

DIFFERENTE LOCALIZZAZIONE DEL GENE INA+ IN ISOLATI DI
PSEUDOMONAS SYRINGAE E P. FLUORESCENS.1)

G. CIRVILLERI, R. LA ROSA, M. RENIS, A. MANNARANO* e A. CATARA

Istituto di Patologia vegetale, Università, Catania

* Centro Ricerche AID S.p.A., Catania

RIASSUNTO

Il DNA genomico di diversi isolati criogeni e non criogeni di Pseudomonas syringae e P. fluorescens è stato studiato mediante digestione con enzimi di restrizione a rara frequenza di taglio e successiva separazione dei frammenti con elettroforesi pulsata. Tale tecnica ha consentito una soddisfacente separazione di frammenti di DNA compresi tra 25 e 1000 kb. I patterns sono stati sottoposti a Southern blot e quindi analizzati per ibridazione con un oligonucleotide sintetico complementare alla sequenza ripetuta presente nel gene INA+. L'analisi dei southern ha rivelato la differente localizzazione del gene INA+ negli isolati considerati. Tanto in P. syringae quanto in P. fluorescens i segnali di

1) Lavoro eseguito con un contributo del MPI 40%, progetto "Ecologia dei batteri criogeni".

ibridazione sono risultati, infatti, presenti su frammenti di DNA a diverso peso molecolare.

SUMMARY

DIFFERENT LOCALIZATION OF INA+ GENE IN ISOLATES OF PSEUDOMONAS SYRINGAE AND P. FLUORESCENS.

Chromosomal DNA of different INA+ and non INA isolates of Pseudomonas syringae and P. fluorescens was digested with restriction endonucleases that cut only rarely, and the large fragments thus obtained were subsequently separated by field inversion gel electrophoresis (FIGE).

DNA fragments were transferred, by Southern blot, to nylon Hybond N-membrane, and hybridized with a synthetic probe, complementary to the repetitive sequence of INA gene.

Southern analysis confirmed the isolates show the INA gene in different DNA restriction fragments.

INTRODUZIONE

Alcune specie batteriche, appartenenti ai generi Pseudomonas, Erwinia e Xanthomonas, posseggono la capacità di produrre proteine che fungono da nucleo di condensazione del ghiaccio. Esse favoriscono, in modo indiretto, i danni provocati dal gelo alle colture ortofrutticole (Lindow et al., 1978; Lindow et al., 1982). La nucleazione avviene grazie alla particolare struttura di una proteina che risulta simile a

quella di un cristallo di ghiaccio. Il gene che codifica per la proteina viene chiamato INA (Ice Nucleation Active).

I nuclei di condensazione di origine batterica sono attivi in uno spettro di temperatura compreso tra -2 e -10 °C. Tale variabilità, riscontrata anche nell'ambito della stessa specie batterica suggerisce l'esistenza di nuclei di condensazione strutturalmente differenti. Studi recenti hanno evidenziato che quelli attivi a temperature molto basse pesano 150 Kd, mentre quelli attivi a temperature più elevate (-2 °C) sono di 2000 Kd (Lindow et al., comunicazione personale).

L'analisi della sequenza dei geni INA (Green and Warren, 1985; Warren et al., 1986) mostra che essi sono costituiti da una ripetizione di 24 basi, non perfettamente conservata, ed hanno un'organizzazione genica a "blocchi ripetuti". La regione ripetuta del gene INA+ è coinvolta nel processo di nucleazione ed è possibile supporre che mutazioni all'interno di essa siano responsabili della eterogeneità nell'attività di nucleazione, codificando proteine con differenti caratteristiche.

In questo lavoro si riportano i risultati di uno studio preliminare del polimorfismo dei geni criogeni, mediante l'applicazione dell'elettroforesi in campo pulsato su popolazioni INA e non INA di Pseudomonas syringae e di P. fluorescens isolate da materiale vegetale.

MATERIALI E METODI.

Isolati batterici. Sono stati posti a confronto 8 isolati

di Pseudomonas syringae e 10 di P. fluorescens prelevati in differenti località e da diverse piante ospiti, alcuni criogeni e altri non criogeni (tab.1).

TABELLA 1. Provenienza e caratteristiche degli isolati di P. syringae e P. fluorescens

Culture	Località	INA	non INA
<u>P. syringae</u>			
Fiori mandorlo	Siracusa	122A	
Fiori fragola	Reggio Emilia	48	23
" "	S. Giorgio	76	71
" "	Catania	F83	
<u>P. fluorescens</u>			
Fiori fragola	Reggio Emilia		15
" "	Arezzo		54
" "	"		62
" "	Catania	212	FF1
" "	"	214	
" "	"		A50
" "	"		A52
Foglie Carciofo	"		MG3
" "	"		146

Ciò allo scopo di individuare a livello genomico profili che consentissero di raggrupparli a seconda della specie, della provenienza, della pianta ospite e/o della criogenicità.

Elettroforesi pulsata. Le cellule batteriche, dopo crescita in terreno Luria Bertani a 27°C e costante agitazione, sono state precipitate per centrifugazione. La sospensione batterica è stata mescolata a 45°C con agarosio a basso punto di fusione

ed è stata posta a solidificare in blocchetti. Il DNA batterico è stato ottenuto per digestione delle cellule incluse. I blocchetti sono stati quindi trattati, in blocchetto d'agarosio, con lisozima e proteinase K (Cirvillieri et al. 1989).

Il taglio del DNA genomico è stato effettuato con i seguenti enzimi di restrizione: DRAI, Not I e BAM HI.

I frammenti di macrorestrizione sono stati separati tramite FIGE, utilizzando una vasca elettroforetica orizzontale (submarine) ed un temporizzatore (Switch) per l'alternanza dei campi elettrici, su un gel di agarosio all'1% in tampone TBE 0.5x. I tempi di pulsazione sono stati 3:1. Dopo la corsa elettroforetica (24h) il gel è stato colorato con bromuro d'etidid e fotografato all'U.V. (260 nm di lunghezza d'onda).

Ibridazione con oligonucleotide sintetico. Il prodotto della macrorestrizione, ottenuto mediante separazione su FIGE, è stato trasferito dal gel su un filtro di nylon Hybond-N (Amersham) secondo la metodica di Maniatis et al. (1982).

Basandosi sulla sequenza della regione ripetuta non perfettamente conservata del gene criogeno, composta da 24 nucleotidi (5'GCCGGTTATGGCAGCACGCTGACC3'), è stato sintetizzato un oligonucleotide che rappresentasse tale regione. La sintesi è stata effettuata tramite un DNA sintetizzatore (Beckman, System 200 A). L'oligonucleotide, usato come sonda, è stato marcato con il metodo della T4 Polinucleotide chinasi (Maniatis et al. 1982). Dopo marcatura, la sonda è stata precipitata in

etanolo assoluto e quindi risospesa in 50 μ l di H₂O sterile. Le membrane, dopo i lavaggi in tampone 3xSSC, sono state autoradiografate a -70 C utilizzando pellicole Hyperfilm B max (Amersham).

RISULTATI

L'analisi mediante elettroforesi in campo pulsato ha consentito di rilevare che l'enzima di restrizione DRAI taglia il genoma batterico in un numero non elevato (~30) di frammenti ad alto peso molecolare (Fig.1a). La sequenza di riconoscimento di questa endonucleasi di restrizione (AAATTT) si ripete infatti con bassa frequenza nel genoma batterico.

Anche NOT I ha tagliato di rado il genoma di Pseudomonas, poichè provvisto di un sito di riconoscimento costituito da 8 nucleotidi (Fig.2a).

Endonucleasi di restrizione, quali BAM HI, contenenti il dinucleotide CG all'interno del loro sito di riconoscimento, hanno tagliato il genoma batterico in un numero elevato di frammenti a basso peso molecolare (fig.2b) rendendo in tal modo problematico lo studio del polimorfismo dei frammenti di restrizione mediante elettroforesi pulsata.

Dall'esame visivo dei fingerprint ottenuti utilizzando gli enzimi DRAI e NOT I è stato possibile notare un notevole polimorfismo dei frammenti di restrizione dei vari isolati batterici, anche nell'ambito delle due specie (Fig.1a). Per i diversi isolati analizzati si sono prodotti dei fingerprint di grande nitidezza, che sembrano rilevare una notevole variabilità genetica nelle popolazioni naturali di questi batteri. Isolati batterici con fingerprint dissimili tra loro in seguito a taglio del DNA con DRAI hanno confermato il polimorfismo anche se analizzati con gli enzimi NOT I e BAM HI.

I fingerprint degli isolati di P. syringae e P. fluorescens evidenziati con l'elettroforesi pulsata (FIGE) sono stati ulteriormente analizzati con la sonda sintetica costituita dall'oligonucleotide complementare alla sequenza della regione ripetuta del gene INA+. L'ibridazione molecolare con detta sonda ha permesso di localizzare i frammenti di DNA contenenti il gene INA, distinguendo in modo inequivocabile gli isolati criogeni da quelli non criogeni. I risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza di un polimorfismo a carico dei geni INA nei diversi batteri criogeni. Gli isolati 122A, 97 ed F63 di P. syringae (fig.1b n. 2,4,5,) hanno ripetutamente confermato la presenza del gene INA su frammenti di differente peso molecolare.

Tra gli isolati di P. fluorescens, solo il 212 (fig.1b,n.10) ha fornito un segnale in ibridazione, ed il frammento contenente il gene INA è risultato a maggior peso molecolare rispetto a quello presente negli P. syringae.

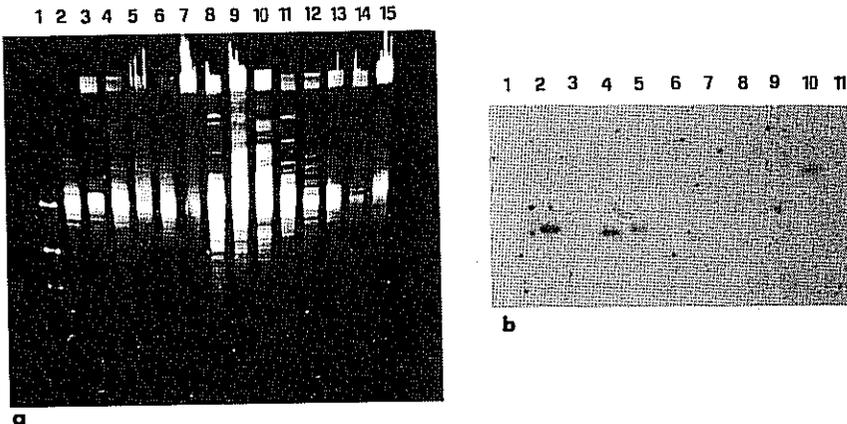


Fig.1.a) Fingerprint del DNA di differenti ceppi di Pseudomonas syringae (2-6) e Pseudomonas fluorescens (7-15) digerito con l'enzima DRAI e risolto mediante FIGE.
b) Ibridazione molecolare con oligonucleotide sintetico.

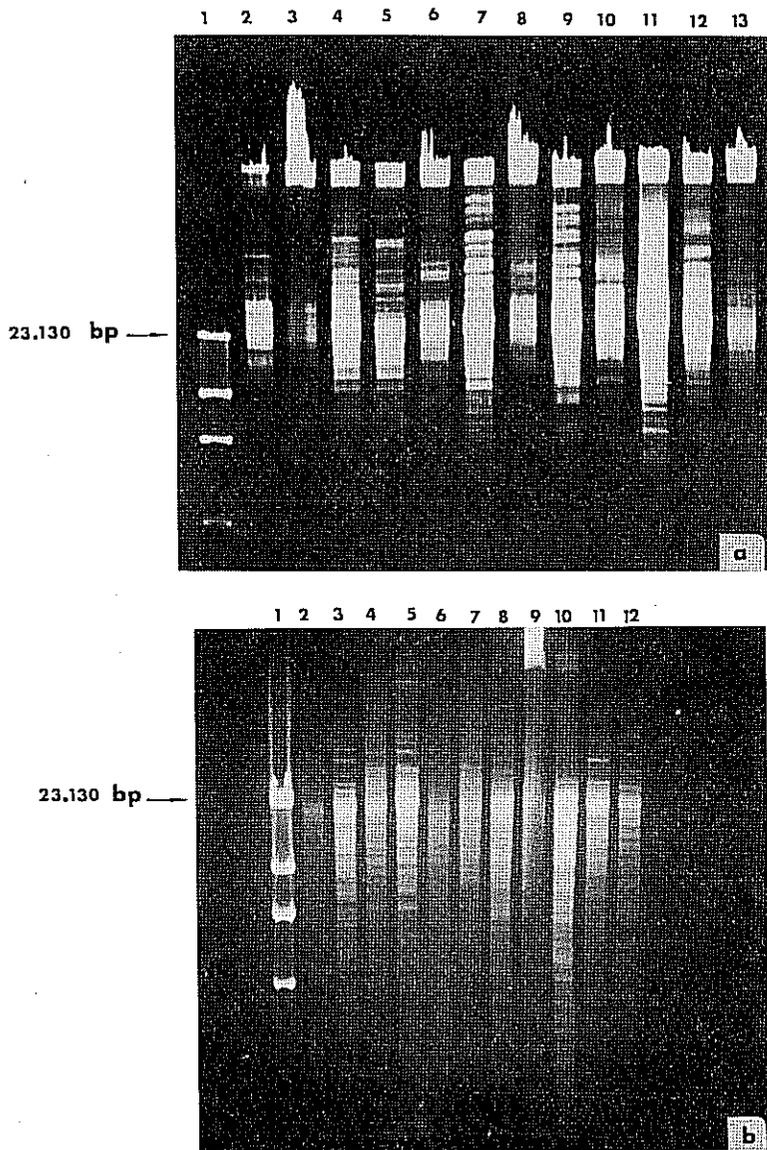


Fig. 2. Fingerprint del DNA di differenti ceppi di Pseudomonas siringae (2-6) e Pseudomonas fluorescens (7-11) digerito a) con NOT, b) con BAM HI e risolto mediante FIGE.

P. fluorescens 214, che aveva mostrato un fingerprint uguale al 212, ha presentato il gene INA in frammenti di peso molecolare uguale.

DISCUSSIONE

La tecnica FIGE così come altre tecniche elettroforetiche in campo pulsato, recentemente sviluppate, consente di separare frammenti di DNA di grandi dimensioni riuscendo a risolvere anche molecole maggiori di 2000 Kbp.

Nel nostro caso la tecnica ha consentito di ottenere dei fingerprint di grande nitidezza che sembrano rivelare una variabilità genetica inaspettata nelle popolazioni naturali delle specie batteriche analizzate.

La successiva ibridazione con l'oligonucleotide complementare alla sequenza della regione altamente ripetuta del gene INA, ha messo in evidenza anche l'esistenza di un certo polimorfismo a carico del gene INA nei batteri criogeni. Esso infatti è presente nei vari ceppi analizzati in frammenti aventi diverso peso molecolare. Per chiarire la natura di tale polimorfismo l'analisi dovrà essere estesa ad altri ceppi di P. syringae e P. fluorescens e tali ceppi dovrebbero essere scelti in base alla loro stessa caratteristica attività di nucleazione.

I risultati ottenuti con lo screening preliminare effettuato sugli isolati batterici analizzati ci induce ad approfondire ulteriormente le indagini al fine di conoscere la sequenza del gene nei vari isolati e quindi correlare questa con la struttura della proteina INA codificata e con la diversa

attività di nucleazione.

BIBLIOGRAFIA

- Carle G.F., Frank M., Olson M.V. (1986). Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. Science, 232, 65-68.
- Cirvillieri G., Amici A., Rollo F., Cartia G. (1989). Caratterizzazione di Pseudomonas della rizosfera mediante "fingerprinting" con elettroforesi pulsata. Atti Convegno "Tecniche Biologiche Innovative in Fitoiatria" Senigallia 10/12 maggio 1989.
- Green R.L., and Warren G.J. (1985). Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene. Nature, 317: 645-648.
- Grothues D., Tummler B. (1987). Genome analysis of Pseudomonas aeruginosa by field inversion gel electrophoresis. Fems Microbiology Letters, 48: 419-422.
- Lindow S.E., Army D.C., and Upper C.D. (1982). Bacterial ice nucleation: A factor in frost injury to plants. Plant physiol., 70: 1084-1089.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982). Molecular cloning (Cold Spring Harbor Laboratory) NY, p.153.
- Warren G.J., Corratto L., and Wolber P.K. (1986). Conserved repeat in diverged ice nucleation structural genes from two species of Pseudomonas. Nucleic Acid Res. 14, B047-B060.