which probably expresses a protein of the Golgi or the endosome. The second one is a gene encoding a conserved hypothetical protein homologous to the protein YFL061w in yeast and conserved in all fungi, but whose function is unknown in phytopathogenic fungi (Heo *et al.*, 2004; Jelinsky *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2008).

Quite regrettably, the *mimp1/impala* system has not been so far decisive in the identification of genes involved in the pathogenicity of *F. culmorum*. A pathogenicity assay carried out with over 1,300 revertants tested in greenhouse on durum wheat seedlings has never led to the identification of putative mutants able to induce reduced or null crown and foot rot symptoms on the host plant. A far larger collection of putative mutants would be probably needed to increase the probability for *mimp1* tagging a gene region relevant to pathogenicity: in the case study examined by López *et al.* (2009), conducted in *F. oxysporum*, over a collection of 2,072 revertants only one had integrated the *impala160::GFP* construct in an open reading frame implicated in virulence on tomato.

To strengthen and improve the effectiveness of this tool we are now evaluating the use of an inducible promoter in the double component, to allow the obtainment of revertants stable over time due to greater control of the exogenous source of transposase. Encouraging results have been observed in the use of a copper-inducible promoter from *Histoplasma capsulatum* (Gebhart *et al.*, 2006).

Taken together, our results show that the transposon tagging approach with the *mimp1/impala* double component system, in addition to be an efficient method for randomly marking genes in *F. culmorum*, as it allowed us to map genes and gene sequences not yet described, is a powerful mutagenesis tool, hence useful for the functional analysis of its genome. Further validation of the double component system will be performed once the complete genome sequence shall be available, in order to understand the role and function of tagged genes with respect to the pathogenicity and mycotoxigenic potential of this pathogen.

REFERENCES

- Aleandri M.P., Magro P., Chilosi G. (2008). Influence of environmental pH modulation on efficiency of apoplastic PR proteins during *Fusarium culmorum*-wheat seedling interaction. *Plant Pathology* 57: 1017–1025
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410

- Balmas V., Delogu G., Esposito S., Rau D., Migheli Q. (2006). Use of a complexation of tebuconazole with β -cyclodextrin for controlling foot and crown rot of durum wheat incited by *Fusarium culmorum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 480–484
- Beccari G., Covarelli L., Nicholson P. (2011). Infection processes and soft wheat response to root rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology* 60: 671–684
- Boutigny A.L., Atanasova-Pénichon V., Benet M., Barreau C., Richard-Forget F. (2010). Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis *in vitro* by repressing *Tri* gene expression. *European Journal of Plant Pathology* 127: 275–286
- Briesemeister S., Rahnenführer J., Kohlbacher O. (2010). YLoc—an interpretable web server for predicting subcellular localization. *Nucleic Acids Research* 38: W497–W502
- Brown J.S., Holden D.W. (1998). Insertional mutagenesis of pathogenic fungi. *Current Opinion in Microbiology* 1: 390–394
- Cappellini R.A., Peterson J.L. (1965). Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57: 962–966
- Cariddi C., Catalano M. (1990). Water stress and *Fusarium culmorum* infections on durum wheat. *Phytopathologia Mediterranea* 29: 51–55
- Carr P.D., Tuckwell D., Hey P.M., Simon L., d'Enfert C., Birch M., Oliver J.D., Bromley M.J. (2010). The transposon *impala* is activated by low temperatures: use of a controlled transposition system to identify genes critical for viability of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 9: 438–448
- Corazza L., Balmas V., Santori A., Vitale S., Luongo M., Maccaroni M. (2002). Head blight and foot rot of wheat in Italy. *Petria* 12: 25–36
- Correll J.C., Klittich C.J.R., Leslie J.F. (1987). Nitrate non-utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77: 1640–1646
- Daboussi M.J. (1996). Fungal transposable elements: Generators of diversity and genetic tools. *Journal of Genetics* 75: 325–339
- Daboussi M.J. (1997). Fungal transposable elements and genome evolution. *Genetica* 100: 253–260
- Daboussi M., Capy P. (2003). Transposable elements in filamentous fungi. *Annual Review of Microbiology* 57: 275–299
- de Lima Fávaro L.C., de Araújo W.L., de Azevedo J.L., Paccola-Meirrelles L.D. (2005). The biology and potential for genetic research of transposable elements in filamentous fungi. *Genetics and Molecular Biology* 28: 804–813
- de Queiroz M.V., Daboussi M.J. (2003). *Impala*, a transposon from *Fusarium oxysporum*, is active in the genome of *Penicillium griseoroseum*. *FEMS Microbiology Letters* 218: 317–321
- Diallinas G., Scazzocchio C. (1989). A gene coding for the uric acid-xanthine permease of *Aspergillus nidulans*: inactivational cloning, characterization, and sequence of a *cis*-Acting Mutation. *Genetics* 122: 341–350
- Doohan F.M., Brennan J., Cooke B.M. (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109: 755–768
- Dufresne M., Hua-Van A., Abdel Wahab H., Ben M'Barek S., Vasnier C., Teyssset L., Kema G.H.J., Daboussi M.J. (2007). Transposition of a fungal MITE through the action of a Tc1-like transposase. *Genetics* 175: 441–452
- Dufresne M., van der Lee T., Ben M'Barek S., Xu X., Zhang X., Liu T., Waalwijk C., Zhang W., Kema G.H.J., Daboussi M.J. (2008). Transposon-tagging identifies novel pathogenicity genes in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 45: 1552–1561

- Finnegan D.J. (1989). Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends in Genetics* 5: 103–107
- Firon A., Villalba F., Beffa R., D'Enfert C. (2003). Identification of essential genes in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* by transposon mutagenesis. *Eukaryotic Cell* 2: 247–255
- Frandsen R.J.N., Nielsen N.J., Maolanon N., Sørensen J.C., Olsson S., Nielsen J., Giese H. (2006). The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones. *Molecular Microbiology* 61: 1069–1080
- Frandsen R.J.N., Schutt C., Lund B.W., Staerk D., Nielsen J., Olsson S., Giese H. (2011). Two novel classes of enzymes are required for the biosynthesis of aurofusarin in *Fusarium graminearum*. *Journal of Biological Chemistry* 286: 10419–10428
- Fu Y., Zhu Y., Zhang K., Yeung M., Durocher D., Xiao W. (2008). Rad6-Rad18 mediates a eukaryotic SOS response by ubiquitinating the 9-1-1 checkpoint clamp. *Cell* 133: 601–611
- Gebhart D., Bahrami A.K., Sil A. (2006). Identification of a copper-inducible promoter for use in ectopic expression in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Eukaryotic Cell* 5: 935–944
- Giobbe S., Marceddu S., Scherm B., Zara G., Mazzarello V., Budroni M., Migheli Q. (2007). The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *FEMS Yeast Research* 7: 1389–1398
- Goswami R.S., Kistler H.C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5: 515–525
- Heo J.H., Jeong S.J., Seol J.W., Kim H.J., Han J.W., Lee H.W., Cho E.J. (2004). Differential regulation of gene expression by RNA polymerase II in response to DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325: 892–898
- Hua-Van A., Davière J.M., Langin T., Daboussi M.J. (2000). Genome organization in *Fusarium oxysporum*: clusters of class II transposons. *Current Genetics* 37: 339–347
- Hua-Van A., Pamphile J.A., Langin T., Daboussi M.J. (2001). Transposition of autonomous and engineered *impala* transposons in *Fusarium oxysporum* and a related species. *Molecular and General Genetics* 264: 724–731
- Jelinsky S.A., Samson L.D. (1999). Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 1486–1491
- Kerényi Z., Hornok L. (2002). Structure and function of mating type genes in *Fusarium* species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 49: 313–314
- Kuspa A. (2006). Restriction Enzyme-Mediated Integration (REMI) Mutagenesis. *Dictyostelium discoideum Protocols* 346 Part II
- Ladendorf O., Brachmann A., Kämper J. (2003). Heterologous transposition in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics* 269: 395–405
- Langin T., Daboussi M.J., Gerlinger C., Brygoo Y. (1990). Influence of biological parameters and gene transfer technique on transformation of *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics* 17: 313–319
- Li Destri Nicosia M.G., Brocard-Masson C., Demais S., Hua-Van A., Daboussi M.J., Scazzocchio C. (2001). Heterologous transposition in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 39: 1330–1344
- Liu Y.G., Whittier R.F. (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from *P1* and *YAC* clones for chromosome walking. *Genomics* 25: 674–681
- López-Berges M.S., Di Pietro A., Daboussi M.J., Wahab H.A., Vasnier C., Roncero M.I.G., Dufresne M., Hera C. (2009). Identification of virulence genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by large-scale transposon tagging. *Molecular Plant Pathology* 10: 95–107

- Maladier L., Daboussi M.J., Julien J., Roussel F., Scazzochio C., Brygoo Y. (1989). Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene* 78: 147–156
- Malz S., Grell M.N., Thrane C., Maier F.J., Rosager P., Felk A., Albertsen K.S., Salomon S., Bohn L., Schäfer W., Giese H. (2005). Identification of a gene cluster responsible for the biosynthesis of aurofusarin in the *Fusarium graminearum* species complex. *Fungal Genetics and Biology* 42: 420–433
- Marasas W.F.O., Nelson P.E., Toussoun T.A. (1984). Toxicogenic *Fusarium* species: identity and mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press, University Park, USA
- McKinney H.H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 26: 195–217
- McMullen M. (2003). Impacts of *Fusarium* Head Blight on the North American agricultural community: the power of one disease to catapult change. In: *Fusarium Head Blight of wheat and barley* (Leonard K.J., Bushnell W.R., eds), pp 484–503. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota
- Migheli Q., Friard O., Del Tedesco D., Musso M.R., Gullino M.L. (1996). Stability of transformed antagonistic *Fusarium oxysporum* strains *in vitro* and in soil microcosms. *Molecular Ecology* 5: 641–649
- Migheli Q., Steinberg C., Davière J.M., Olivain C., Gerlinger C., Gautheron N., Alabouvette C., Daboussi M.J. (2000). Recovery of mutants impaired in pathogenicity after transposition of *Impala* in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology* 90: 1279–1284
- Mishra P.K., Fox R.T.V., Culham A. (2003). Intersimple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long-range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Annals of Applied Biology* 143: 291–301
- Ochman H., Gerber A.S., Hartl D.L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621–623
- Osborne L.E., Stein J.M. (2007). Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals *International Journal of Food Microbiology* 119: 103–108
- Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology* 44: 207–238
- Plasterk R.H., Izsvak Z., Ivics Z. (1999). Resident aliens: the *Tc1/mariner* superfamily of transposable elements. *Trends in Genetics* 15: 326–332
- Potter C.J., Luo L. (2010). Splinkerette PCR for mapping transposable elements in *Drosophila*. *PLoSOne* 5: e10168
- Santiago N., Herráiz C., Goñi J.R., Messeguer X., Casacuberta J.M. (2002). Genome-wide analysis of the emigrant family of MITEs of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2285–2293
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Scherm B., Orrù M., Balmas V., Spanu F., Azara E., Delogu G., Hammond T.M., Keller N.P., Migheli Q. (2011). Altered trichothecene biosynthesis in *TR16*-silenced transformants of *Fusarium culmorum* influences the severity of crown and foot rot on durum wheat seedlings. *Molecular Plant Pathology* 12: 759–771
- Strunnikova O.K., Shakhnasarova V.Y., Vishnevskaya N.A. (2000). Influence of different soil conditions on *Fusarium culmorum*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Landind-Forstwirtschaft* 377: 76
- Sudakin D.L. (2003). Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters* 143: 97–107
- Sun C., Zhao X.M., Tang W., Chen L. (2010). FGsub: *Fusarium graminearum* protein subcellular localizations predicted from primary structures. *BMC Systems Biology* 4: S2–S12

- Tilburn J., Roussel F., Scazzocchio C. (1990). Insertional inactivation and cloning of the *wA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 126: 81–90
- Toth B., Mesterhazy A., Nicholson P., Teren J., Varga J. (2004). Mycotoxin production and molecular variability of European and American isolates of *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 587–599
- Vigdal T.J., Kaufman C.D., Izsvak Z., Voytas D.F., Ivics Z. (2002). Common physical properties of DNA affecting target site selection of *Sleeping Beauty* and other *Tc1/mariner* transposable elements. *Journal of Molecular Biology* 323: 441–452
- Villalba F., Lebrun M.H., Hua-Van A., Daboussi M.J., Grosjean-Cournoyer M.C. (2001). Transposon *impala*, a novel tool for gene tagging in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 308–315
- Wagacha J.M., Muthomi J.W. (2007). *Fusarium culmorum*: infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection* 26: 877–885
- Wang H., Hwang S.F., Eudes F., Chang K.F., Howard R.J., Turnbull G.D. (2006). Trichothecenes and aggressiveness of *Fusarium graminearum* causing seedling blight and root rot in cereals. *Plant Pathology* 55: 224–230
- Wong P., Walter M., Lee W., Mannhaupt G., Münsterkötter M., Mewes H.W., Adam G., Güldener U. (2010). FGDB: revisiting the genome annotation of the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Nucleic Acids Research* 39: 637–639

6. DISCUSSIONE GENERALE E PROSPETTIVE FUTURE

In Italia e nel mondo i cereali sono soggetti a numerose malattie di origine virale, batterica ma soprattutto fungina, che compromettono la produzione cerealicola sia dal punto di vista quantitativo, con ingenti perdite di raccolto, che dal punto di vista qualitativo e sanitario per la contaminazione della granella da micotossine. *F. culmorum* insieme a *F. graminearum*, *F. pseudograminearum* e *F. avenaceum* è uno dei principali agenti causali del “mal del piede” e della fusariosi della spiga nei cereali (Beccari *et al.*, 2011; Wagacha e Muthomi, 2007). Negli ultimi anni le ricerche condotte dalla comunità scientifica internazionale si sono incentrate in particolar modo su *F. graminearum* (Champeil *et al.*, 2004) e di recente il suo genoma è stato sequenziato (Cuomo *et al.*, 2007).

In *F. culmorum*, invece, il genoma è in fase di sequenziamento e troppo poco ancora si conosce sui determinanti della patogenicità del “mal del piede” e sul ruolo dei tricoteceni durante i processi di infezione e colonizzazione della pianta ospite. Con l’obiettivo di sviluppare metodi di lotta alternativi, che contengano i danni causati da questa malattia ad eziologia complessa, e di contribuire alla mappatura genetica del fungo, abbiamo deciso di valutare l’efficacia e l’efficienza di tre approcci molecolari complementari tra loro (silenzamento genico, gene knock-out mediante ricombinazione omologa e mutagenesi inserzionale mediata da trasposoni) in studi di genomica funzionale.

Il silenzamento genico e il gene knock-out hanno permesso di valutare quale fosse il ruolo di due geni già conosciuti in altre specie fungine, per la loro capacità di regolare alcuni processi di patogenicità, in *F. culmorum*.

Una collezione di mutanti derivati dall’integrazione di “inverted repeated transgenes” (IRT) del gene endogeno *TRI6* di *F. culmorum*, uno dei geni regolatori del pathway biosintetico dei tricoteceni che svolge un ruolo cruciale nella modulazione ed espressione del gene *TRI5*, ha consentito di indagare sull’interazione tra la produzione del deossivalenolo e l’aggressività del fungo nei confronti delle piantine di grano duro. Questo studio ha rappresentato la prima applicazione della tecnica di silenzamento genico in *F. culmorum*. Un approccio analogo è stato eseguito qualche anno prima da un gruppo di ricerca statunitense su *G. zeae* (McDonald *et al.*, 2005) dal

quale è emerso che quattro trasformanti *TRI6*-IRT hanno mostrato una ridotta virulenza e aggressività nello sviluppo della fusariosi della spiga in concomitanza a una minore produzione di deossinivalenolo.

In *F. culmorum*, nei trasformanti *TRI6*-IRT analizzati, a una ridotta espressione del gene *TRI5* quantificata mediante qRT-PCR corrispondeva una riduzione della produzione di deossinivalenolo e una diminuzione dell'aggressività del “mal del piede” in semenzali di frumento duro. Cinque trasformanti *TRI6*-IRT ottenuti dalla cotrasformazione del ceppo MCf 21 wild-type (255, 256, 257, 260, 282) e il trasformante *TRI6*-IRT 5 derivato dalla cotrasformazione del mutante MCf 21 nit1 si sono rivelati dei superproduttori di deossinivalenolo. Hanno prodotto ben 14-28 volte in più della quantità prodotta dai rispettivi ceppi selvatici, corrispondenti a 12-24 mg/mL di filtrato culturale. La sovraespressione di DON è stata seguita anche in questo caso da un aumento dell'espressione del gene *TRI5* e da una maggiore virulenza. Per quanto detto sopra risultavano piuttosto anomali i risultati di una sovraespressione del gene bersaglio corrispondente ad uno smear di frammenti degradati del gene *TRI6* visualizzati mediante analisi Northern o ad un intenso segnale di amplificazione mediante qRT-PCR. In un primo momento abbiamo ipotizzato che il promotore *gpdA* utilizzato nella costruzione del *TRI6*-IRT si fosse ricombinato con il gene endogeno *TRI6* di *F. culmorum* generando una serie di ceppi *gpdA-TRI6* ricombinati. Tuttavia l'analisi Southern blot con la sonda *TRI6* e il sequenziamento e l'analisi dei siti di restrizione del locus *TRI4-TRI6-TRI5* in *F. culmorum* hanno confermato che il locus *TRI6* era intatto e che la ricombinazione dell'IRT può verificarsi con una certa frequenza nel genoma di *F. culmorum* ma sorprendentemente il livello di silenziamento non è correlato con il numero di copie del costrutto IRT integrato nel genoma. Infatti i trasformanti derivati dal mutante MCf21 nit1 che hanno integrato una singola copia o un maggior numero di copie del plasmide pIMR13 hanno mostrato ugualmente una riduzione dell'espressione del gene *TRI5* e una minore produzione di deossinivalenolo. Solo nel caso del trasformante *TRI6*-IRT 5 l'integrazione del costrutto *TRI6*-IRT non ha generato cambiamenti evidenti nella biosintesi dei tricoteceni di tipo B. Una situazione analoga è stata osservata da Tanguay *et al.* (2006) in *Ophiostoma floccosum* e da Henry *et al.* (2007) in *Aspergillus fumigatus* e in entrambi i lavori sono stati messi in evidenza gli

svantaggi della tecnica del silenziamento genico rispetto ai metodi classici di sostituzione genica.

Pertanto, per la prima volta abbiamo mostrato oltre all'impiego del silenziamento genico in *F. culmorum* anche tutti i problemi ad esso connessi, che possono scaturire dall'imprevedibile integrazione nel genoma dell'IRT che ne riduce l'efficienza. Dai nostri risultati è emerso che anche i tricoteceni di tipo B come gli enzimi pectolitici (Aleandri *et al.*, 2007; Kang e Buchenauer, 2002) ricoprono un ruolo importante come regolatori di virulenza e per la prima volta si è osservato che il gene *TRI5* potrebbe rappresentare un buon bersaglio molecolare per lo sviluppo di fitofarmaci ad azione selettiva nel controllo del marciume basale del colletto.

La possibilità di controllare l'accumulo dei tricoteceni nei tessuti della pianta apre un nuovo scenario sullo sviluppo di varietà di cereali resistenti che riducono il rischio di contaminazione da micotossine per l'azione di composti endogeni della pianta (Boutigny *et al.*, 2008) oppure per l'attivazione del silenziamento di geni bersaglio nella pianta ospite (McDonald *et al.*, 2005). In alternativa, si potrebbero pianificare approcci di lotta biologica mediante l'impiego di mutanti silenziati atossigenici o a bassa virulenza. Quest'ultima strategia è stata applicata con successo per il controllo della produzione delle aflatossine in *Aspergillus flavus* attraverso l'esclusione competitiva per l'uso di isolati atossici (Cotty *et al.*, 2007). Naturalmente, prima di concepire un approccio di questo tipo è necessario fare un'attenta valutazione del rischio per garantire la stabilità del costrutto di silenziamento e per evitare la possibilità di eventi di ricombinazione indesiderati che possono coinvolgere il promotore costitutivo, il locus *TRI* o altri geni regolatori che agiscono sul cluster *TRI*. Anche se i nostri esperimenti sono stati condotti in laboratorio e in ambiente controllato la generazione di trasformanti iperproduttori di tossina e altamente virulenti apre un nuovo scenario per la definizione di un nuovo paradigma di biosicurezza negli esperimenti di silenziamento genico.

L'identificazione e la caratterizzazione funzionale di *FcstuA*, un fattore di trascrizione contenente un dominio APSES altamente conservato (Aramayo *et al.*, 1996), ha consentito di indagare sul ruolo di questo gene in *F. culmorum*.

FcstuA ha mostrato una forte omologia con *FgstuA* di *F. graminearum* e la mancanza di differenze significative tra le due catene amminoacidiche indica una struttura identica delle due proteine. Pertanto ci si aspettava che le differenze fenotipiche, osservate anche da Baldwin *et al.* (2010) fossero legate al genoma piuttosto che alle proprietà del gene stesso.

Le proteine APSES omologhe di *stuAp* di *Aspergillus nidulans* (Miller *et al.*, 1992) regolano numerosi processi metabolici, fisiologici e morfogenetici di diverse specie fungine (Ramirez-Zavala *et al.*, 2008). Per capire quale potesse essere la funzione del gene *stuA* in *F. culmorum* abbiamo eseguito una serie di analisi morfologiche e fisiologiche sui mutanti ottenuti mediante ricombinazione omologa che, come previsto, hanno mostrato un comportamento molto simile a quelli di *F. graminearum*. Infatti sia i mutanti *FcstuA* che i mutanti *FgstuA* erano incapaci di sintetizzare l'aurofusarina e altri pigmenti e presentavano un micelio raso e di colore bianco. È stato possibile confermare che la conidiogenesi è controllata da *FcstuA*, infatti, il gene ha un ruolo fondamentale nella formazione dei rami conidiofori e dei fialidi come dimostrato anche in altre specie fungine (Lysøe *et al.*, 2011; Borneman *et al.*, 2002; Ohara *et al.*, 2004). Interessante e significativa è la differenza emersa tra *F. graminearum* e *F.culmorum* riguardo la produzione di conidi. In *F. graminearum* i mutanti producevano chiaramente un numero inferiore di conidi rispetto a quelli prodotti dal ceppo wild-type pari ad un rapporto di 1:10000 rispetto al rapporto di 1:10 in *F.culmorum*, così come più marcata è risultata la differenza nella sintesi di micotossine *in vitro*. Nonostante la valutazione sia stata fatta su differenti substrati è emerso che in *F. graminearum* la produzione di deossivalenolo era inferiore all'1% rispetto al wild-type, mentre in *F. culmorum* la riduzione è stata meno incisiva (5-10%).

Questi risultati evidenziano il fatto che, nonostante i due geni omologhi presentino un'elevata identità, ambienti genetici diversi possono influenzare il fenotipo finale. In generale gli effetti di *FcstuA* sembrano essere meno estremi di quanto è stato osservato in *F. graminearum*.

Oltretutto il gene *stuA* in *F. culmorum*, analogamente a quanto osservato in altre specie di funghi fitopatogeni quali *F. graminearum* (Lysøe *et al.*, 2011), *Ustilago maydis* (Garcia-Pedrajas *et al.*, 2010), *Glomerella cingulata* (Tong *et al.*, 2007) e *Stagonospora nodorum* (Ipcho *et al.*, 2010) controlla fattori coinvolti nella regolazione dei

meccanismi di patogenicità e virulenza, contrariamente a quanto visto in *F. oxysporum*, agente causale del marciume radicale, dove la delezione del gene *stuA* non ha influenzato affatto le capacità patogene dei mutanti (Ohara e Tsuge, 2004).

Dato il diverso ruolo svolto da *Fgstua* in *F. graminearum* e da *FostuA* in *F. oxysporum*, (i due geni omologhi più vicini a *F. culmorum*), abbiamo voluto studiare l'effetto di *Fcstua* in un diverso sistema di patogenicità ovvero il marciume basale del colletto su frumento duro.

Lo sviluppo di piante asintomatiche in prove condotte *in vivo* su semenzali di grano fatti crescere a contatto con i mutanti ottenuti da entrambi i ceppi wild-type utilizzati nel nostro studio ha dimostrato che *Fcstua* è essenziale per il controllo del “mal del piede” allo stesso modo in cui lo è stato per la fusariosi della spiga in *F. graminearum* (Lysøe *et al.*, 2011).

Dato che la virulenza è un processo complesso (Sácristan and Arena-García, 2008) che può essere influenzato da diversi meccanismi molecolari e visto che *stuA* pare abbia la capacità di regolare un numero elevato di geni in *F. graminearum* (Lysøe *et al.*, 2011) abbiamo confrontato il ruolo di *Fcstua* sia in un ceppo wild-type produttore di tossina che in uno non produttore. I mutanti derivati da entrambe i ceppi hanno mostrato una sensibile riduzione dei sintomi dovuta alla delezione del gene *stuA*.

È interessante notare come la capacità di produrre tossina seppur in piccoli quantitativi da parte dei mutanti $\Delta Fcstua$ di FcUK99 non abbia influito sulla manifestazione dei sintomi suggerendo così che il meccanismo di patogenicità potrebbe essere regolato da altri fattori controllati sempre dal gene *Fcstua*.

Inoltre i mutanti, a causa della delezione di *Fcstua*, rispetto al wild-type mostravano svariate differenze morfologiche quali crescita stentata su substrato solido, sulla superficie della cariosside e in mela, patata, pomodoro. Questo è stato ulteriormente confermato da osservazioni fatte al microscopio elettronico a scansione ambientale che hanno mostrato l'incapacità dei mutanti di attaccare e penetrare il seme. A conferma di quanto detto è interessante notare come un minor numero di conidi sia stato in grado di germinare in mezzo liquido, convalidando indirettamente che il gene *stuA* in *F. culmorum* influenza numerosi fattori di sviluppo (Borneman *et al.*, 2002). La scarsa idrofobicità della superficie del micelio è stata osservata anche in *P. chrysogenum* (Sigl *et al.*, 2011) dove i mutanti *stuA* mostravano ife affastellate (blunded) in superficie che

probabilmente riducevano l'effetto barriera consentendo alla goccia di acqua di permeare con più facilità. Osservazioni al microscopio SEM (dati non riportati) ci hanno permesso di escludere questa ipotesi e di spiegare la mancanza di idrofobicità del micelio nei mutanti $\Delta FcstA$ con il mancato sviluppo di ife aeree e di conseguenza con la scarsa produzione delle idrofobine (Teertstra *et al.*, 2006), come osservato in *F. graminearum* e *Glomerella cingulata* (Lysøe *et al.*, 2011; Tong *et al.*, 2007).

I mutanti $\Delta FcstA$ presentavano uno sviluppo vegetativo significativamente ridotto rispetto al wild-type se fatti crescere su substrato solido contenente lo 0,02% di H₂O₂. Anche in *F. graminearum* i mutanti $\Delta FgstA$ presentavano una significativa diminuzione della resistenza a stress ossidativi (Lysøe *et al.*, 2011). Dato che durante le fasi di colonizzazione dei tessuti vegetali è necessario che il patogeno abbia la capacità di far fronte allo stress ossidativo che deriva dai meccanismi di difesa delle piante, è probabile che i mutanti $FcstA$ non siano in grado di rispondere in maniera efficace alle sollecitazioni esterne. Si può ipotizzare che la mancata risposta agli stress ossidativi e l'incapacità di produrre tossine appartengano alla stessa via molecolare (Reverberi *et al.*, 2010) e che quindi *stuA* svolga un ruolo cruciale nel controllo dello stress ossidativo. Tuttavia sono necessarie ulteriori indagini a riguardo.

L'interesse nel conoscere i ruoli chiave del gene *stuA* nei meccanismi di patogenicità e i motivi per cui i mutanti abbiano perso la capacità di colonizzare i semi e le giovani plantule ci ha portato a indagare sulla produzione di poligalatturonasi, dato il loro ruolo fondamentale nella patogenicità (Kang and Buchenauer, 2000; Jaroszuk-Ścisiel *et al.*, 2011; Aleandri *et al.*, 2007; 2008). Risultati preliminari hanno attestato una invariata produzione di questi enzimi nei mutanti $FcstA$ rispetto ai ceppi wild-type e quindi si esclude l'ipotesi che il gene *stuA* regoli la secrezione dell'enzima pectolitico durante le fasi di infezione e colonizzazione della pianta ospite. Quindi è più probabile che i fattori determinanti nel controllo della patogenicità nei mutanti $\Delta FcstA$ siano legati al modo di affrontare i meccanismi di difesa della pianta ospite.

In conclusione, questo lavoro rappresenta l'identificazione di un nuovo gene coinvolto nei meccanismi di patogenicità in *F. culmorum* che si aggiunge agli altri pochi geni conosciuti come importanti fattori di patogenicità in questa specie (Skov *et al.*, 2004; Baldwin *et al.*, 2010). Insieme a quanto osservato da Scherm *et al.* (2011) $FcstA$

rappresenta un nuovo fattore di patogenicità coinvolto nella malattia del “mal del piede” dei cereali.

Il nostro lavoro ha confermato, inoltre, che anche in *F. culmorum* *stuA* controlla diversi processi all'interno della cellula quali lo sviluppo morfologico, la capacità di produrre tossine e di affrontare gli stress ossidativi. L'uso di due ceppi wild-type che differiscono tra loro per la virulenza e la produzione di tossine ci ha permesso di dimostrare che la perdita della patogenicità da parte dei mutanti *stuA* non è semplicemente legata alla mancata produzione di tossine o di poligalatturonasi ma da altri meccanismi noti e sconosciuti che possono determinare la mancanza di sintomi.

Pertanto pensiamo che tra le cause che determinano l'incapacità dei mutanti *FcstuA* a reagire ai meccanismi di difesa della pianta potrebbe esserci la scarsa germinazione delle spore che diminuisce sensibilmente il potenziale di inoculo e l'ipersensibilità del mutante agli stress ossidativi.

In ultimo, per uno screening completo a 360° del genoma di *F. culmorum* abbiamo voluto indagare sull'efficienza di una versatile tecnica di mutagenesi, il “transposon tagging”, per la marcatura, caratterizzazione e identificazione di regioni genomiche non ancora conosciute in *F. culmorum*, vista la forte necessità di mettere appunto un sistema ad elevata efficienza che permetta di ottenere rapidamente una copiosa collezione di mutanti possibilmente a singola integrazione con distribuzione casuale dell'elemento nell'intero genoma, in modo da agevolare il recupero degli eventi di inserzione/reinserzione, e che garantisca il minor numero di errori dovuti al riarrangiamento durante le fasi di inserzione (Daboussi and Capy, 2003).

Su un totale di 38 cotrasformanti ottenuti dal ceppo ISPaVe MCf 21 (ceppo spesso utilizzato come modello di studio in altri lavori: Boutigny *et al.*, 2010; Scherm *et al.*, 2011; Aleandri *et al.*, 2008) mutato nel gene della nitrato reduttasi (MCf 21 nit 1) solo M7 ha integrato una singola copia del costrutto e pertanto è stato scelto come modello di indagine. Il sistema *mimp1/impala* in *F. culmorum* ha mostrato un'ottima frequenza di escissione (5-10 revertanti per ciascuna piastra inoculata con 10⁶ spore) che ha contribuito all'ottenimento di una collezione di 1300 revertanti a partire da un singolo evento di trasformazione, similmente a quanto osservato per lo stesso costrutto in *F. oxysporum* e in *F. graminearum* da Dufresne *et al.* (2007; 2008) e per l'elemento *impala* di *F. oxysporum* in *Penicillium griseoroseum* (de Queiroz *et al.*, 2003).

Confrontando i nostri risultati con quelli di studi precedenti effettuati sul trasposone *impala*, sia in sistemi omologhi che eterologhi, possiamo affermare che la frequenza di escissione è influenzata dal numero di spore inoculate su substrato minimale e/o dalle caratteristiche del trasformante e del sito di inserzione, come nel caso di *Magnaphorte grisea* (Villalba *et al.*, 2001) e di *Aspergillus nidulans* (Li Destri Nicosia *et al.*, 2001). Inoltre è interessante come in *A. fumigatus* la temperatura possa influenzare tale meccanismo (Firon *et al.*, 2003).

A un efficiente meccanismo di inserzione è seguita un'eccellente frequenza di reinserzione del costrutto *mimp1/impala*, pari al 97% dei casi, similmente a quanto osservato in *F. graminearum* (Dufresne *et al.*, 2008) ma superiore rispetto a quanto dimostrato in altri sistemi basati sull'impiego del trasposone *impala* (Migheli *et al.*, 2000; de Queiroz *et al.*, 2003; Lopéz *et al.*, 2009; Hua-Van *et al.*, 2001; Li Destri Nicosia *et al.*, 2001) che, invece, hanno presentato una frequenza di reinserzione intorno al 50-75%. Pertanto in *F. culmorum* il sistema a doppia componente *mimp1/impala* si è dimostrato un sistema ad alto rendimento. La clonazione di sequenze fiancheggianti il trasposone ha permesso di identificare in 61 revertanti scelti in maniera casuale il sito di reinserzione e la distribuzione di *mimp1* nel genoma di *F. graminearum*.

In questo studio è stata sviluppata, per la prima volta, in un fungo filamentoso la splinkerette-PCR, già impiegata con successo in *Drosophila* (Potter *et al.*, 2010), come tecnica alternativa all'inverse-PCR (Ochman *et al.*, 1988) e alla TAIL PCR (Liu and Whittier, 1995). Da analisi condotte in parallelo la sp-PCR rispetto alla TAIL PCR si è rivelata un potente ed efficiente metodo per la mappatura genica in *F. culmorum* (dati non riportati) così come visto da Potter *et al.* (2010) nei confronti della iPCR durante la mappatura degli elementi *P-* e *piggyBac* in *Drosophila*.

Il trasposone eterologo *mimp1* si è distribuito uniformemente su tutti e 4 i cromosomi che compongono il genoma di *F. graminearum* senza mostrare nessun *locus* genomico di preferenza ("hot spot"), diversamente da quanto è stato osservato in *F. graminearum* dove l'analisi di 91 eventi di trasposizione ha portato all'inserimento dell'elemento *mimp1* in un unico *locus* del cromosoma 2 per ben 19 volte (Dufresne *et al.*, 2008). L'assenza di "hot spot", rilevata di recente anche nella mobilitazione dell'elemento *imp160::pyrG* in 200 revertanti *niaD* di *Aspergillus fumigatus* (Carr *et al.*, 2010) aumenta l'efficienza del sistema.

Analogamente a quanto osservato nella superfamiglia *Tc1/mariner* (Plasterk *et al.*, 1999), *mimp1* (attivato dalla trasposasi di *impala*) traspone secondo un meccanismo di “taglia-incolla” sempre in corrispondenza del doppietto nucleotidico TA che viene duplicato durante la reinserzione.

In contrasto a quanto descritto per altri elementi della superfamiglia *MITEs* (Santiago *et al.*, 2002), *mimp1* ha mostrato una maggiore predisposizione per le inserzioni in regioni non codificanti del genoma inserendosi solo per il 16% dei casi (su 61 sequenze analizzate) in fasi di lettura aperte. Ciò nonostante, è importante sottolineare come in altri sistemi di trasposizione eterologa mediata da trasposoni della superfamiglia *Tc1/mariner*, impiegati nel fungo ascomicete *A. nidulans* (Li Destri Nicosia *et al.* 2001) e nel fungo basidiomiceta *Ustilago maydis* (Ladendorf *et al.*, 2003), siano stati riscontrati comportamenti analoghi. La propensione dei trasposoni eterologhi a non integrarsi in un DNA/RNA codificante è stata attribuita a diversi meccanismi di regolazione epigenetica, quali RIP (repeat-induced point mutation), MIP (methylation induced premeiotically) e “quelling”. Questi meccanismi possono rappresentare delle strategie di difesa dell’ospite per prevenire invasioni del genoma da parte di elementi trasponibili (Daboussi e Capy, 2003). Reazioni di questo tipo sono state osservate anche in trasformazioni mediate da plasmidi (Diallinas e Scazzocchio, 1989; Tilburn *et al.*, 1990). Un’altra spiegazione plausibile a questo comportamento potrebbe essere legata alle caratteristiche strutturali del DNA che possono influenzare la scelta del sito di inserzione, come osservato in uno dei più attivi trasposoni *Tc1/mariner* nei vertebrati (*Sleeping Beauty*, Vigdal *et al.*, 2002). Pensiamo che meccanismi di questo genere possano essere attivi anche in *F. culmorum* visto che dalle nostre analisi è emerso che per il 31% delle inserzioni, il trasposone si è inserito a una distanza inferiore a 500 bp a monte o a valle di un gene. L’analisi comparativa delle sequenze fiancheggianti il trasposone con il genoma di *F. graminearum* ha rivelato il 95,5% di omologia con la sola eccezione dei ceppi 7/14 (alta identità di sequenza soprattutto con il genoma di *F. verticillioides* 7600 ma anche con il genoma di *F. oxysporum* 4287) e del ceppo 12A (nessuna omologia riscontrata con i genomi attualmente sequenziati).

La prova dell’efficacia del sistema a doppia componente *mimp1/impala* deriva dal fatto che il gene *aurO*, omologo di *F. graminearum* (fg 2321), interrotto da *mimp 1* presenta un’alterazione della sua espressione in quanto non produce più aurofusarina ma

rubrofusarina (Fradsen *et al.*, 2006; 2011), se sottoposto a differenti stress metabolici, come osservato dal cambiamento di colore del micelio su substrato solido. Sulla base di quanto osservato per il gene *aurO* possiamo dire che la tecnica del transposon tagging mediante trasposone eterologo ci ha permesso di individuare la funzione di due geni sconosciuti. Si tratta di due geni potenzialmente coinvolti nello stress ossidativo. Uno è il gene omologo di *F. graminearum* (fg 5107) conservato in altri funghi ma sconosciuto sia dal punto di vista strutturale che funzionale nei lieviti, che probabilmente esprime una proteina dell'endosoma o del Golgi, e l'altro è un gene codificante per una conserved hypothetical protein omologa alla proteina YFL061w di lievito conservata in tutti i funghi ma la cui funzione è sconosciuta nei funghi fitopatogeni (Jelinsky *et al.*, 1999; Heo *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2008).

Tuttavia, in *F. culmorum*, il sistema *mimp1/impala* non è stato efficace nella individuazione di geni che codificano per fattori di patogenicità. L'analisi di 1300 revertanti saggiati in serra non ha portato all'isolamento di mutanti ridotti nella virulenza e aggressività del "mal del piede" nei semenzali di frumento duro e possiamo perciò affermare che nessuno dei geni o promotori "etichettati", in *F. culmorum*, svolge un ruolo chiave nella regolazione dei meccanismi di patogenicità. Sicuramente l'allestimento di collezioni più numerose è indispensabile per incrementare la probabilità che *mimp1* possa inserirsi in una regione genica e che questa a sua volta sia coinvolta nello sviluppo della malattia del "mal del piede". Basti pensare al recente caso di studio di López *et al.* (2009), condotto in *F. oxysporum*, dove, su una collezione di 2072 revertanti solo uno, effettivamente, aveva inserito la componente *impala160::gfp* in una fase aperta di lettura implicata nella virulenza su radici di pomodoro, per capire che questa ipotesi potrebbe essere convalidata.

Per potenziare e migliorare l'efficacia di questo strumento si sta valutando l'impiego di un promotore inducibile a doppia componente che permetta la produzione di revertanti stabili nel tempo grazie ad un maggiore controllo della fonte esogena di trasposasi da parte di un promotore costitutivo forte, visto anche gli incoraggianti risultati che sono stati osservati nell'uso del copper-inducibile promoter in *Histoplasma capsulatum* (Gebhart *et al.*, 2006).

In definitiva dai nostri risultati è emerso che la tecnica del "transposon tagging", in *F. culmorum*, oltre ad essere un efficiente metodo di marcatura casuale di geni, in quanto

ci ha permesso comunque di mappare geni e sequenze geniche non ancora conosciute nel genoma, è un ottimo sistema di mutagenesi dal momento che l'inserzione del trasposone annulla la funzione del gene bersaglio, dimostrandosi un potente strumento per l'analisi funzionale e un'ottima e valida strategia per la caratterizzazione del genoma di *F. culmorum*.

Ulteriori studi saranno effettuati sul genoma completo, una volta che questo sia reso disponibile alla comunità scientifica, per comprendere il ruolo e caratterizzarne la funzione di alcuni dei geni taggati (bersaglio) in *F. culmorum*.

In conclusione, tutti e tre i sistemi adottati se visti secondo prospettive e sfaccettature diverse ci hanno permesso di acquisire quante più informazioni possibili riguardo i geni coinvolti nelle principali funzioni che regolano il ciclo biologico del fungo ubiquitario del terreno *F. culmorum* e hanno altresì aperto numerosi spunti per studi futuri.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio l'AGRIS Sardegna-Agenzia per la ricerca in agricoltura, quale ente finanziatore della borsa di Dottorato.

Inoltre mi sembra doveroso ringraziare anche tutte le persone che mi hanno affiancato e sostenuto in questi anni piuttosto intensi.

Il primo ringraziamento va alla dott.ssa Scherm che mi ha introdotto nel mondo della biologia molecolare insegnandomi tutti i “trucchi del mestiere”.

Ringrazio il dott. Pasquali per avermi ospitato nel centro di ricerca Gabriel Lippmann, dove lavora, e per avermi insegnato tante di quelle cose che fogli interi non basterebbero.

Ringrazio tutto il meraviglioso gruppo di ricerca del Department Environment and Agro-biotechnologies del centro di ricerca Gabriel Lippmann per la loro gentilezza e disponibilità.

Ringrazio la dott.ssa Marcello per la sua disponibilità e il suo affetto.

Ringrazio il dott. Balmas per la sua gentilezza e disponibilità, per i suoi preziosi consigli e per le bellissime foto che hanno impreziosito questa tesi.

Molte grazie....

alla dott.ssa Giovanna Delogu del CNR di Sassari per il suo apporto scientifico;

alla sig.ra Emanuela Azara del CNR di Sassari per le analisi delle tossine mediante HPLC/MS;

al sig. Salvatore Marceddu per le foto scattate durante le osservazioni al microscopio ambientale.

Naturalmente un ringraziamento speciale va a prof. Migheli per avermi ospitato nel suo laboratorio e per la sua guida lungo tutto questo percorso. Ancora, GRAZIE, perché il mio bagaglio culturale, professionale e di esperienze è cresciuto veramente tanto!

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Adachi K., Nelson G.H., Peoples K.A., Frank S.A., Montenegro-Chamorro M.V., DeZwaan T.M., Ramamurthy L., Shuster J.R., Hamer L., Tanzer M.M. (2002). Efficient gene identification and targeted gene disruption in the wheat blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* using TAGKO. *Current Genetics* 42: 123–127
- Alabouvette C., Olivain C., Migheli Q., Steinberg C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist* 184: 529–544
- Aleandri M.P., Magro P., Chilosi G. (2007). Modulation of host pH during wheat-*Fusarium culmorum* interaction and its influence on pectolytic enzymes production and activity. *Plant Pathology* 56: 517–525
- Aleandri M.P., Magro P., Chilosi G. (2008). Influence of environmental pH modulation on efficiency of apoplastic PR proteins during *Fusarium culmorum*-wheat seedling interaction. *Plant Pathology* 57: 1017–1025
- Alexander N.J., Proctor R.H., McCormick S.P. (2009). Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews* 28: 198–215
- Aramayo R., Peleg Y., Addison R., Metzenberg R. (1996). *Asm-1⁺*, a *Neurospora crassa* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Genetics* 144: 991–1003
- Aziz N.H., Attia E.S., Farag S.A. (1997). Effect of gamma-irradiation on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat, flour and bread. *Nahrung* 41: 34–37
- Baggiolini M., Keller C. (1954). Les stades repères dans la végétation du blé. *Revue Romande d'Agriculture* 10: 17–20
- Bai G.H., Desjardins A.E., Plattner R.D. (2002). Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* 15: 91–98
- Baldwin T.K., Urban M., Brown N., Hammond-Kosac K. (2010). A role for topoisomerase I in *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* pathogenesis and sporulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 566–577
- Balmas V. (1992). Le fusariosi del frumento. *Informatore Fitopatologico* 9: 13–16
- Balmas V., Corazza L. (1994). *Fusarium graminearum* Gruppo 2 agente causale della scabbia del frumento duro nell'Italia Centrale. *Informatore Fitopatologico* 44: 59–62
- Balmas V., Zefelippo M., Corazza L. (1995). Fusariosi della spiga: una malattia sempre più frequente. *L'Informatore Agrario* 35: 55–57

Balmas V., Santori A., Corazza L. (1998). Fusariosi della spiga di frumento duro. *L'Informatore Agrario* 36: 53–55

Balmas V., Santori A., Corazza L. (2000). Le specie di *Fusarium* più comuni in Italia. *Petria* 10: 1–60

Balmas V., Delogu G., Esposito S., Rau D., Migheli Q. (2006). Use of a complexation of tebuconazole with β -cyclodextrin for controlling foot and crown rot of durum wheat incited by *Fusarium culmorum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 480–484

Bateman G.L., Gutteridge R.J., Gherbawy Y., Thomsett M.A., Nicholson P. (2007). Infection of stem bases and grains of winter wheat by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* and effects of tillage method and maize-stalk residues. *Plant Pathology* 56: 604–615

Beccari G., Covarelli L., Nicholson P. (2011). Infection processes and soft wheat response to root rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology* 60: 671–684

Bensassi F., Zaied C., Abid S., Hajlaoui M.R. (2010). Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat in Tunisia. *Food Control* 21: 281–285

Bernstein E., Caudy A.C., Hammond S.M., Hannon G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363–366

Blaney B.Y., Williams K.C. (1991). Effective use in livestock feeds of mouldy and weather-damaged grain containing mycotoxins-case histories and economic assessments pertaining to pig and poultry industries of Queensland. *Australian Journal of Agricultural Research* 42: 993–1012

Boeke J.D. (1989). Transposable elements in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Mobile DNA* (Burgh D.E., Howe M. eds), pp 335–374. ASM, Washington DC

Borneman A.R., Hynes M.J., Andrianopoulos A. (2002). A basic helix-loop-helix protein with similarity to the fungal morphological regulators, *Phd1p*, *Efg1p* and *StuA*, controls conidiation but not dimorphic growth in *Penicillium marneffeii*. *Molecular Microbiology* 44: 621–631

Bottalico A., Perrone G. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 611–624

Boutigny A.L., Richard-Forget F., Barreau C. (2008). Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *European Journal of Plant Pathology* 121: 411–423

Boutigny A.L., Atanasova-Pénichon V., Benet M., Barreau C., Richard-Forget F. (2010). Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis *in vitro* by repressing *Tri* gene expression. *European Journal of Plant Pathology* 127: 275–286

Buck W.B., Cote L.M. (1991). “Trichothecene mycotoxins” Toxicology of plant and fungal compounds. In: *Handbook of Natural Toxins* (Keeler R.F., Tu A.T., eds), vol 6 pp. 523–554. Marcel Dekker, New York

Bureau T.E., Wessler S.R. (1992). Tourist: a large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes. *Plant Cell* 4: 1283–1294

Burgess L.W., Liddell C.M., Summerell B.A. (1988). *Laboratory Manual for Fusarium Research, 2nd Edition*, pp. 156. Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology, University of Sydney, Australia

Butchko R.A.E., Plattner R.D., Proctor R.H. (2006). Deletion analysis of *FUM* genes involved in tricarballic ester formation during fumonisin biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9398–9404

Calvi B.R., Hong T.J., Findley S.D., Gelbart W.M. (1991). Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: *hobo*, *Activator*, and *Tam3*. *Cell* 66: 465–71

Capy P., Bazin C., Higuët D., Langin T. (1997). *Dynamic and evolution of transposable elements*. RG Landes Company, Austin, Texas, USA

Cariddi C., Catalano M. (1990). Water stress and *Fusarium culmorum* infections on durum wheat. *Phytopathologia Mediterranea* 29: 51–55

Cariddi C., Lops R., Grassi L. (1991). Distribuzione geografica di agenti causali di “mal del piede” su frumento duro in Puglia e Basilicata e criteri di difesa. *La Difesa delle Piante* 4: 3–12

Carr P.D., Tuckwell D., Hey P.M., Simon L., d’Enfert C., Birch M., Oliver J.D., Bromley M.J. (2010). The transposon *impala* is activated by low temperatures: use of a controlled transposition system to identify genes critical for viability of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 9: 438–448

Casacuberta E., Casacuberta J.M., Puigdomenech P., Monfort A. (1998). Presence of miniature inverted-repeat transposable elements (*MITEs*) in the genome of *Arabidopsis thaliana*: characterisation of the *emigrant* family of elements. *Plant Journal* 16: 79–85

Catlett N.L., Lee B.N., Yoder O.C., Turgeon B.G. (2003). Splitmarker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. *Fungal Genetics Newsletters* 50: 9–11

Cavret S., Lecoœur S. (2006). Fusariotoxin transfer in animal. *Food and Chemical Toxicology* 44: 444–453

- Chakraborty B.N., Patterson N.A., Kapoor M. (1991). An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 37: 858–863
- Chalvet F., Grimaldi C., Kaper F., Langin T., Daboussi M.J. (2003). *Hop*, an active *Mutator*-like element in the genome of the fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Biology and Evolution* 20: 1362–1375
- Champeil A., Dorè T., Fourbet J.F. (2004). *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science* 166: 1389–1415
- Clement J.A., Parry D.W. (1998). Stem-base disease and fungal colonisation of winter wheat grown in compost inoculated with *Fusarium culmorum*, *F. Graminearum* and *Microdochium nivale*. *European Journal of Plant Pathology* 104: 323–330
- Combièr 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 Microbiology Letters* 220: 141–148
- Corazza L., Balmas V., Chilosi G. (1987). Il mal del piede del frumento duro. *L'Informatore Agrario* 38: 75–76
- Corazza L., Balmas V., Pasquini M. (1989). La scabbia del frumento nell'Italia Centrale. *L'Informatore Agrario* 23: 45–47
- Corazza L., Balmas V. (1994). Le malattie fungine del frumento trasmesse attraverso il terreno. *Sementi Elette* 40: 39–43
- Cotty P.J., Antilla L., Wakelyn P.J. (2007). Competitive exclusion of aflatoxin producers: farmer driven research and development. In: *Biological Control: A Global Perspective* (Vincent C., Goettel M.S. and Lazarovits G., eds), pp. 241–253. CABI, Wallingford, Oxfordshire
- Coulombe R.A. (1993). Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science* 76: 880–891
- Covarelli L., Nicholson P. (2002). Identificazione dei patogeni responsabili del mal del piede del frumento mediante PCR. *Atti Giornate Fitopatologiche* 2: 449–454
- Cuomo C.A., Gueldener U., Xu J.R., Trail F., Turgeon B.G., Di Pietro A., Walton J.D., Ma L.J., Baker S.E., Rep M., Adam G., Antoniw J., Baldwin T., Calvo S., Chang Y.L., DeCaprio D., Gale L.R., Gnerre S., Goswami R.S., Hammond-Kosack K., Harris L.J., Hilburn K., Kennell J.C., Kroken S., Magnuson J.K., Mannhaupt G., Mauceli E., Mewes H.W., Mitterbauer R., Muehlbauer G., Muensterkoetter M., Nelson D., O'Donnell K., Ouellet T., Qi W.H., Quesneville H., Roncero M.I.G., Seong K.Y., Tetko I.V., Urban M., Waalwijk C., Ward T.J., Yao J., Birren B.W., Kistler H.C. (2007). The

Fusarium graminearum genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* 317: 1400–1402

Daboussi M.J., Langin T., Brygoo Y. (1992). *Fot1*, a new family of fungal transposable elements. *Molecular and General Genetics* 232: 12–16

Daboussi M.J. (1996). Fungal transposable elements: Generators of diversity and genetic tools. *Journal of Genetics*. 75: 325–339

Daboussi M., Capy P. (2003). Transposable elements in filamentous fungi. *Annual Review of Microbiology* 57: 275–299

Davidson R.C., Cruz M.C., Sia R.A., Allen B., Alspaugh J.A., Heitman J. (2000). Gene disruption by biolistic transformation in serotype D strains of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology* 29: 38–48

de Groot M.J., Bundock P., Hooykaas P.J., Beijersbergen A.G. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 16: 839–842

de Lima Fávaro L.C., de Araújo W.L., de Azevedo J.L., Paccola-Meirelles L.D. (2005). The biology and potential for genetic research of transposable elements in filamentous fungi. *Genetics and Molecular Biology* 28: 804–813

de Queiroz M.V., Daboussi M.J. (2003). *Impala*, a transposon from *Fusarium oxysporum*, is active in the genome of *Penicillium griseoroseum* *FEMS Microbiology Letters* 218: 317–321

Desjardins A.E., Hohn T.M., McCormick S.P. (1993). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 57: 595–604

Desjardins A.E., Proctor R.H. (2001). Biochemistry and genetics of *Fusarium* toxins. In: *Fusarium* (Summerell B.A., Leslie J.F., Backhouse D., Bryden W.L., Burgess L.W. ed), pp. 50–69. Paul E. Nelson Memorial Symposium. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota

Desjardins A.E. (2006). Fumonisin. In: *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology* (Desjardins A.E., ed), pp. 79–108. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota

Diallinas G., Scazzocchio C. (1989). A gene coding for the uric acid-xanthine permease of *Aspergillus nidulans*: inactivational cloning, characterization, and sequence of a *cis*-acting mutation. *Genetics* 122: 341–350

Doohan F.M., Brennan J., Cooke B.M. (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109: 755–768

- Dufresne M., Hua-Van A., Abdel Wahab H., Ben M'Barek S., Vasnier C., Teysset L., Kema G.H.J., Daboussi M.J. (2007). Transposition of a fungal *MITE* through the action of a *Tc1*-like transposase. *Genetics* 175: 441–452
- Dufresne M., van der Lee T., Ben M'Barek S., Xu X., Zhang X., Liu T., Waalwijk C., Zhang W., Kema G.H.J., Daboussi M.J. (2008). Transposon-tagging identifies novel pathogenicity genes in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 45: 1552–1561
- Emmons S.W., Yesner L., Ruan K.S., Katzenberg D. (1983). Evidence for a transposon in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 32: 55–65
- Eriksen G.S., Pettersson H. (2004a). Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 114: 205–239
- Eriksen G.S., Pettersson H., Lundh T. (2004b). Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food and Chemical Toxicology* 42: 619–624
- Feschottes C., Zhang X., Wessler S.R. (2002). Miniature inverted-repeat transposable elements and their relationship to established DNA transposons. In: *Mobile DNA II*. (Craig N.L., Craigie R., Gellert M., Lambowitz A.M. eds), pp 1147–1158. ASM, Washington DC
- Finnegan D.J. (1989). Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends in Genetics* 5: 103–107
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811
- Firon A., Villalba F., Beffa R., D'Enfert C. (2003). Identification of essential genes in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* by transposon mutagenesis. *Eukaryotic Cell* 2: 247–255
- Frandsen R.J.N., Nielsen N.J., Maolanon N., Sørensen J.C., Olsson S., Nielsen J., Giese H. (2006). The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones. *Molecular Microbiology* 61: 1069–1080
- Frandsen R.J.N., Schutt C., Lund B.W., Staerk D., Nielsen J., Olsson S., Giese H. (2011). Two novel classes of enzymes are required for the biosynthesis of aurofusarin in *Fusarium graminearum*. *Journal of Biological Chemistry* 286: 10419–10428
- Fu Y., Zhu Y., Zhang K., Yeung M., Durocher D., Xiao W. (2008). Rad6-Rad18 mediates a eukaryotic SOS response by ubiquitinating the 9-1-1 checkpoint clamp. *Cell* 133: 601–611

- Gale L.R., Harrison S.A., Ward T.J., O'Donnell K., Milus E.A., Gale S.W., Kistler H.C. (2011). Nivalenol-type populations of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* are prevalent on wheat in Southern Louisiana. *Phytopathology* 101: 124–134
- García-Pedrajas M.D., Baeza-Montañez L., Gold S.E. (2010). Regulation of *Ustilago maydis* dimorphism, sporulation, and pathogenic development by a transcription factor with a highly conserved APSES Domain. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 211–222
- Gebhart D., Bahrami A.K., Sil A. (2006). Identification of a copper-inducible promoter for use in ectopic expression in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Eukaryotic Cell* 5: 935–944
- Gelderblom W.C.A., Jaskiewicz K., Marasas, W.F.O., Thiel P.G., Horak R.M., Vlegaar R., Kriek N.P.J. (1988). Fumonisin—novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1806–1811
- Goldoni M., Azzalin G., Macino G., Cogoni C. (2004). Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 41: 1016–24
- Goswami R.S., Kistler H.C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5: 515–525
- Greenhalgh R., Levandier D., Adams W., Miller J.D., Blackwell B.A., McAlees A.J., Taylor A. (1986). Production and characterization of deoxynivalenol and other secondary metabolites of *Fusarium culmorum* (CMI 14764, HLX 1503). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34: 98–102
- Hagler W.M., Mirocha C.J., Pathre S.V., Behrens J.C. (1979). Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* 'Gibbosum' in rice culture. *Applied and Environmental Microbiology* 37: 849–853
- Haidukowski M., Pascale M., Perrone G., Pancaldi D., Campagna C., Visconti A. (2004). Effect of fungicides on the development of *Fusarium* head blight, yield and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated under field conditions with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 191–198
- Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293–296
- Hammond T.M., Keller N.P. (2005). RNA Silencing in *Aspergillus nidulans* is independent of RNA-dependent RNA polymerases. *Genetics* 169: 607–617

- Harris L.J., Desjardins A.E., Plattner R.D., Nicholson P., Butler G., Young J.C., Weston G., Proctor R.H., Hohn T.M. (1999). Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Disease* 83: 954–960
- Henry C., Mounya I., Latgé J.P. (2007). Testing the efficacy of RNA interference constructs in *Aspergillus fumigatus*. *Current Genetics* 51: 277–284
- Heo J.H., Jeong S.J., Seol J.W., Kim H.J., Han J.W., Lee H.W., Cho E.J. (2004). Differential regulation of gene expression by RNA polymerase II in response to DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325: 892–898
- Hestbjerg H., Felding G., Elmholt S. (2002). *Fusarium culmorum* infection of barley seedlings: Correlation between aggressiveness and deoxynivalenol content. *Journal of Phytopathology* 150: 308–316
- Hohn T.M., Beremand P. (1989). Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene* 79: 131–138
- Hohn T.M., Desjardins A.E. (1992). Isolation and gene disruption of the *Tox5* gene encoding trichodiene synthase in *Gibberella pulicaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: 249–256
- Hörberg H.M. (2002). Patterns of splash dispersed conidia of *Fusarium poae* and *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* 108: 73–80
- Hua-Van A., Hericourt F., Capy P., Daboussi M.J., Langin T. (1998). Three highly divergent subfamilies of the *impala* transposable element coexist in the genome of the fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular and General Genetics* 259: 354–362
- Hua-Van A., Daviere J.M., Langin T., Daboussi M.J. (2000). Genome organization in *Fusarium oxysporum*: clusters of class II transposons. *Current Genetics* 37: 339–347
- Hua-Van A., Pamphile J.A., Langin T., Daboussi M.J. (2001). Transposition of autonomous and engineered *impala* transposons in *Fusarium oxysporum* and a related species. *Molecular and General Genetics* 264: 724–731
- Hutvagner G., Zamore P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297: 2056–2060
- Igawa T., Takahashi-Ando N., Ochiai N., Ohsato S., Shimizu T., Kudo T., Yamaguchi T., Kimura M. (2007). Reduced contamination by the *Fusarium* mycotoxin zearalenone in maize kernels through genetic modification with a detoxification gene. *Applied Environmental microbiology* 73: 1622–1629
- Ipcho S.V.S., Tan K.C., Koh G., Gummer J., Oliver R.P., Trengove R.D., Solomon P.S. (2010). The transcription factor *stuA* regulates central carbon metabolism, mycotoxin

production, and effector gene expression in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *Eukaryotic Cell* 9: 1100–1108

Iutyns'ka H.O., Ponomarenko S.P. (2000). Use of biological stimulants to decrease negative effect of pesticide in soil microflora. *Mikrobiologische Zeitschrift* 62: 29–36

Jacobson J.W., Medhora M.M., Hartl D.L. (1986). Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83: 8684–8688

Jaroszuk-Scisel J., Kurek E., Slomka A., Janczarek M., Rodzik B. (2011). Activities of cell wall degrading enzymes in autolyzing cultures of three *Fusarium culmorum* isolates: growth-promoting, deleterious and pathogenic to rye (*Secale cereale*). *Mycologia* 103: 929–945

Jelinsky S.A., Samson L.D. (1999). Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proceedings of the National Academy of USA* 96: 1486–1491

Joffe A.Z. (1971). “Alimentary toxic aleukia”. In: *Microbial Toxins* (Kadis S., Ciegler A., Ajl S.J., eds), vol. 7: pp. 139–189. Academic press, New York

Josephs R.D., Derbyshire M., Stroka J., Emons H., Anklam E. (2004). Trichothecenes: reference materials and method validation. *Toxicology Letters* 153: 123–132

Takeya H., Takahashi-Ando N., Kimura M., Onose R., Yamaguchi I., Osada H. (2002). Biotransformation of the mycotoxin, zearalenone, to a non-estrogenic compound by a fungal strain of *Clonostachys* sp. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66: 2723–2726

Kang Z., Buchenauer H. (2000). Ultrastructural and cyto-chemical studies on cellulose, xylan and pectin degradation in wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *Journal of Phytopathology* 148: 263–275

Kang Z., Buchenauer H. (2002). Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue. *European Journal of Plant Pathology* 108: 653–660

Kempken F., Windhofer F. (2001). The *hAT* family: a versatile transposon group common to plants, fungi, animals, and man. *Chromosoma* 110: 1–9

Kerényi Z., Hornok L. (2002). Structure and function of mating type genes in *Fusarium* species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 49: 313–314

Kirby E.J.M., Appleyard M. (1987). *Cereal development guide*. Stoneleigh, Kenilworth, UK, NAC, Cereal, Unit. pp 85

- Kirby E.J.M., Appleyard M., Simpson N.A. (1994). Co-ordination of stem elongation and Zadoks growth stages with leaf emergence in wheat and barley. *Journal of Agricultural Science* 122: 21–29
- Klein T.M., Wolf E.D., Wu R., Sanford J.C. (1987). High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70–73
- Koch P. (2004). State of the art of trichothecenes analysis. *Toxicology Letters* 153: 109–112
- Kuiper-Goodman T., Scott P.M., Watanabe H. (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 7: 253–306
- Lacey J., Bateman G.L., Mirocha C.J. (1999). Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat. *Annals of Applied Biology* 134: 277–283
- Ladendorf O., Brachmann A., Kämper J. (2003). Heterologous transposition in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics* 269: 395–405
- Langin T., Daboussi M.J., Gerlinger C., Brygoo Y. (1990). Influence of biological parameters and gene transfer technique on transformation of *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics* 17: 313–319
- Leslie J.F., Summerell B.A., Bullock S. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. *Blackwell publishing*
- Li Destri Nicosia M.G., Brocard-Masson C., Demais S., Hua-Van A., Daboussi M.J., Scazzocchio C. (2001). Heterologous transposition in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 39: 1330–1344
- Li L., Chang S., Liu Y. (2010). RNA interference pathways in filamentous fungi. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 3849–3863
- Liu Y.G., Whittier R.F. (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25: 674–681
- Logrieco A., Bottalico A., Altomare C. (1988). Chemotaxonomic observations on zearalenone and trichothecene production by *Gibberella zeae* from cereals in Southern Italy. *Mycologia* 80: 892–895
- Logrieco A., Mulè G., Moretti A., Bottalico A. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 597–609
- López-Berges M.S., Di Pietro A., Daboussi M.J., Wahab H.A., Vasnier C., Roncero M.I.G., Dufresne M., Hera C. (2009). Identification of virulence genes in *Fusarium*

oxysporum f. sp. *lycopersici* by large-scale transposon tagging. *Molecular Plant Pathology* 10: 95–107

Lysøe E., Pasquali M., Breakspear A., Kistler H.C. (2011). The transcription factor *FgStuAp* influences spore development, pathogenicity, and secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 54–67

Magan N., Hope R., Colleate A., Baxter E.S. (2002). Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology* 108: 685–690

Maier F.J., Miedaner T., Hadelers B., Felk A., Salomon S., Lemmens M., Kassner H., Schäfer W. (2006). Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (*Tri5*) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology* 7: 449–461

Marasas W.F.O., Nelson P.E., Toussoun T.A. (1984). Toxigenic *Fusarium* species: identity and mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press, University Park, USA

Martin R.A., MacLeod J.A., Caldwell C. (1991). Influences of production inputs on incidence of infection by *Fusarium* species on cereal seed. *Plant Disease* 75: 784–788

McDonald T., Brown D., Keller N.P., Hammond T.M. (2005). RNA silencing of mycotoxin production in *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 539–545

McMaster G.S. (1997). Phenology, development and growth of the wheat (*Triticum aestivum* L.) shoot apex: a review. *Advances in Agronomy* 59: 63–118

McMullen M., Jones R., Gallenberg D. (1997). Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* 81: 1340–1348

McMullen M. (2003). Impacts of *Fusarium* Head Blight on the North American agricultural community: the power of one disease to catapult change. In: *Fusarium Head Blight of wheat and barley* (Leonard K.J., Bushnell W.R., eds), pp 484–503. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota

Mesterhazy A. (2002). Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology* 108: 675–684

Michielse C.B., Hooykaas P.J.J., van den Hondel C.A.M.J.J., Ram A.F.J. (2005a). *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi *Current Genetics* 48: 1–17

- Michielse C.B., Arentshorst M., Ram A.F.J., van den Hondel C.A.M.J.J. (2005b). *Agrobacterium*-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. *Fungal Genetics and Biology* 42: 9–19
- Migheli Q., Steinberg C., Davière J.M., Olivain C., Gerlinger C., Gautheron N., Alabouvette C., Daboussi M.J. (2000). Recovery of mutants impaired in pathogenicity after transposition of *Impala* in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology* 90: 1279–1284
- Miller J.D., Greenhalgh R., Wang Y.Z., Lu M. (1991). Trichotecene chemotypes of 3 *Fusarium* species. *Mycologia* 83: 121–130
- Miller K.Y., Wu J.G., Miller B.L. (1992). *Stua* is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes and Development* 6: 1770–1782
- Minervini F., Fornelli F., Flynn K.M. (2004). Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicology in Vitro* 18: 21–28
- Montanari M., Innocenti G., Toderi G. (2006). Effects of cultural management on the foot and root disease complex of durum wheat. *Journal of Plant Pathology* 88: 149–156
- Morooka N., Uratsuji N., Yoshizaiva T., Yamamoto H. (1972). Studies on the toxic substances in barley infected with *Fusarium* spp. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 13: 368–375
- Nakayashiki H., Nguyen Q.B. (2008). RNA interference: roles in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology* 11: 494–502
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. (1990). Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell* 2: 279–289
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. (1983). *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, USA
- Ochman H., Gerber A.S., Hartl D.L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621–623
- Ohara T., Tsuge T. (2004). *FoSTUA*, encoding a basic helix-loop-helix protein, differentially regulates development of three kinds of asexual spores, macroconidia, microconidia, and chlamydospores, in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* 3: 1412–1422
- Osborne L.E., Stein J.M. (2007). Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119: 103–108

- Pae H.O., Oh G.S., Choi B.M., Seo E.A., Oh H., Shin M.K., Kim T.H., Kwon T.O., Chung H.T. (2003). Induction of apoptosis by 4-acetyl-12,13-epoxyl-9-trichothecene-3,15-diol from *Isaria japonica* Yasuda through intracellular reactive oxygen species formation and caspase-3 activation in human leukemia HL-60 cells. *Toxicology in Vitro* 17: 49–57
- Pancaldi D., Grazzi G., Alberti I. (1996). La fusariosi della spiga di frumento in Emilia Romagna nel 1995. *Informatore Fitopatologico* 46: 16–20
- Pancaldi D., Alberti I. (2004). Le principali malattie epigee del frumento in post-spigatura. *L'Informatore Agrario* 17: 49
- Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology* 44: 207–238
- Peglion V. (1900). Sulla cosiddetta “Golpe Bianca” del frumento. *Bollettino Notiziario Agrario* 20: 17–26
- Peplow A.W., Tag A.G., Garifullina G.F., Beremand M.N. (2003). Identification of new genes positively regulated by *TRI10* and a regulatory network for trichothecene mycotoxin production. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2731–2736
- Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization* 79
- Pestka J.J., Smolinski A.T. (2005). Deoxinivalenol: toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B Critical Reviews* 8: 39–69
- Pettitt T.R., Parry D.W., Polley R.W. (1996). Effect of temperature on the incidence of nodal foot rot symptoms in winter wheat crops in England and Wales caused by *Fusarium culmorum* and *Microdochium nivale*. *Agricultural and Forest Meteorology* 79: 233–242
- Plasterk R.H., Izsvak Z., Ivics Z. (1999). Resident aliens: the *Tc1/mariner* superfamily of transposable elements. *Trends in Genetics* 15: 326–32
- Poapolathep A., Ohtsuka R., Kiatipattanasakul W., Ishigami N., Nakayama H., Doi K. (2002). Nivalenol-induced apoptosis in thymus, spleen and Peyer's patches of mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* 53: 441–446
- Potter C.J., Luo L. (2010). Splinkerette PCR for mapping transposable elements in *Drosophila*. *PLoS ONE* 5: e10168
- Prelusky D.B., Rotter B.A., Rotter R.G. (1994). Toxicology of mycotoxins. In: *Mycotoxins in Grain, Compounds other than aflatoxin* (Miller and Trenholm ed), pp. 359–403. Eagan Press, St. Paul., Minnesota

- Proctor R.H., Hohn T.M., McCormick S.P. (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 593–601
- Proctor R.H., Desjardins A.E., McCormick S.P., Plattner N.J., Alexander N.J., Brown D.W. (2002). Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 108: 691–698
- Prodi A., Tonti S., Nipoti P., Pancaldi D., Pisi A. (2009). Identification of Deoxynivalenol and Nivalenol producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates from durum wheat in a restricted area of northern Italy. *Journal of Plant Pathology* 91: 727–731
- Pruneddu G., Motzo R., Giunta F., Dettori M., Mameli L., Balmas V. (2010). Supplemento cereali–grano duro Sardegna. *L'Informatore Agrario* 33: 33–34
- Puppi G., Zinoni F. (1999). La fenologia in agricoltura. In: “*Aspetti generali delle osservazioni agrofologiche*” (Botarelli *et al.*), vol 1 pp. 14–18. Collana di Agrofologia, MiPAF, P.F. Phenagri 1
- Ramirez-Zavala B., Dominguez A. (2008). Evolution and phylogenetic relationships of APSES proteins from Hemiascomycetes. *Federation of European Microbiological Societies* 8: 511–519
- Reverberi M., Ricelli A., Zjalic S., Fabbri A.A., Fanelli C. (2010). Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 899–911
- Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Vismer H.F. (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2101–2105
- Robertson H.M. (2002). Evolution of DNA transposons in eukaryotes. In: *Mobile DNA II* (Craig N.L., Craigie R., Gellert M., Lambowitz A.M.), pp:1093–1110. ASM Press, Washington DC
- 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. *Current Genetics* 44: 164–171
- Romano N., Macino G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology* 6: 3343–3353
- Ruiz-Diez B. (2002). Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology* 92: 189–95

Sacristán S., García-Arenal F. (2008). The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular Plant Pathology* 9: 369–384

Sakai A., Suzuki C., Masui Y., Kurarnashi A., Takatori K., Tanaka N. (2007). Activities of mycotoxins derived from *Fusarium* and related substances in a short-term transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/3T3 cells (Bhas 42 cells). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 630: 103–111

Santiago N., Herráiz C., Goñi J.R., Messeguer X., Casacuberta J.M. (2002). Genome-wide analysis of the *emigrant* family of MITEs of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2285–2293

Scherm B., Orrù M., Balmas V., Spanu F., Azara E., Delogu G., Hammond T.M., Keller N.P., Migheli Q. (2011) Altered trichothecene biosynthesis in *TRI6*-silenced transformants of *Fusarium culmorum* influences the severity of crown and foot rot on durum wheat seedlings. *Molecular Plant Pathology* 12: 759–771

Schroeder H.W. e Christensen J.J. (1963). Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53: 831–838

Seong K.Y., Pasquali M., Zhou X., Song J., Hilburn K., McCormick S., Dong Y., Xu J.R., Kistler H.C. (2009). Global gene regulation by *Fusarium* transcription factors *Tri6* and *Tri10* reveals adaptations for toxin biosynthesis. *Molecular Microbiology* 72: 354–367

Serra S. (2011). Duro, l'onda lunga delle scorte brevi. *Terra e Vita* 35: 8–9

Shah D.A., Pucci N., Infantino A. (2005). Regional and varietal differences in the risk of wheat seed infection by fungal species associated with fusarium head blight in Italy. *European Journal of Plant Pathology* 112: 13–21

Sigl C., Haas H., Specht T., Pfaller K., Kürnsteiner H., Zadra I. (2011). Among developmental regulators, *stuA* but not *brlA* is essential for Penicillin V production in *Penicillium chrysogenum*. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 972–982

Skov J., Lemmens M., Giese H. (2004). Role of a *Fusarium culmorum* ABC transporter (*FcABC1*) during infection of wheat and barley. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64: 245–254

Smith W.G. (1884). Diseases of field and garden crops. In: *Macmillan and Co*, pp. 208–213. London

Smith C.J., Watson S., Bird C.F., C.R., Ray J., SchuchW., Grierson D. (1990). Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Molecular and General Genetics* 224: 477–481

Stob M., Baldwin R.S., Tuite J., Andrews F.N., Gillette K.G. (1962). Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature* 196: 1318

Strunnikova O.K., Shakhnasarova V.Y., Vishnevskaya N.A. (2000). Influence of different soil conditions on *Fusarium culmorum*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Landind-Forstwirtschaft* 377: 76

Sudakin D.L. (2003). Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters* 143: 97–107

Tag A.G., Garifullina G.F., Peplow A.W., Ake C., Phillips T.D., Hohn T.M., Beremand M.N. (2001). A novel regulatory gene, *Tri10*, controls trichothecene toxin production and gene expression. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5294–5302

Takahashi-Ando N., Kimura M., Kakeya H., Osada H., Yamaguchi I. (2002). A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. *Biochemical Journal* 365:1–6

Takahashi-Ando N., Ohsato S., Shibata T., Hamamoto H., Yamaguchi I., Kimura M. (2004). Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea*. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3239–3245

Tanguay P., Bozza S., Breuil C. (2006). Assessing RNAi frequency and efficiency in *Ophiostoma floccosum* and *O. piceae*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 804–812

Tatsuno T., Saito M., Enomoto M., Tsunoda H. (1968). Nivalenol, a toxic principle of *Fusarium nivale*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 16: 2519–2520

Teertstra W.R., Deelstra H.J., Vranes M., Bohlmann R., Kahmann R., Kamper J., Wosten H.A. (2006). Repellents have functionally replaced hydrophobins in mediating attachment to a hydrophobic surface and in formation of hydrophobic aerial hyphae in *Ustilago maydis*. *Microbiology* 152: 3607–3612

Tilburn J., Roussel F., Scazzocchio C. (1990). Insertional inactivation and cloning of the *wA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 126: 81–90

Tong X.Z., Zhang X.W., Plummer K.M., Stowell K.M., Sullivan P.A., Farley P.C. (2007). *GcSTUA*, an APSES transcription factor, is required for generation of appressorial turgor pressure and full pathogenicity of *Glomerella cingulata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1102–1111

Ueno Y., Ishikawa Y., Saito-Amakai K., Tsunoda H. (1970). Environmental factor influencing the production of fusarenon-X, a cytotoxic mycotoxin of *Fusarium nivale* Fn 2B. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 18: 304–312

- Ueno Y. (1989). Trichothecene mycotoxins: mycology, chemistry, and toxicology. *Advances in Food and Nutrition Research* 3: 301–353
- Urry W.H., Wehrmeister H.L., Bodge E.B., Hidy P.H. (1966). The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters* 27: 3109–3114
- van Attikum H., Bundock P., Hooykaas P.J. (2001). Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. *EMBO Journal* 20: 6550–6558
- van der Krol A.R., Mur L.A., Beld M., Mol J.N., Stuitje A.R. (1990). Flavonoid genes in *Petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2: 291–299
- Vavilov N.I. (1926). Studies on the origin of cultivated plants. *Bulletin of Applied Botany and Plant-Breeding* 26: 1–248
- Vesonder R.F., Ciegler A., Jensen A.H. (1973). Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn. *Applied Microbiology* 26: 1008–1010
- Vigdal T.J., Kaufman C.D., Izsvak Z., Voytas D.F., Ivics Z. (2002). Common physical properties of DNA affecting target site selection of *Sleeping Beauty* and other *Tc1/mariner* transposable elements. *Journal of Molecular Biology* 323: 441–452
- Villalba F., Lebrun M.H., Hua-Van A., Daboussi M.J., Grosjean-Cournoyer M.C. (2001). Transposon *impala*, a novel tool for gene tagging in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 308–315
- Wagacha J.M., Muthomi J.W. (2007). *Fusarium culmorum*: infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection* 26: 877–885
- Wang H., Hwang S.F., Eudes F., Chang K.F., Howard R.J., Turnbull G.D. (2006). Trichothecenes and aggressiveness of *Fusarium graminearum* causing seedling blight and root rot in cereals. *Plant Pathology* 55: 224–30
- Wei C.M., McLaughlin C.S. (1974). Structure–function relationship in the 12, 13 epoxytrichothecenes. Novel inhibitors of protein synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 57: 838–844
- Weld R.J., Plummer K.M., Carpenter M.A., Ridgway H.J. (2006). Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Research* 16: 31–44
- Windels C.E. (2000). Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology* 90: 17–21

- Yang G.H., Jarvis B.B., Chung Y.J., Pestka J.J. (2000). Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p8 MAPK, and SAPK/JNK activation. In: *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol 164 pp 149–160
- Yeadon P.J., Catchside D.E. (1995). Guest, a 98 bp inverted repeat transposable element in *Neurospora crassa*. *Molecular and General Genetics* 247: 105–109
- Yumbe-Guevara B.E., Imoto T., Yoshizawa T. (2003). Effects of heating procedures on deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone levels in naturally contaminated barley and wheat. *Food Additives and Contaminants* 20: 1140–1149
- Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14: 415–421 and *Eucarpia Bulletin* 7: 49–52
- Zange B.J., Kang Z., Buchenauer H. (2005). Effect of Folicur® on infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes. *Journal of Plant Diseases and Protection* 112: 52–64
- Zeilinger S. (2004). Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Current Genetics* 45: 54–60
- Zhang W., Kema GHJ., Daboussi M.J. (2008). Transposon-tagging identifies novel pathogenicity genes in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 45: 1552–61
- Zhang G.T., Hartl L., Schuster A., Polak S., Schmoll M., Wang T.H., Seidl V., Seiboth B. (2009). Gene targeting in a nonhomologous end joining deficient *Hypocrea jecorina*. *Journal of Biotechnology* 139: 146–151
- Zöllner P., Mayer-Helm B. (2006). Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1136: 123–169