



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI AGRARIA

Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni vegetali

TESI DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

**GENOTIPIZZAZIONE DI LINEE MUTANTI PER
EPIREGOLATORI IN MAIS**

Relatore: Prof.ssa Serena Varotto

Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali

Correlatore: Dott. Cristian Forestan

Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali

Laureando: Diego Cavalli

Matricola n.: 561181

ANNO ACCADEMICO 2010 – 2011

Per mamma e papà,
la mia famiglia,
i parenti e
gli amici tutti.

INDICE

1. ABSTRACT.....	1
2. INTRODUZIONE.....	5
2.1 PATHWAY E MECCANISMI EPIGENETICI.....	5
2.2 LA REGOLAZIONE EPIGENETICA DEI TRANSGENI.....	14
2.3 EPIGENETICA E TRASPOSONI.....	15
2.4 EPIGENETICA E SVILUPPO FLC.....	18
3. SCOPO DELLA TESI.....	19
4. MATERIALI E METODI.....	23
4.1 MATERIALE VEGETALE.....	23
4.2 ESTRAZIONE DNA GENOMICO.....	23
4.3 PCR E DISEGNO DEI PRIMERS.....	24
4.4 MUTANTI INSERZIONALI E PRIMERS.....	27
4.5 CORSA ELETTROFORETICA.....	29
5. RISULTATI E DISCUSSIONI.....	31
5.1 PRODUZIONE DI MUTANTI PER EPIREGOLATORI.....	31
5.2 MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI STRESS TERMICO.....	40
6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE.....	49
7. BIBLIOGRAFIA.....	53

1. ABSTRACT

In the last years, it has been proved that epigenetic modifications such as DNA methylation, production of sRNAs, modification of histone tails and the presence of histone variants may act to alter the level of chromatin condensation, regulating gene expression in spatially and temporally way. These epigenetic mechanisms act together to fine regulate gene expression in plants and mammals, especially in response to environmental factors. Studing the mechanisms and the processes that lead to the formation and propagation of epialleles in maize is the subject of the research project in which this thesis is inserted and of this thesis as well. In particular we are interested in understanding how environmental stresses can alter epigenetic regulation of gene expression, leading to the formation of stable, inheritable epialleles. The final goal of the project would be the use of this stress-induced epigenetic variability in new breeding program in maize. To do this we are producing mutants for different epigenetic regulators (epi-regulators) and we are setting up different stress protocols in maize to identify new epitargets, that are genes induced by stress and regulated epigenetically. Insertional mutant lines used were obtained by crossing a wild-type maize line with pollen derived from a line in which the Mu transposon resulting in a hybrid background. It is therefore necessary to backcross this mutant lines with the B73 wild type inbred line several times (at least five) to introgress the mutations in this reference background. B73 is indeed the maize inbred line for which the genome has been completely sequenced, and only after the completion of the introgression the mutant plants will be selfed twice to obtain homozygous mutants.

The first part of the thesis work, plants of 5 mutants lines for different epiregulators were genotyped, proceeding to the DNA extraction and to the application of PCR (Polymerase Chain Reaction) to identify the plants that carry the insertional mutation. To perform the PCR reaction a universal primer, designed on the sequences terminal inverted and repeat (TIR) of the transposon, was used in combination with one or more gene-specific primers, allowing amplification of the fragment of interest only from mutant plants. The so indentified plants have been then crossed to B73 plants, getting along the backcross program.

On the other hand, in the thesis second part a temperature shift protocol for maize has been developed based on on the results recently obtained in *Arabidopsis thaliana*. We showed that in maize a heat-shift stress, in this case the plants were subjected to a period of 8 days of growth at 15 °C and then transferred to 42 °C for 2 days is able to release the epigenetic silencing of an transgenic silenced reporter lines, suggesting that this stress is able to induce epigenetic modification.

Both approaches allowed to produce the tools (mutants and stress protocols) that will be soon used to address the project objectives, identifying the stress induced epitargets and analyzing their transgenerational inheritance.

RIASSUNTO

Negli ultimi anni è stato chiaramente dimostrato che modificazioni epigenetiche quali la metilazione del DNA, le modificazioni delle code istoniche e la presenza di varianti istoniche possono agire a livello della cromatina per alterare e regolare spazialmente e temporalmente l'espressione genica e di conseguenza controllare molto finemente lo sviluppo degli organismi superiori, specialmente in risposta a fattori ambientali. Lo studio della formazione e della propagazione di epialleli in mais è l'oggetto del progetto di ricerca all'interno del quale si è inserito questo lavoro di tesi.

Lo scopo di questo lavoro è di identificare nuovi epitarget, ovvero quei geni indotti da stress e regolati epigeneticamente, su piante sottoposte a diversi stress ambientali e su mutanti per epiregolatori.

Le linee mutanti inserzionali utilizzate sono state ottenute attraverso l'incrocio di una linea di mais wild-type con polline derivante da una linea in cui il trasposone Mu ottenendo così un background ibrido. È stato quindi necessario effettuare dei reincroci con la linea B73, in quanto il genoma di questa linea è stato completamente sequenziato, prima di passare all'autofecondazione per ottenere la mutazione in stato di omozigosi. La prima parte della tesi consiste nel seguire il backcross su 4 linee mutanti per diversi epiregolatori procedendo all'estrazione di DNA e all'applicazione della PCR (Polymerase Chain Reaction) per identificare le piante che portano la mutazione inserzionale. Per effettuare la reazione di PCR è stato utilizzato un primer universale disegnato sulle sequenze terminali invertite e ripetute (TIR) del trasposone in combinazione con uno o più primers gene-specifici consentendo di ottenere amplificazione del frammento di interesse solo dalle piante mutanti.

Nella seconda parte, invece, è stato messo a punto un protocollo di stress termico basato su esperimenti effettuati su *Arabidopsis thaliana*. È stato testato uno stress da shift termico, nel caso specifico le piante sono state sottoposte ad un periodo di crescita di 8 giorni a 15°C per poi essere trasferite a 42°C per 2 giorni. Questo esperimento è stato svolto in parallelo su piante di mais B73 e su piante di una linea reporter transgenica silenziata epigeneticamente. In entrambi i casi, gli esperimenti sono andati a buon fine: mediante la reazione di PCR, è stato possibile identificare quelle piante che contengono la mutazione inserzionale con cui si potrà continuare il

backcross con la linea B73 e lo stress termico si è dimostrato in grado di attivare l'espressione del transgene, attraverso un rilassamento del silenziamento epigenetico.

2. INTRODUZIONE

L'epigenetica viene definita come lo studio dei cambiamenti della regolazione genica e fenotipici che non dipendono da modificazioni nella sequenza primaria del DNA. Negli ultimi anni è infatti stato chiaramente dimostrato che modificazioni epigenetiche quali la metilazione del DNA, le modificazioni delle code istoniche e la presenza di varianti istoniche possono agire a livello della cromatina per alterare e regolare spazialmente e temporalmente l'espressione genica e di conseguenza controllare molto finemente lo sviluppo degli organismi superiori, specialmente in risposta a fattori ambientali. Queste modifiche reversibili possono essere transienti, in risposta a stimoli ambientali o al programma di sviluppo intrinseco di ogni individuo e quindi non avere nessun impatto dal punto di vista evolutivo. Al contrario è stato dimostrato che alcune modifiche epigenetiche possono essere ereditate attraverso la mitosi e la meiosi, portando quindi alla creazione di nuova variabilità genetica che può essere trasmessa alla progenie. La formazione di epialleli che rimangono stabili nella progenie per numerose generazioni può rappresentare una fonte importante di variabilità utilizzabile per nuovi programmi di miglioramento genetico delle piante di interesse agrario.

Questo, ovvero lo studio della formazione e della ereditabilità di epialleli in mais, una pianta importantissima a livello mondiale, è l'oggetto del progetto di ricerca all'interno del quale si è inserito questo lavoro di tesi. In particolare il progetto si propone di esplorare i meccanismi che portano alla creazione di nuova variabilità epigenetica per poterla utilizzare in programmi di miglioramento genetico volti ad aumentare la resistenza di questa coltura a stress ambientali.

2.1 PATHWAY E MECCANISMI EPIGENETICI

La regolazione epigenetica dell'espressione genica passa attraverso tre distinti pathway: la metilazione del DNA, il pathway autonomo, inizialmente individuato come pathway di regolazione della fioritura e il pathway degli small-RNA (sRNA). Questi tre diversi meccanismi epigenetici sono strettamente interconnessi tra di loro e insieme sono coinvolti nella fine regolazione dello sviluppo delle piante.

Il pathway autonomo comprende geni e prodotti genici inizialmente identificati perché coinvolti nella regolazione della fioritura della pianta modello *Arabidopsis thaliana* (Bob B. Buchanan et al, 2003). In *Arabidopsis* l'induzione alla fioritura è regolata dal silenziamento epigenetico dell'espressione del gene FLC (flowering locus C) che funge da regolatore negativo dell'induzione a fiore. I geni del pathway autonomo, assieme all'influenza di fattori ambientali (luce e freddo in primis) e ormonali, portano al silenziamento di FLC permettendo l'induzione a fiore (Bob B. Buchanan et al, 2003).

Il pathway di metilazione delle citosine è invece responsabile del silenziamento trascrizionale delle regioni eterocromatiche e degli elementi trasponibili. Mediante l'azione di metiltransferasi vengono legati covalentemente gruppi metilici alle citosine del DNA (Zhang, 2010). La metilazione delle citosine, interferendo con i complessi proteici che effettuano la trascrizione, causa il silenziamento dell'espressione dei geni (Fig.1).

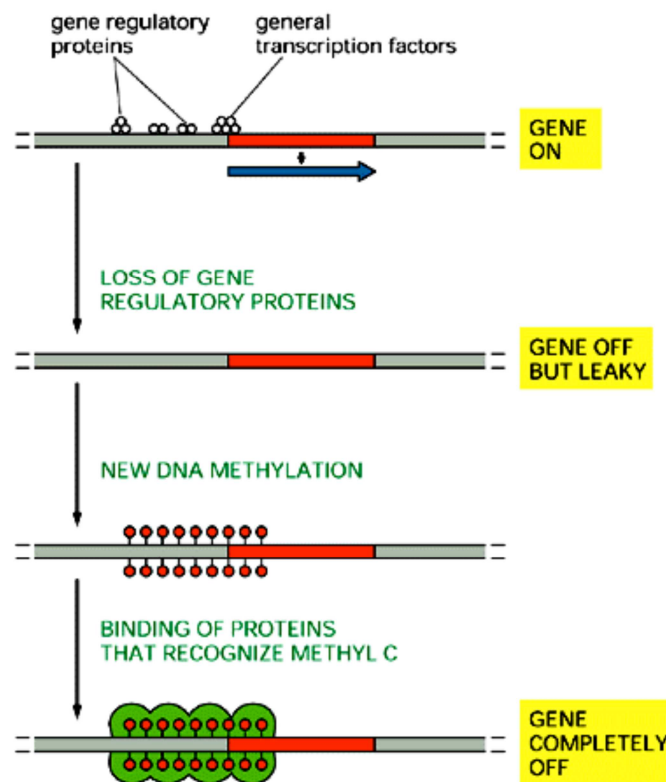
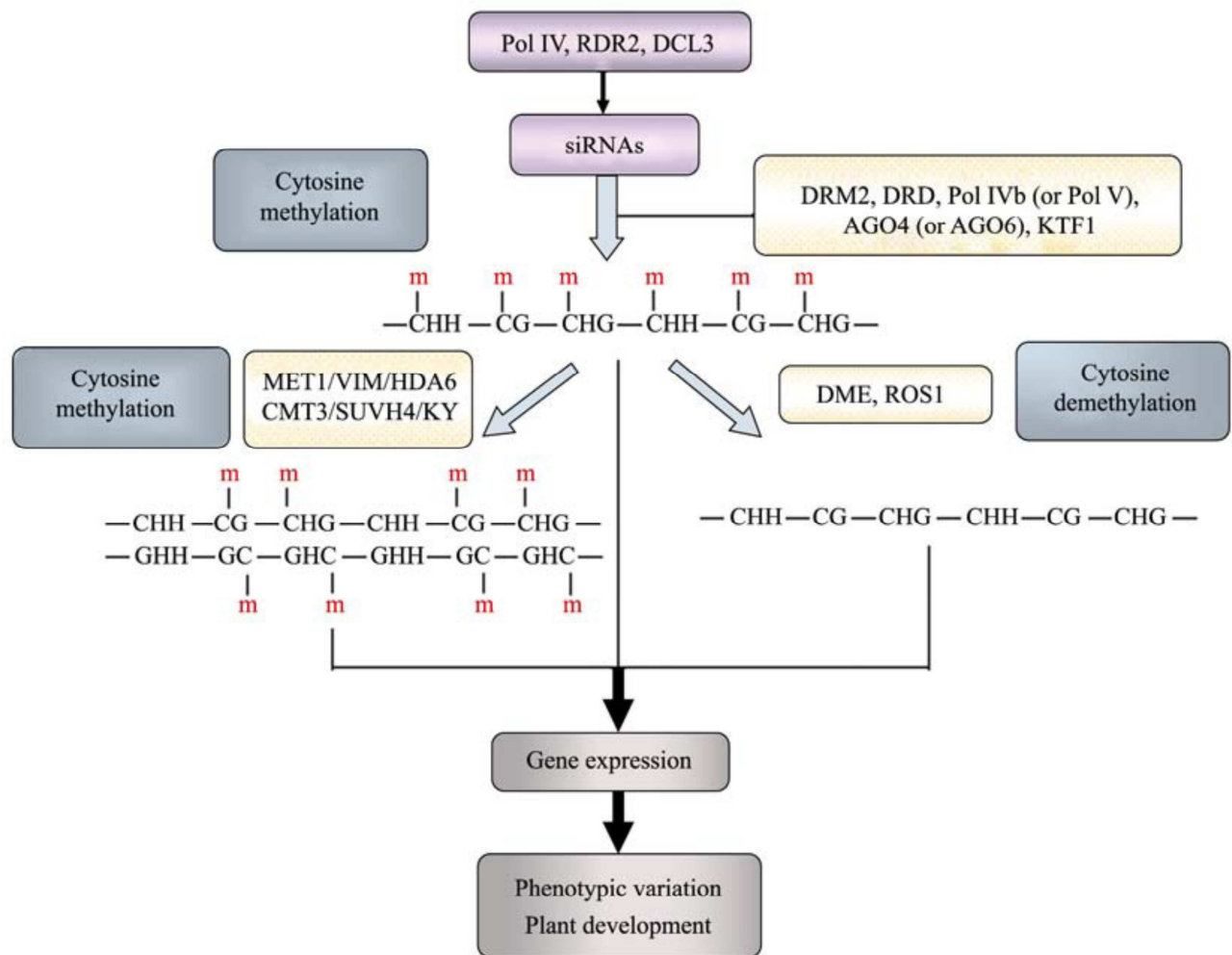


Fig.1: Rappresentazione schematica dell'effetto della metilazione sull'espressione genica. La metilazione interferisce con i gruppi proteici che effettuano la trascrizione causando il silenziamento genico.

Le piante possiedono tre tipi di DNA metiltransferasi con destinazioni e funzioni diverse, in base alla specie ed al gene target come riportato nella tabella 1 (Tab.1). La MET1 (methyltransferase1) mantiene una metilazione simmetrica sui siti 5'-CG-3' durante la replicazione del DNA, copiando l'informazione dal filamento stampo al filamento di nuova sintesi (Zhang, 2010). Questo tipo di metilazione viene utilizzata per il silenziamento degli elementi trasponibili. Le CMT3 (chromomethylase3) metilano le sequenze 5'-CHG-3' e possono effettuare una metilazione *de novo* di siti del DNA in corrispondenza di regioni con particolari modificazioni istoniche (Zhang, 2010). DRM1 (domains rearranged methyltransferase 1) e DRM2 (domains rearranged methyltransferase 2) sono invece delle proteine strettamente correlate tra loro che hanno funzioni simili nel metilare le sequenze CHH (dove H può essere una A, C o T) non simmetriche. Questo tipo di metilazione porta alla perdita di informazione durante la replicazione del DNA, in quanto un filamento non dispone della citosina metilata. CMT3, DRM1 e DRM2 sono necessarie per la regolazione dell'espressione di geni endogeni, specialmente per quelli legati al controllo dello sviluppo (Zhang, 2010). La rappresentazione schematica delle diverse DNA metiltransferasi è riportata in figura 2.1.



(Zhang, 2010)

Fig. 2.1 Nella figura qui riportata viene illustrato il meccanismo di metilazione da parte degli enzimi citati precedentemente. In particolare si può notare come la metilazione non sia necessaria solamente al silenziamento genico, ma anche ad una regolazione dell'espressione genica mediante metilazione di mantenimento, specialmente per i geni legati al controllo dello sviluppo. La metilazione delle citosine nelle regioni dei promotori può influenzare l'espressione genica e contribuire quindi alla variabilità fenotipica.

CLASSIFICAZIONE	GENE	SPECIE	FUNZIONE
MET1	AtMET1	A. thaliana	Mantenimento
	NtMET1	Nicotiana tabacum	Mantenimento
	OsMET1-1	O. sativa	Mantenimento
	OsMET1-2	O. sativa	Mantenimento
	ZmMet1	Zea mays	Mantenimento
CMT	AtCMT3	A. thaliana	Mantenimento
	OsCMTL	O. sativa	Enzima putativo, funzione sconosciuta
	OsMET2a	O. sativa	Enzima putativo, funzione sconosciuta
	ZMET2	Zea mays	Probabile mantenimento
	ZMET5	Zea mays	Probabile mantenimento
DRM	AtDRM1	A. thaliana	De novo, mantenimento
	AtDRM2	A. thaliana	De novo, mantenimento
	NtDRM1	N tabacum	De novo
	ZMET3	Zea mays	Enzima putativo, funzione sconosciuta

(Zhang,

2010)

Tab.1: In questa tabella sono riportati gli enzimi di metilazione ed i rispettivi geni target noti in diverse specie vegetali. Come si può notare MET1 è un enzima di metilazione che causa il mantenimento della stessa nelle specie citate, mentre DRM è addetto alla metilazione *de novo*. Per quanto riguarda CMT invece la sua funzione non è del tutto certa se non in A. thaliana.

Il pathway di produzione degli siRNA (small interfering RNA) include invece una serie di meccanismi di silenziamento genico post-trascrizionale. Gli siRNA sono RNA di lunghezza variabile tra i 20-25 nucleotidi formati dal processamento, mediante l'intervento dell'enzima DICER, di più lunghi RNA a doppio filamento (dsRNA). Dopo aver subito questo processamento, il doppio filamento di siRNA viene aperto da una elicasi e il filamento antisenso viene legato dal complesso RISC (RNA-interfering silencing complex) mentre il filamento senso viene degradato. Il complesso così formato può legarsi ad una sequenza complementare presente sull'mRNA (RNA messaggero), se l'appaiamento risultante è perfetto una componente di RISC (detta *argonaute protein* o *Ago*) effettua un taglio sull'mRNA (Chitwood, 2010). Così facendo risultano due frammenti di mRNA privi di protezione e vengono rapidamente degradati dalle RNAsi. Nel caso in cui l'appaiamento non sia perfetto il complesso RISC inibisce comunque la traduzione del trascritto in proteina, bloccando quindi l'espressione del gene.

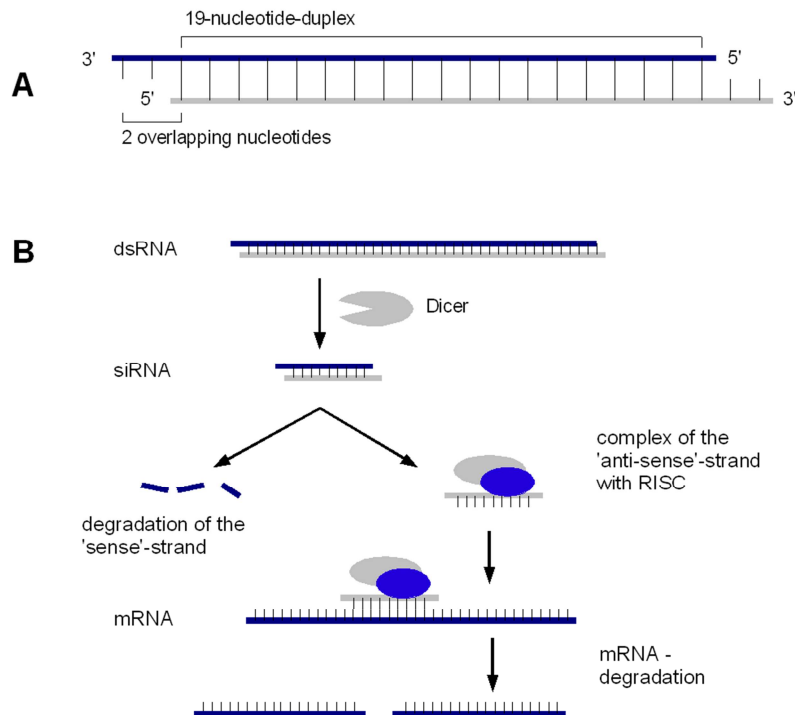


Fig 2.2: Meccanismo di azione degli siRNA. I dsRNA di partenza vengono tagliati dall'enzima DICER in frammenti più piccoli (20-25 nt) ed il filamento antisenso risultante si lega al complesso RISC. Se l'appaiamento di questo complesso con l'mRNA risulta perfetto viene effettuato un taglio da una componente di RISC ed i frammenti vengono degradati dalle RNAsi.

I meccanismi epigenetici, come il pathway di metilazione ed il pathway autonomo, influenzano l'espressione genica anche agendo direttamente a livello della cromatina, o meglio, sullo stato di condensazione della cromatina, costituita da DNA associato a proteine istoniche e non istoniche e principale componente del nucleo della cellula eucariote..

La cromatina può assumere due forme fondamentali definite eucromatina ed eterocromatina. La prima rappresenta la frazione di cromatina meno condensata ed è la parte in cui vi è un'intensa attività trascrizionale, mentre la seconda rappresenta la frazione più condensata e trascrizionalmente inattiva contenente sequenze di DNA ripetute e/o geni silenziati (M. Tittel-Elmer et al, 2010). Variazioni del grado di condensazione della cromatina possono essere ottenute mediante modifiche covalenti del DNA e delle proteine istoniche. Per quanto riguarda il DNA, la modifiche avviene

mediante una metilazione delle sequenze che fiancheggiano i geni stessi, a livello delle citosine come prima descritto, in questo modo vengono reclutate delle proteine specifiche che richiamano le istone-deacetilasi e le istone-metilasi che modificano localmente la cromatina. Nel caso specifico degli istoni, vengono modificate prevalentemente le code N-terminali mediante l'aggiunta di gruppi acetilici, metili o fosforici a livello dei residui di lisina e serina. Queste modifiche delle code N-terminali degli istoni modificano la condensazione e di conseguenza l'accessibilità del DNA oppure possono essere lette da particolari complessi proteici che associano determinate modificazioni ad uno stato di eu- o etero-cromatina. Per esempio i nucleosomi deacetilati sono associati a regioni della cromatina trascrizionalmente repressi, mentre la metilazione è associata sia a repressione sia ad attivazione della cromatina in funzione dell'amminoacido e dell'istone oggetto della metilazione. In tabella 2 (Tab.2) sono riportate in modo schematico le modificazioni della cromatina descritte precedentemente, con il rispettivo meccanismo ed effetto sulla trascrizione.

MODIFICAZIONE della CROMATINA	TIPOLOGIA della MODIFICAZIONE	AZIONE SU:	MECCANISMO	RISULTATO nella TRASCRIZIONE
Modificazioni Istoniche	Ubiquitinazione	Lisine	Modifica la distanza degli istoni dal DNA.	Attivazione (H2A) o repressione (H2B)
	Metilazione	Lisine, Arginine	Recluta altri regolatori della cromatina	Attivazione (H3K4) o repressione (H3K9)
	Acetilazione	Lisine	Neutralizzazione di carica e reclutamento di regolatori della cromatina	Attivazione
	Fosforilazione	Serine, treonine		
Romodellamento della cromatina	SWI/SNF	Nucleosoma	Modificazione dell'ottamero istonico	Attivazione o repressione
	SWR1	Istoni	Incorporazione della variante istonica H2A.Z	Attivazione
Metilazione del DNA	CG e non-CG	Promotori	Inibizione della trascrizione	Repressione
	CG	Geni (da 5' a 3')	Modifica la lunghezza del trascritto	Repressione

Current Opinion in Plant Biology 2007

Tab.2 : nella tabella sopra riportata sono elencate le varie modifiche apportate alla cromatina ed i relativi meccanismi. Come si può notare le modifiche istoniche posso avere un effetto di attivazione o repressione in base alla modificazione apportata, mentre la metilazione delle CG in determinate regioni del DNA, specialmente a livello dei promotori, porta ad una repressione della trascrizione.

Si è potuto osservare che particolari stress o situazioni ambientali possono portare ad una modifica dello stato condensato di eterocromatina causando la trascrizione dei geni situati in questa regione (M. Tittel-Elmer, 2010). Questo è stato possibile sottoponendo *Arabidopsis* a vari stress abiotici. Questi stress agiscono principalmente sullo stato di metilazione del DNA e sull'acetilazione degli istoni portando così l'eterocromatina ad uno stato più rilassato e trascrizionalmente attivo. Tuttavia queste modifiche sono prevalentemente transitorie e vengono perse poco dopo il ritorno alla condizione non stressante.

2.2 LA REGOLAZIONE EPIGENETICA DEI TRANSGENI

Con il termine transgene viene indicato la presenza di un gene estraneo (esogeno) all'interno della pianta (Bob B. Buchanan, 2003). Nella maggior parte dei casi però il gene esogeno viene riconosciuto dalla pianta e di conseguenza viene silenziato mediante meccanismi epigenetici. Mediante uno studio effettuato con transgeni in *Arabidopsis*, petunia (*Petunia hybrida*) e tabacco (*Nicotiana tabacum*) si è potuto osservare una correlazione tra geni ripetuti in loci specifici e silenziamento epigenetico: Tanto sono più numerose le copie di transgene presenti in un determinato locus, tanto maggiori sono le probabilità che l'espressione sia silenziata. Questi transgeni sono inoltre coinvolti nella cosoppressione in quanto causano un silenziamento dei geni endogeni che hanno in comune un'identità di sequenza. Un tipico esempio di questo silenziamento è l'esperimento effettuato su petunia al fine di aumentare la produzione di pigmento attraverso l'overespressione del gene calcione-sintetasi (CHS), codificante per un enzima chiave del pathway di biosintesi dei pigmenti. L'inserimento del transgene codificante un enzima limitante ha portato ad un efficace silenziamento dell'attività sia del transgene sia del gene endogeno, con risultato la mancanza di colore nei fiori, così come strani effetti sulla pigmentazione (Fig. 1.3). È stato inoltre osservato che la cosoppressione non porta a cambiamenti ereditabili meioticamente, poiché l'attività del gene endogeno è ripristinata una volta che il transgene silenziatamente è segregato attraverso incroci sessuali.



Fig.2.3: Esperimento effettuato su petunia per la sovrapproduzione di pigmento, la presenza del transgene porta ad un fenomeno di cosoppressione in cui non solo vengono silenziati i transgeni ma anche i geni endogeni addetti alla pigmentazione. Questo fenomeno porta strani effetti sulla pigmentazione o ad una totale mancanza di pigmento con la produzione di fiori bianchi.

2.3 EPIGENETICA E TRASPOSONI

I trasposoni, o elementi trasponibili sono sequenze di DNA che possono spostarsi da un sito ad un altro del genoma interrompendo, alle volte, sequenze codificanti. Le trasposizioni vengono distinte in tre tipi. Il primo tipo prevede l'escissione dell'elemento dal suo sito in un cromosoma e il suo inserimento in un'altra posizione. L'escissione e l'inserzione sono catalizzati da un enzima chiamato trasposasi (Fig.1.4).

Trasposoni che si muovono direttamente

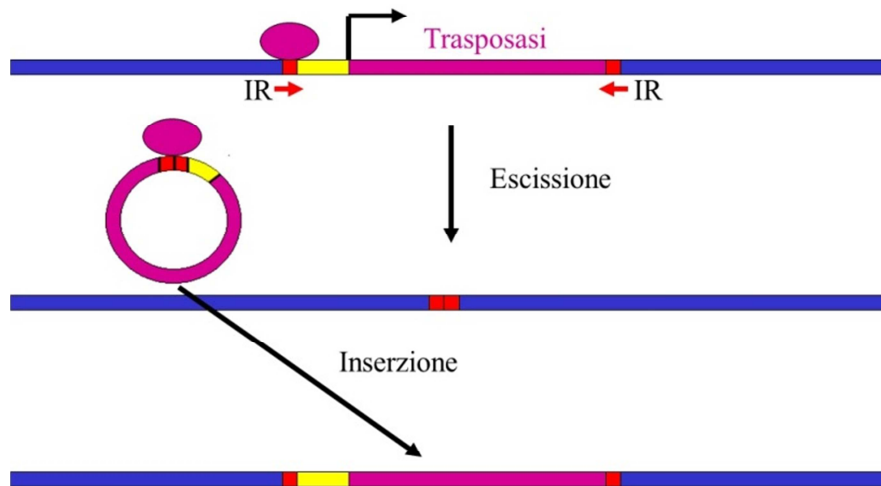


Fig.2.4: Movimento dei trasposoni mediante escissione ed inserzione

Il secondo tipo implica la replicazione del DNA dell'elemento trasponibile. Una proteina, la trasposasi, codificata dall'elemento stesso, funge da mediatore nell'inserzione tra l'elemento e il potenziale sito d'inserzione. Durante questa interazione, l'elemento si replica, una copia di questo si inserisce nel nuovo sito mentre l'altra rimane nel sito originario.

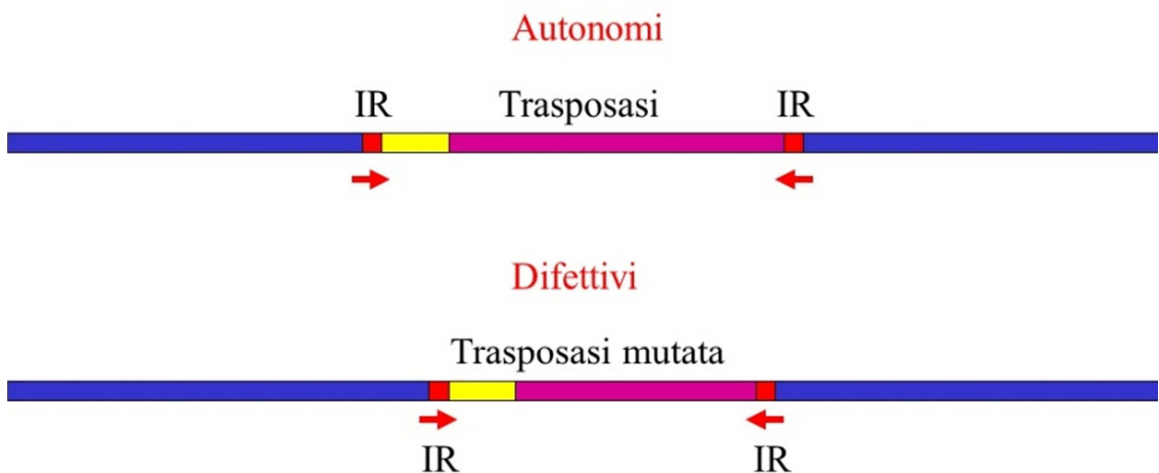


Fig.2.5: Movimento autonomo dei trasposoni mediante trasposasi, codificata dall'elemento stesso, che aiuta il movimento dell'elemento nel nuovo sito d'inserzione.

Il terzo tipo prevede che la trasposizione venga mediata da una trascrittasi inversa. Quest'enzima usa l'RNA dell'elemento come stampo per sintetizzare le molecole di DNA (Fig.1.6) che vengono così inserite in nuovi siti cromosomici (Snustad et al., 2010).

Trasposoni che si muovono indirettamente (retroposoni)

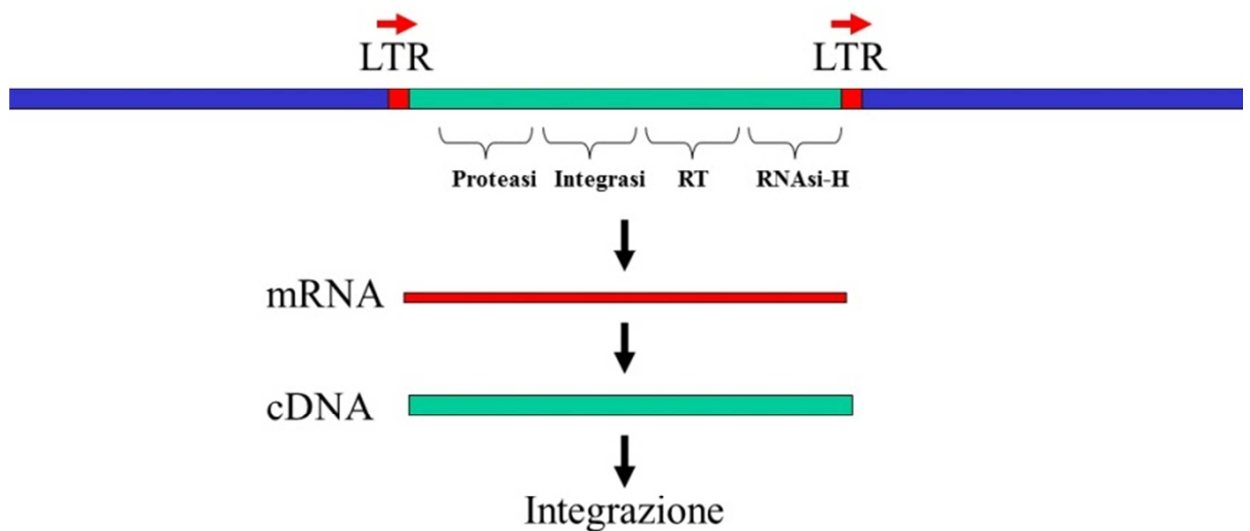


Fig.2.6: Movimento dei trasposoni mediante il meccanismo dell'integrazione mediante cDNA. Mediante la trascrittasi inversa viene sintetizzato un nuovo mRNA che, a sua volta, porta alla formazione di molecole di cDNA che vengono inserite nei nuovi siti cromosomici.

Per quanto riguarda i vegetali un tipo di trasposizione molto diffusa è la prima descritta ed è anche quella di cui fanno parte gli elementi trasponibili Ac/Ds scoperti in mais da Barbara McClintock (The origin and behavior of mutable loci in maize, 1950). Nel caso specifico, i meccanismi epigenetici hanno un'importanza rilevante nell'evitare il movimento dei trasposoni in nuovi siti del DNA. Solitamente questi meccanismi portano, mediante i pathway descritti in precedenza ed alla modificazioni della cromatina, ad un silenziamento degli elementi trasponibili rendendo il DNA poco accessibile alla trascrizione. Per questo motivo i trasposoni si trovano nelle regioni di eterocromatina dove i geni non sono solitamente espressi.

2.4 EPIGENETICA E SVILUPPO FLC

Come citato precedentemente, l'espressione del gene FLC è particolarmente influenzata dagli stimoli ambientali. Un fattore molto importante per l'entrata in fioritura è la vernalizzazione, ovvero l'esposizione della pianta a periodi di freddo prolungati (Bob B. Buchanan, 2003). Mediante esperimenti effettuati su *Arabidopsis* si è potuto osservare che un trattamento prolungato a basse temperature comporta un ritardo della fioritura della pianta, poiché questo tipo di trattamento stimola l'espressione di determinati geni che portano ad una sovraespressione di FLC. Nel caso specifico si hanno dei cambiamenti epigenetici che comportano l'espressione di *frigida* (FRI), questo perché la vernalizzazione porta ad una demetilazione delle citosine rendendo FRI accessibile alla trascrizione. La trascrizione di FRI porta alla conseguente trascrizione di FLC e quindi il ritardo nella fioritura.

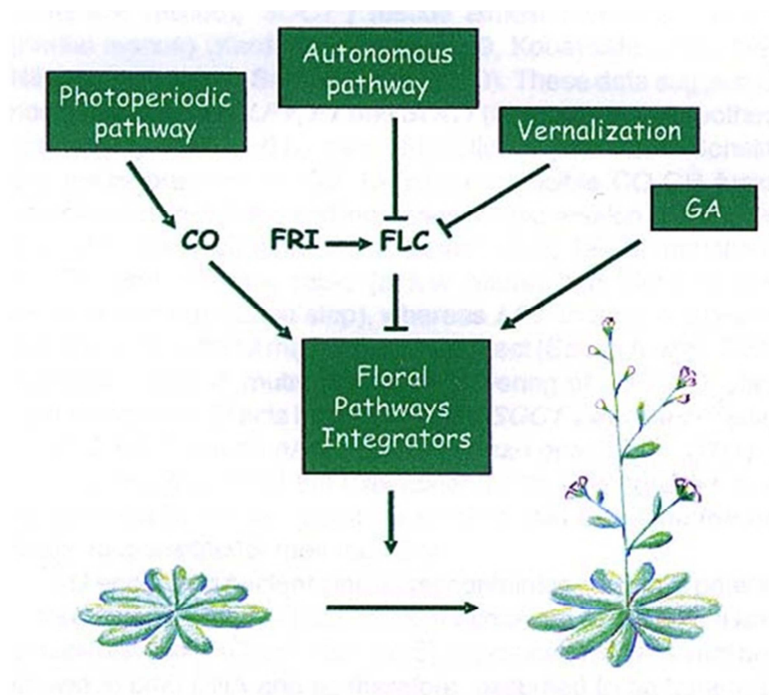


Fig.2.7: Rappresentazione dell'influenza di FLC sulla fioritura in Arabidopsis, la vernalizzazione come i pathway autonomi portano all'espressione di FLC con conseguente ritardo della fioritura.

3. SCOPO DELLA TESI

Nell'ambito del progetto AENEAS, finanziato dall'Unione Europea, il nostro gruppo di ricerca è particolarmente interessato ad analizzare quei meccanismi che portano alla formazione di epialleli che possono rimanere stabili nella progenie poiché rappresentano un'importante fonte di variabilità, utilizzabile nei programmi di miglioramento genetico.

Lo studio dell'ereditabilità di epialleli viene svolto in parallelo in *Arabidopsis thaliana* e *Zea mays* mediante particolari tecniche che permettono di trovare geni indotti da stress e regolati epigeneticamente, definiti EPITARGET. Queste tecniche si basano sull'analisi del trascrittoma mediante mRNA-Seq (sequenziamento di RNA messaggero); l'analisi della metilazione del DNA mediante BIS-Seq, ovvero il sequenziamento del DNA in seguito a conversione con Bisolfito; l'analisi delle modificazioni istoniche attraverso ChiP-Seq che consiste nell'identificazioni delle regioni genomiche che portano determinate modificazioni della cromatina attraverso precipitazione della cromatina con specifici anticorpi che riconoscono determinate modificazioni e il conseguente sequenziamento; e l'analisi dei miRNA con la tecnica sRNA-Seq che consiste nel sequenziamento degli small-RNA.

Inizialmente questi epitarget verranno individuati in piante sottoposte a stress da freddo, quindi questo progetto di tesi si propone di validare questi epitarget su piante sottoposte a ulteriori differenti stress ambientali e su mutanti per epiregolatori.

In quest'ottica la disponibilità di specifici mutanti a carico di geni che regolano/controllano queste modificazioni epigenetiche (epiregolatori) è di fondamentale importanza. Queste linee mutanti inserzionali sono state ottenute attraverso l'incrocio di una linea di mais wild-type con polline derivante da una linea in cui il trasposone Mu è particolarmente attivo (Fig. 3.1). In questo modo ogni individuo della progenie presenterà inserzioni indipendenti a carico di geni diversi. I geni mutati in ciascuna pianta della progenie di questo incrocio possono essere facilmente identificati attraverso sequenziamento delle regioni fiancheggianti il trasposone Mu. In questo modo si possono ottenere mutazioni inserzionali a carico di geni di interesse.

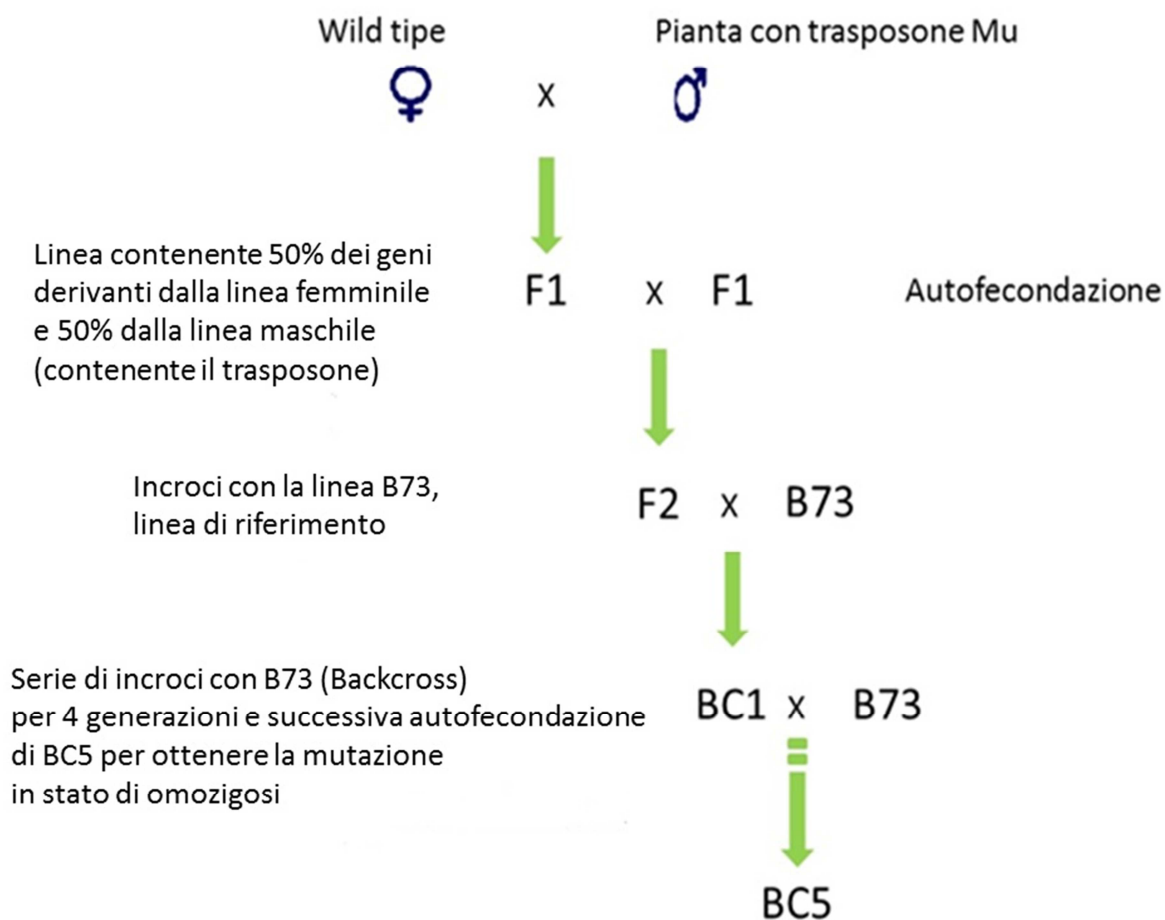


Fig.3.1: Descrizione delle linee con mutanti inserzionali. Una linea wild tipe viene incrociata con una linea contenente il trasposone Mu attivo, la successiva linea F1 viene poi autofecondata per avere una popolazione di partenza uniforme. La linea F2 derivante viene poi incrociata con la linea B73 in modo da poter lavorare con un genoma di riferimento già sequenziato. Ovviamente in tutti questi incroci verranno selezionate le piante che porteranno la mutazione inserzionale. Dopo 5 reincroci con la linea B73 si otterrà una linea BC che verrà auto fecondata per 2 cicli per portare la mutazione ad uno stato di omozigosi.

Purtroppo attraverso questa procedura si ottengono mutanti in un *background* ibrido ed è quindi necessario procedere con almeno 5 reincroci sulla linea B73, linea di riferimento per il mais di cui è stato completamente sequenziato il genoma, prima di passare poi all'autofecondazione delle linee BC5 per avere la mutazione in stato di

omozigosi. Durante tutti questi incroci è necessario seguire la segregazione della mutazione attraverso la genotipizzazione di ogni singolo individuo secondo un protocollo che prevede l'utilizzo della reazione a catena della polimerasi. Seguire il backcross su 4 linee mutanti per diversi epiregolatori è stato uno dei primi obiettivi della tesi, procedendo all'estrazione di DNA e all'applicazione della PCR per identificare tra le piante sorelle quelle che portano l'inserzione del trasposone Mu nel gene di interesse.

Nella seconda parte della tesi abbiamo poi lavorato alla messa a punto di un protocollo di stress termico sulla base delle indicazioni derivanti da *Arabidopsis thaliana* da altri gruppi partecipanti al progetto AENEAS. È stato testato uno stress da shift termico, nel caso specifico le piante sono state sottoposte ad un periodo di crescita di 8 giorni a 15°C per poi essere trasferite a 42°C per 2 giorni. L'effetto dello stress è stato valutato mediante l'uso di una linea silenziata epigeneticamente.

4. MATERIALI E METODI

4.1 MATERIALE VEGETALE

Le estrazioni di DNA sono state eseguite a partire da foglie di piante di mais. Per quanto riguarda i mutanti CHR120, HDA108, FPA, DMT101 e AGO5, *la company* che ci ha fornito le cariossidi è la Biogemma. Le piante sono state coltivate in campo o in serra con aggiunta di luce artificiale quando necessario.

4.2 ESTRAZIONE DNA GENOMICO

Il DNA genomico dei vari mutanti utilizzato per le reazioni di PCR per il genotyping è stato estratto utilizzando una soluzione di lisi (microLYSIS®-PLUS - Microzone Ltd). Questa soluzione di lisi consente il rilascio di una piccola quantità di DNA genomico (non purificato) da una minima quantità di tessuto vegetale. Il protocollo è il seguente:

- Raccogliere una sezione di 2x1 mm della foglia più giovane della pianta e trasferirla in microamp;
- Aggiungere 20µl di soluzione di microlisi e cercare, per quanto possibile, di distruggere con l'aiuto di un puntale la sezione di foglia;
- Porre i campioni in termociclatore dove rimarranno overnight a 65°C;
- Il giorno seguente impostare il termociclatore per i seguenti step:
 - .1. 65°C per 15 minuti
 - .2. 96°C per 2 minuti
 - .3. 65°C per 4 minuti
 - .4. 96°C per 1 minuto
 - .5. 65°C per 1 minuto
 - .6. 96°C per 30 sec
 - .7. Hold a 20°C

Attraverso questo ciclo termico il DNA genomico viene rilasciato in soluzione ed è pronto per una eventuale PCR. Data la bassa resa di questa estrazione è inutile controllarlo attraverso elettroforesi.

4.3 PCR E DISEGNO DEI PRIMERS

La Reazione a Catena della Polimerasi o PCR è una tecnica che permette l'amplificazione esponenziale di frammenti di DNA sfruttando la capacità di sintesi del DNA dell'enzima DNA polimerasi che permette una duplicazione di tipo semiconservativa. Questo enzima infatti è in grado di sintetizzare copie multiple di una sequenza specifica di DNA racchiusa tra due brevi tratti di sequenza nota, su cui sono stati disegnati degli inneschi (primers) specifici. La PCR prevede l'alternarsi ciclica di tre fasi:

- **Denaturation:** fase di denaturazione della doppia elica di DNA a 94/95 °C per 30/60”;
- **Annealing:** fase in cui i primers si attaccano alle due estremità del frammento da amplificare. Normalmente viene condotta a 55/60° C a seconda del contenuto in G-C dei primers, per 30/60”;
- **Extension:** fase in cui la DNA polimerasi sintetizza i nuovi filamenti di DNA.

La polimerasi utilizzata nelle reazioni di PCR è stata isolata nei primi anni ottanta dal microrganismo *Thermus aquaticus*, identificato nelle pozze di acqua calda del parco nazionale di Yellowstone, negli Stati Uniti. Questo batterio che quindi vive normalmente a temperature di circa 75°C possiede una DNA polimerasi altamente termostabile, che quindi non viene degradata durante la prima fase di denaturazione del DNA, in cui si deve lavorare a temperature di circa 95°C. Questa DNA polimerasi è stata denominata Taq polimerasi e ha un optimum di attività a 72°C, temperatura a cui normalmente viene condotta la fase di extension. L'esecuzione di queste reazioni cicliche a diverse temperature richiede un termociclatore (GeneAmp®PCR System

9700 Applied Biosystems) in cui impostare tempi e temperature che devono essere applicati alla miscela la cui composizione può variare a seconda delle diverse applicazioni specifiche. Il termociclatore solitamente viene impostato nella seguente maniera:

1. 95°C per 5'
 2. 95°C per 1'
 3. 58-60°C per 30''
 4. 72°C per 1'-3'
 5. 72°C per 12'
 6. 4°C
- } I cicli vengono ripetuti circa 35-40 volte

Solitamente la PCR viene condotta per circa 35-40 cicli, alla fine dei quali normalmente si ottengono più di un miliardo di copie del tratto di DNA di interesse compreso tra i due primer forward e reverse. Il mix tipico di una reazione di PCR è composto da:

- Buffer di reazione: specifico per ogni enzima e un mix di sali e ha la funzione di mantenere il pH ideale per il funzionamento della Taq.
- MgCl₂ o MgSO₄ : lo ione Mg²⁺ è un cofattore necessario per il corretto funzionamento della polimerasi, inoltre influenza la specificità dei primers e favorisce l'inserimento dei dNTPs. È importante dosare correttamente la quantità di Mg²⁺ in quanto un eccesso di questo cofattore rende molto aspecifica l'attività della polimerasi.
- dNTPs: sono i mattoni da costruzione per la sintesi del filamento di DNA.
- Primers Forward e Reverse.
- Taq DNA polimerasi.

- Additivi per PCR: sono sostanze eterogenee per natura (DMSO, Betaine, etc) con la comune capacità di destabilizzare i filamenti del DNA rendendo più facile la denaturazione di regioni ricche in GC che tendono a formare strutture secondarie molto stabili o rendendo più specifico l'attacco dei primers.

CONCENTRAZIONE NEL MIX:

Buffer 10X (Invitrogen)	1X	5 μ L
MgCl₂ 25 mM	1,5/2,5 mM	3/5 μ L
Primer Fw 10μM	0,4 μ M	2 μ L
Primer Rev 10μM	0,4 μ M	2 μ L
dNTPs mix 10mM	200 μ M	1 μ L
DNA stampo	50/100ng	Variabile
Taq polimerasi (5U/μl)	2,5 unità	0,5 μ L
H₂O sterile	/	A volume

Le dimensioni dei frammenti amplificati vengono controllate tramite elettroforesi su gel d'agarosio come descritto successivamente. Qualora la PCR non avesse dato i risultati attesi, sono state modificate le condizioni standard cercando di aumentare la resa o la specificità della reazione a seconda delle necessità. In particolare per ottimizzare i risultati siamo andati ad agire sulle seguenti variabili:

- la concentrazione di MgCl₂ che può rendere più o meno specifica l'amplificazione;
- la quantità di DNA di partenza;
- la temperatura di annealing che influenza la specificità di attacco dei primers;
- la durata dei diversi passaggi della PCR a seconda della lunghezza del frammento;

- il numero di cicli per aumentare o ridurre il numero di frammenti sintetizzati;
- il tipo di DNA polimerasi che può essere più adatta a templati difficili o lunghi.

Nella maggior parte delle reazioni di PCR è stata usata la Taq DNA Polymerase (Invitrogen).

4.4 MUTANTI INSERZIONALI E PRIMERS

Come accennato nel capitolo introduttivo, il tipo di trasposizione molto diffusa nei vegetali è la trasposizione mediante l'escissione dell'elemento e la sua successiva inserzione in un'altra posizione. Successivamente alla scoperta di Barbara McClintock sono stati scoperti ed identificati molti trasposoni in mais e uno di questi è il trasposone Mu (*Mutator*). Questo trasposone, identificato nel 1978, codifica per una trasposasi che riconoscono l'elemento Mu a livello delle due estremità terminali ripetute ed invertite (TIR) di circa 220bp (Fig4.1).



Fig.4.1: struttura generale di un trasposone dove a fianco si trovano le sequenze TIR (estremità invertite e ripetute).

Gli elementi trasponibili Mu, in particolare si inseriscono prevalentemente a livello di sequenze codificanti, rappresentando un ottimo mezzo per la mutagenesi casuale (Fig. 4.2). Dato che la trasposizione avviene molto tardi nello sviluppo, al punto che il gametofito normalmente contiene mutazioni indipendenti, è sufficiente utilizzare il polline di una linea Mu attiva per impollinare un'infiorescenza femminile di una pianta "recipiente" In aggiunta, poiché gli elementi Mu raramente si excidono, le mutazioni

causate da questo elemento trasponibile sono ereditabili (Lisch D et al., 1995; China F. Lunde et al., 2003).

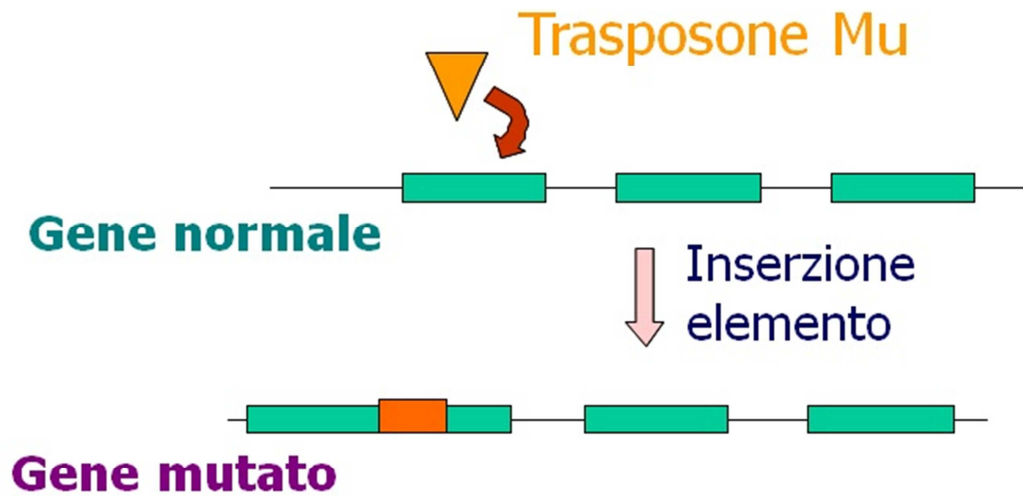


Fig 4.2: Inserzione del gene Mu all'interno di sequenze codificanti, causando così mutagenesi casuale.

Lo screening di mutanti così ottenuti è possibile attraverso due vie: attraverso la *forward genetics* ovvero l'osservazione delle piante alla ricerca di fenotipi mutanti interessanti o attraverso la *reverse genetics* e l'applicazione della reazione a catena della polimerasi (PCR). In questo caso primers disegnati sulle sequenze TIR vengono utilizzati in combinazione con primers gene-specifici, per individuare eventuali inserzioni a carico di un gene di interesse (Bensen et al.1995;Das and Martienssen 1995;Chuck et al. 1998;Hanley et al. 2000) (Fig.4.3). Infatti, nella progenie mutante, con ogni pianta che porta la trasposizione in un locus differente, è possibile, conoscendo la sequenza del trasposone risalire alla sequenza delle regioni fiancheggianti l'inserzione, e di conseguenza alla sequenza del gene interrotto.

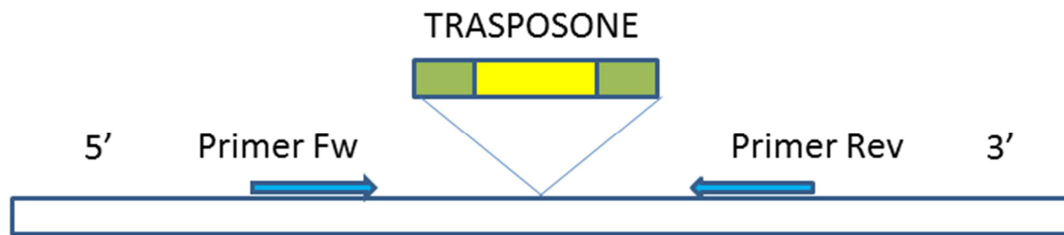


Fig.4.3: Il primer forward (Fw) ed il primer reverse (Rev) sono quei primer gene-specifici che servono per individuare eventuali inserzioni

Questo approccio è limitato dalla conoscenza delle sequenze del trasposone, ma è molto più veloce e attendibile del primo. Diverse organizzazioni e aziende private hanno sviluppato negli anni vaste collezioni di mutanti Mu e queste sono uno strumento molto utile per studi sulla funzione dei geni e per progetti di genomica. Tra queste anche l'azienda BIOGEMMA, partner del progetto AENEAS ha prodotto una serie di mutanti inserzionali per diversi epiregolatori in mais. L'inserzione all'interno dei geni di interesse è stata verificata dalla company stessa che ha poi provveduto al primo re-incrocio della pianta mutante con la linea inbreed B73 per l'introggressione della mutazione in questo background genetico. Questa introgressione deve essere condotta per almeno 5 cicli di re-incrocio ed a ogni incrocio nella progenie bisogna identificare le piante che portano la mutazione da quelle invece wt. A questo scopo sono state condotte delle PCR utilizzando un primer specifico sulla sequenza del gene epiregolatore e un primer sulla sequenza delle regioni TIR del trasposone. Le sequenze dei suddetti primers non possono essere riportate in quanto di proprietà dell'azienda (BIOGEMMA) che ha prodotto i mutanti stessi.

4.5 CORSA ELETTROFORETICA

L'elettroforesi è una tecnica che permette la separazione delle molecole biologiche in base al loro peso molecolare, permettendo inoltre di stimarne anche quantità e qualità. Questa tecnica viene utilizzata di routine per quantificare e verificare la qualità del DNA e RNA estratto e per controllare le dimensioni dei frammenti amplificati tramite

PCR. L'elettroforesi sfrutta la carica netta, positiva o negativa, che le molecole biologiche hanno una volta poste in una particolare soluzione salina. Se sottoposte al passaggio di corrente elettrica le molecole tenderanno a migrare verso l'elettrodo con carica opposta rispetto a quella propria, separandosi in base al loro peso molecolare in quanto le molecole più grandi migreranno più lentamente rispetto a quelle più piccole. Il DNA, che ha una carica netta negativa, tenderà quindi a migrare verso l'anodo che presenta carica positiva. Utilizzando marcatori di peso molecolare e concentrazione nota (1 Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen) è inoltre possibile stimare le dimensioni e le concentrazioni dei nostri campioni, derivanti da estrazioni di DNA, di RNA o da reazioni di PCR. L'elettroforesi viene normalmente condotta su gel di agarosio al 1% in tampone TAE 1X (1g di agarosio in 100 ml di TAE 1X). Per la colorazione degli acidi nucleici è stato utilizzato il colorante SybrSafe (Invitrogen). Il gel solido viene immerso nel tampone TAE 1X della vaschetta dove avviene la corsa. Quindi si possono caricare nel gel i campioni da controllare, preparati aggiungendo acqua demineralizzata e gel loading buffer (blu di bromofenolo). La corsa viene condotta con un voltaggio che dipende dalle dimensioni del gel, circa 100V ogni 10 cm di gel.

5. RISULTATI E DISCUSSIONI

5.1 PRODUZIONE DI MUTANTI PER EPIREGOLATORI

In questo progetto di tesi si è lavorato alla produzione di diverse linee di mais contenenti ciascuna una specifica mutazione inserzionale causata dall'inserzione del trasposone Mu. Nel caso specifico vi sono 5 linee di piante mutanti inserzionali per i seguenti geni:

- DMT101 (DNA metiltransferasi), responsabile dell'attivazione del pathway di metilazione (Garcia-Aguilar, 2010);
- CHR120, gene indirettamente responsabile del mantenimento del silenziamento delle sequenze metilate;
- HDA108, il quale codifica una deacetilasi istonica (Pfluger, 2007);
- AGO5 coinvolto nel silenziamento genico mediante sRNA (Zhang, 2010);
- FPA appartenente al il pathway autonomo e coinvolto nel processamento degli RNA messaggeri di molti geni target (Greenup, 2009).

Queste linee mutanti prodotte attraverso mutagenesi inserzionale sfruttando le capacità inserzionali del trasposone Mu devono essere introgredite più volte nel background genetico della linea B73 prima di poter iniziare una caratterizzazione fenotipica e molecolare dei diversi mutanti. Ad ogni ciclo di introgressione attraverso backcross sulla linea B73 è quindi necessario procedere all'identificazione delle piante che portano la mutazione in stato di eterozigosi. A questo scopo si è proceduto ad un genotyping molecolare sulle piante di ciascuna linea sfruttando la tecnica della PCR. Un primer universale disegnato sulle sequenze terminali invertite e ripetute del trasposone è stato utilizzato in combinazione con uno o più primers gene-specifici consentendo di ottenere amplificazione del frammento di interesse solo dalle piante mutanti. Queste piante sono state selezionate e successivamente re-incrociate con la linea B73.

In seguito sono riportate le rappresentazioni grafiche di ogni gene, con indicata la posizione dell'inserzione, i primers utilizzati per l'amplificazione e le foto dei gel risultanti, sui quali sono indicate le piante che presentano la mutazione inserzionale che poi sono state portate avanti nel programma di backcross.

DMT101

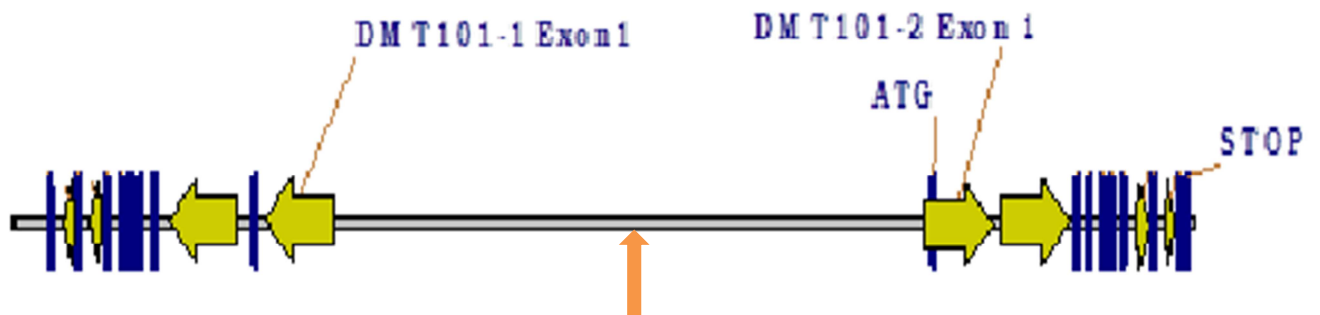


Fig.5.1: Rappresentazione dei gene DMT101 di mais. Due loci codificanti per l'ortologo di MET1 di Arabidopsis si trovano invertiti e ripetuti a distanza di circa 20kb. Il trasposone si è inserito circa a metà della regione intergenica e potrebbe essere in grado di silenziare entrambe le copie del gene (o nessuna delle due).

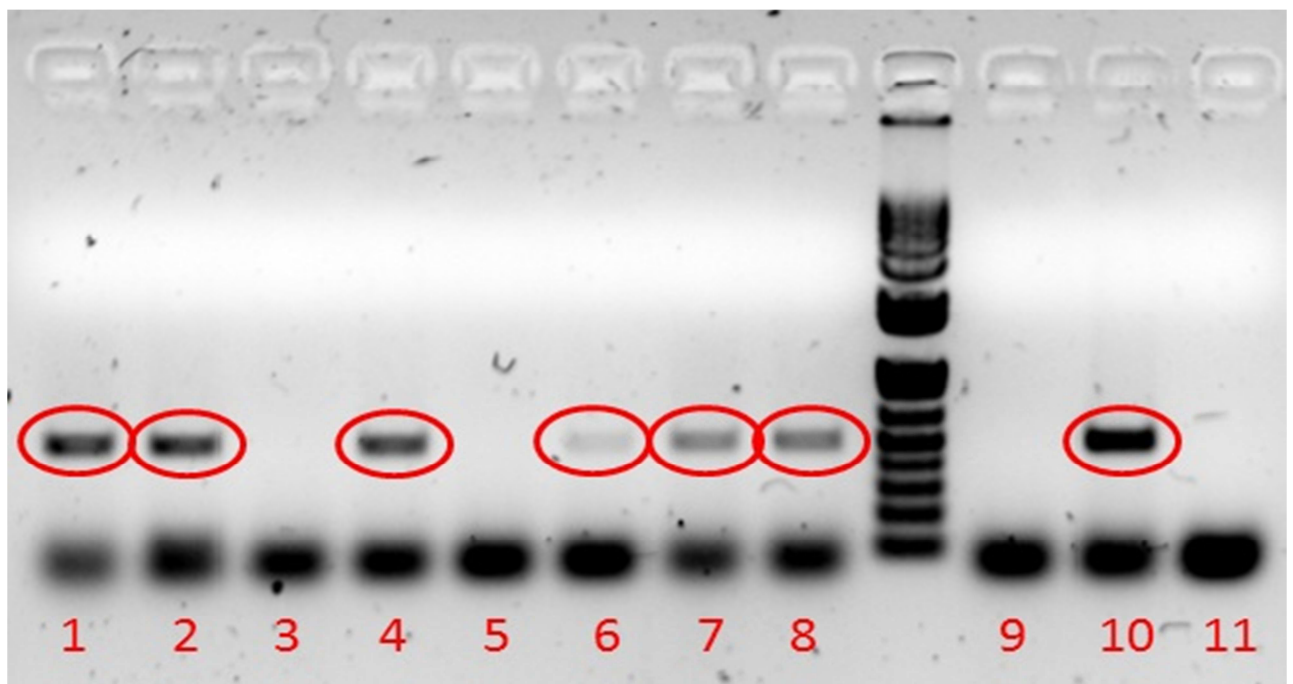


Fig.5.2: Fotografia del gel risultante della corsa elettroforetica. Nel cerchio viene evidenziata la banda che conferma l'insertione della mutazione.

I campioni utilizzati per la reazione di PCR, corrispondenti alle relative piante, sono stati numerati con numero progressivo da 1 a 11 e sono risultati positivi 7 di questi, come illustrato in figura 5.2.

CHR120

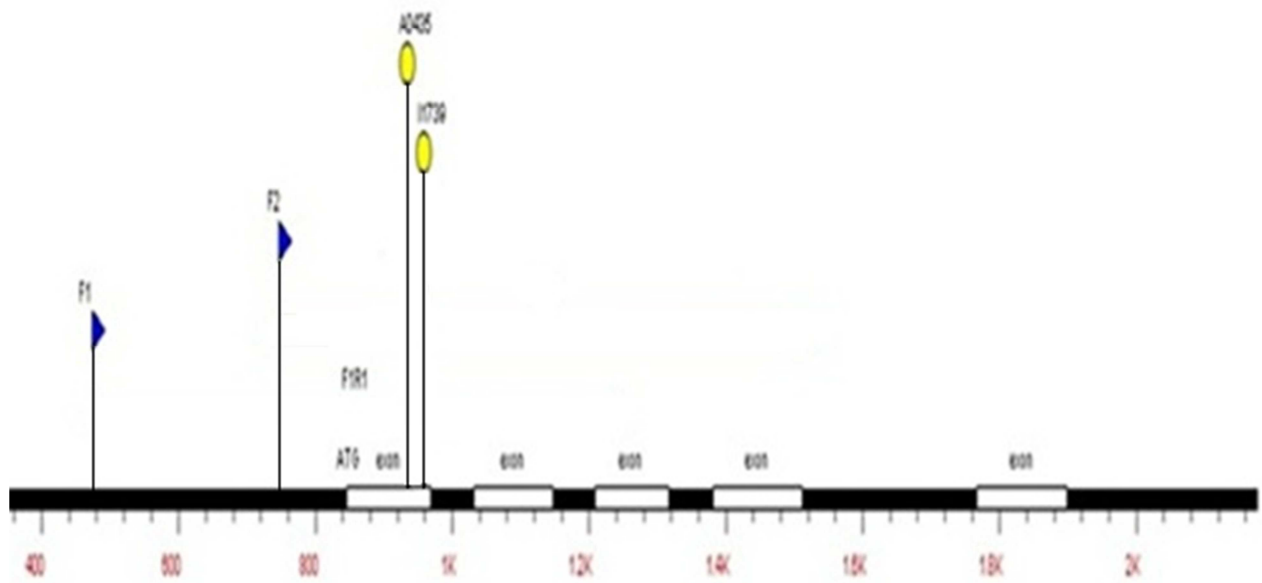


Fig.5.3: Rappresentazione del gene CHR120. I pallini gialli rappresentano l'inserzione del trasposone in due diverse linee mutanti. F1, F2 rappresentano rispettivamente i primers forward utilizzati nella reazione di PCR. Come primer reverse è stato utilizzato un primer universale disegnato sulle sequenze terminali invertite e ripetute del trasposone

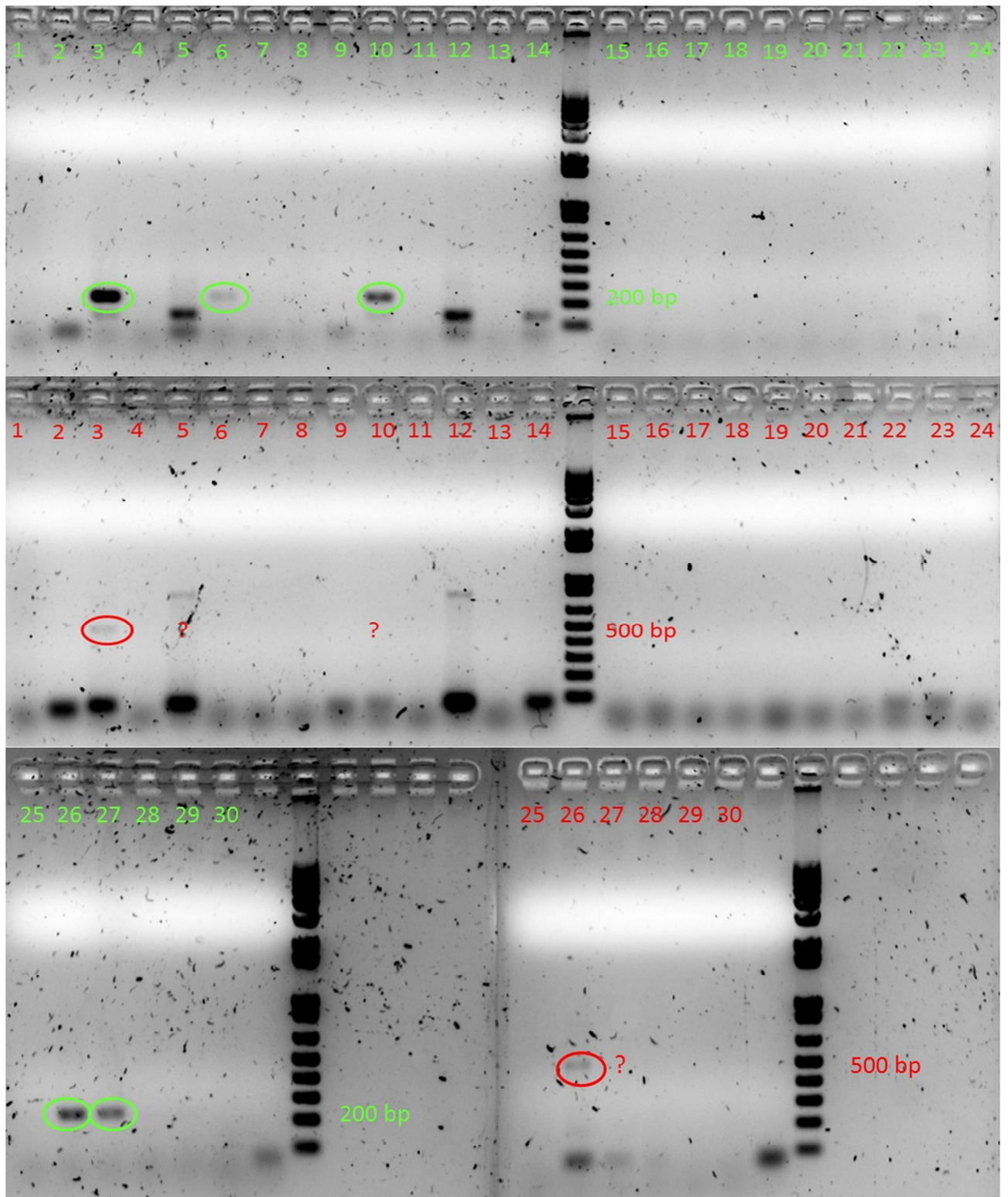


Fig.5.4: Immagine dell'elettroforesi del gene CHR120. Nei cerchi sono evidenziate le bande che indicano la presenza del trasposone. I punti di domanda, invece, si riferiscono a delle bande di cui non è chiara la presenza o meno a causa della difficile lettura.

Per questo gene sono state utilizzate due coppie di primers, F1 e F2 (entrambi forward) con il primer reverse universale disegnato sul trasposone, in modo da poter avere una conferma dell'inserzione del trasposone. La banda di amplificazione contenente la mutazione risulterà diversa per ogni coppia di primers utilizzata. In questo caso si avrà una banda a circa 200 bp (paia di basi) per la prima coppia di primers mentre per la seconda a circa 500 bp. In figura 5.4 si può notare la differenza della corsa elettroforetica in base alle coppie di primers utilizzate.

HDA108

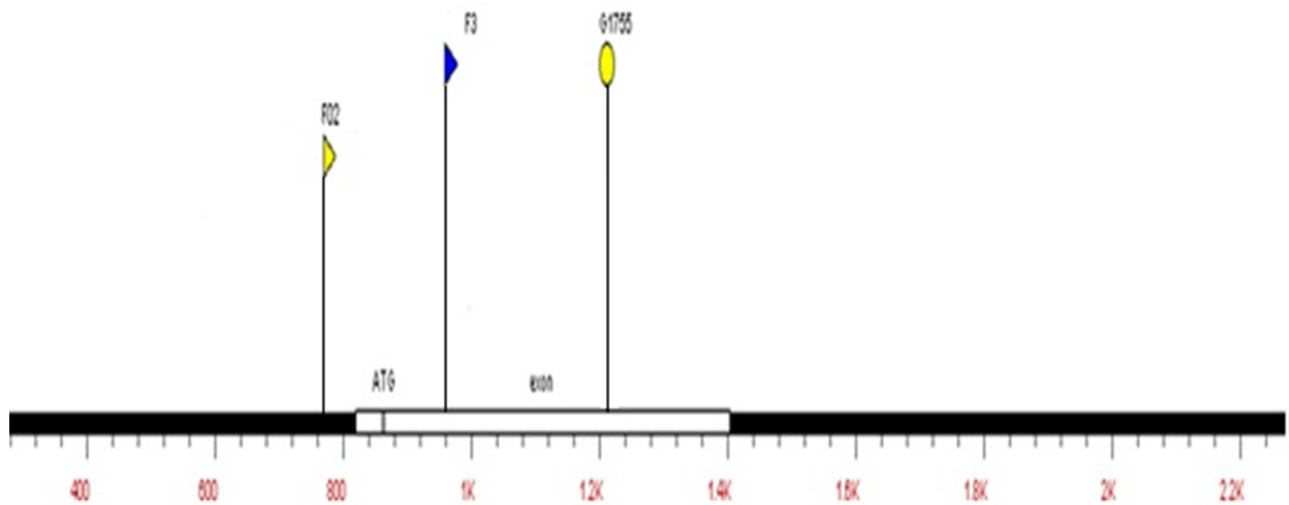


Fig.5.5: Rappresentazione schematica del gene HDA108. Come per la rappresentazione precedente vengono indicati i primers forward con F2 e F3 mentre con il pallino giallo viene indicata l'inserzione della mutazione. Come primer reverse viene sempre utilizzato il primer universale disegnato sul trasposone.

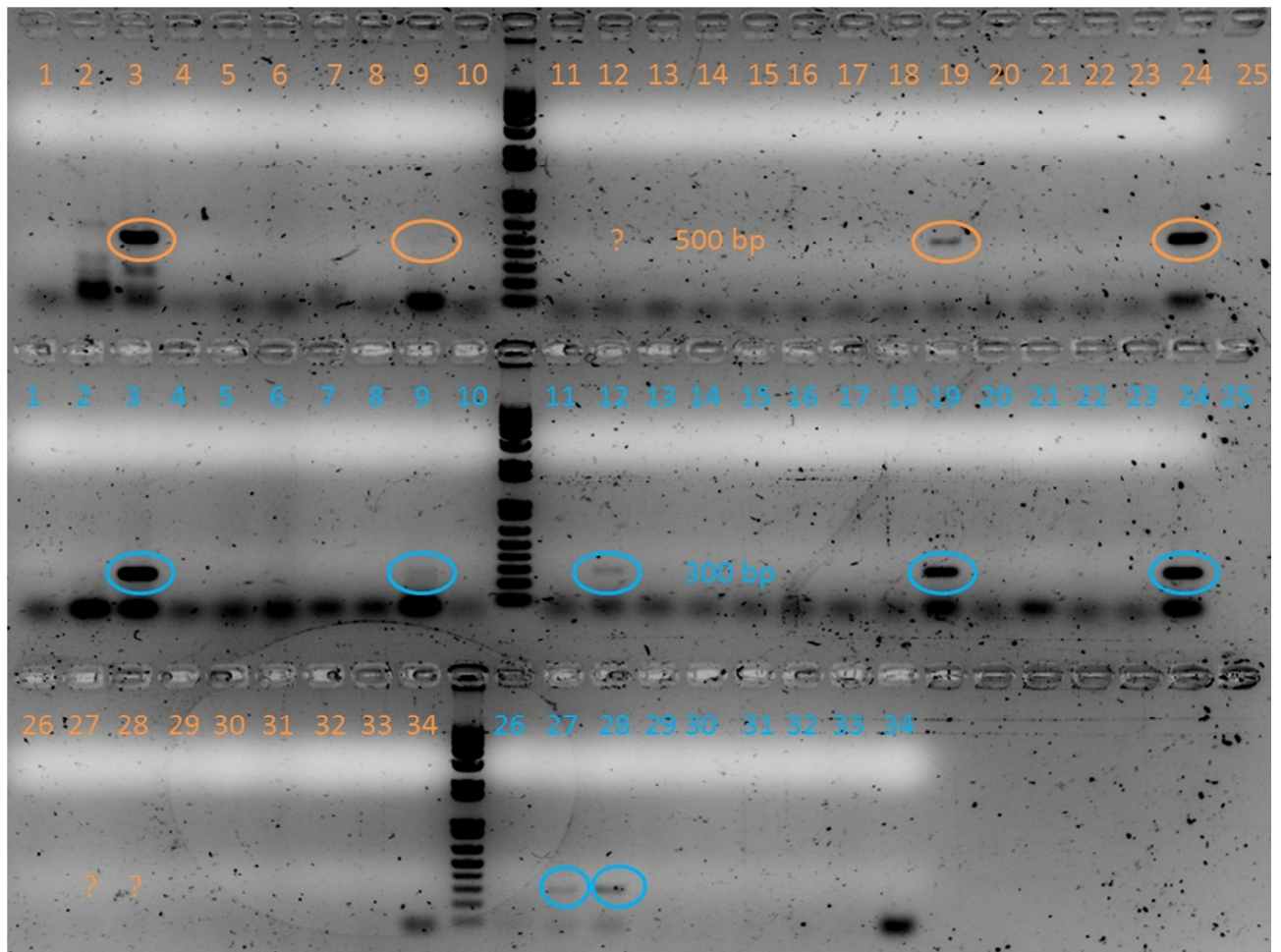


Fig.5.6: Foto del gel elettroforetico in cui vengono indicate le bande che indicano la presenza del trasposone. Con i punti di domanda sono indicate le bande di difficile lettura.

In questo caso le coppie di primers utilizzate portano ad avere una banda di amplificazione di 500 bp per la coppia contenente il primer F2 e di 300 bp per la coppia contenente il primer F3.

AGO5

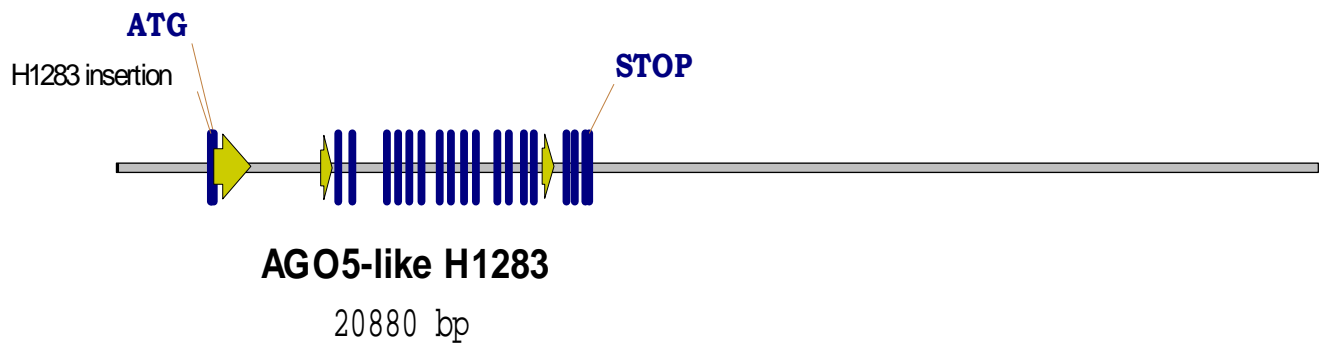


Fig.5.7: Schema rappresentante il gene AGO5 coinvolto nel meccanismo di silenziamento genico mediante sRNA. L'inserzione del trasposone avviene all'interno del primo esone del gene vicino all'ATG.

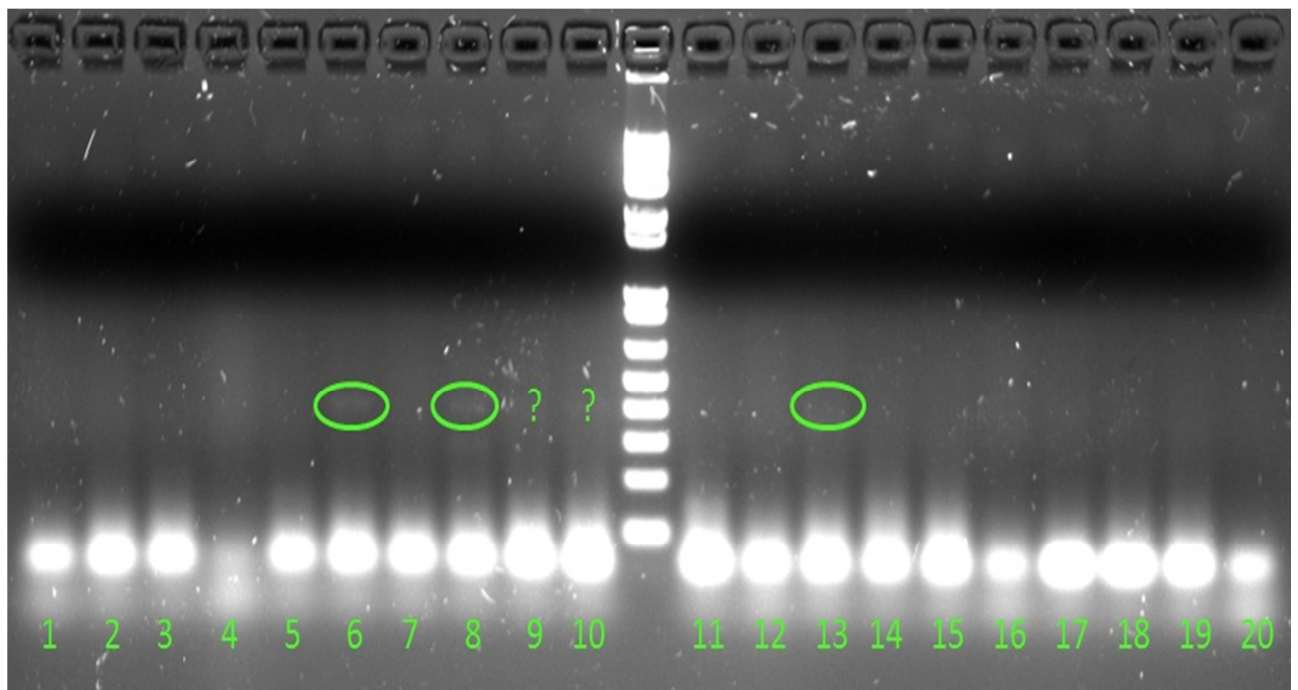


Fig.5.8: Gel risultante dalla corsa elettroforetica. Nell'immagine sono evidenziate le bande che rappresentano l'inserzione della mutazione. Come nei casi precedenti i punti di domanda si riferiscono a delle bande di cui non si è certi della presenza a causa della difficile lettura.

I campioni sono stati numerati in ordine progressivo da 1 a 20 di cui 3 (il numero 6, 8 e 13) risultano positivi, come rappresentato in figura 5.8.

FPA

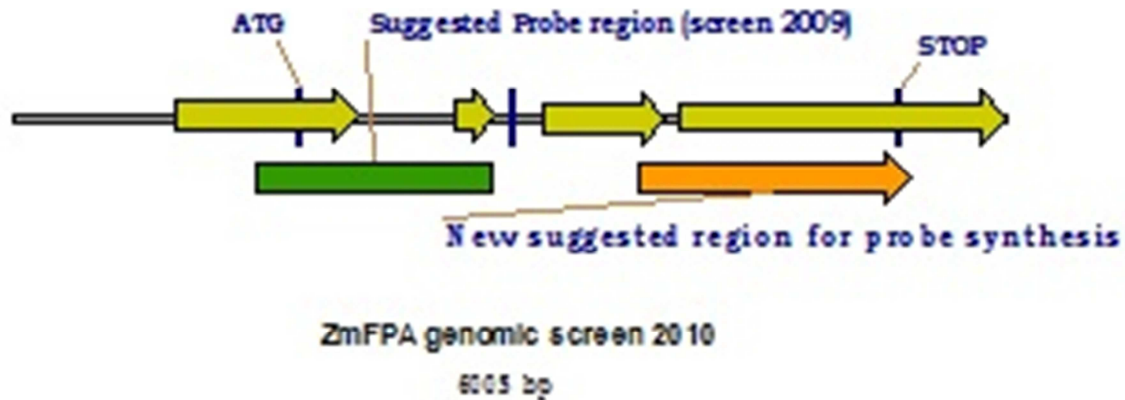


Fig.5.9: schema del gene FPA implicato nella fioritura della pianta. L'inserzione del trasposone è avvenuta nel primo introne del gene.

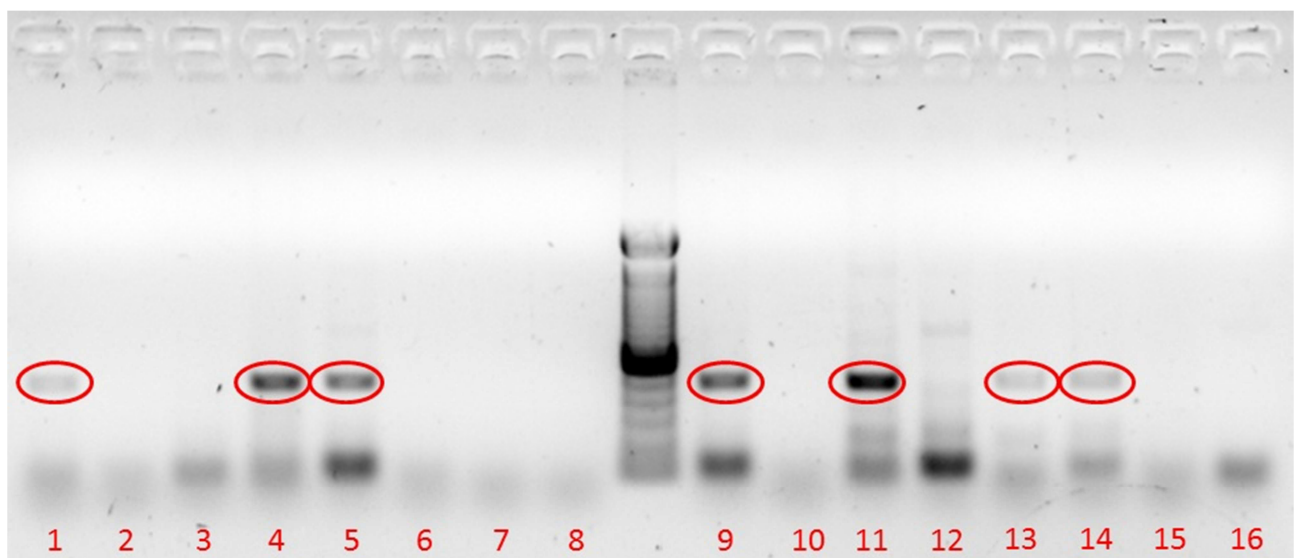


Fig.5.10: Foto del gel elettroforetico riguardante il gene FPA. Nei cerchi rossi sono evidenziate le bande di amplificazione che determinano la positività dell'inserzione del trasposone.

In questo caso le piante sottoposte all'esperimento sono state numerate da 1 a 16 e, come si può notare in figura 5.10, 7 di queste sono risultate positive all'inserzione del trasposone nel gene di interesse.

5.2 MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI STRESS TERMICO

Nella seconda parte della tesi abbiamo lavorato alla messa a punto di un protocollo di stress termico sulla base delle indicazioni derivanti da *Arabidopsis thaliana* da altri gruppi partecipanti al progetto AENEAS. In questa parte di progetto infatti diversi stress ambientali vengono utilizzati per indurre la formazione di epialleli e per la successiva analisi della loro propagazione nella progenie. Questi stress verranno applicati sia alla linea wild type B73 sia alle piante mutanti per i diversi epiregolatori che saranno ottenute alla fine del programma di backcross. Un recente lavoro pubblicato da un gruppo svizzero partecipante al progetto AENEAS ha dimostrato che in *Arabidopsis thaliana* uno shift termico provoca una destabilizzazione nel silenziamento genico portando all'espressione dei geni presenti nelle regioni eterocromatiche (Tittel-Elmer et al, 2010). Nell'esperimento effettuato su *Arabidopsis* le piantine sono state sottoposte ad un periodo di freddo (4°C) per una settimana e poi trasferite a 37°C per 15 ore: questo stress si è dimostrato essere in grado di indurre la trascrizione di regioni eterocromatiche, di sbloccare il silenziamento genico di una linea transgenica silenziata epigeneticamente e soprattutto di indurre la trascrizione di alcune classi di retrotrasposoni con la formazione di copie extra-cromosomali. È stato inoltre dimostrato che alla trascrizione degli elementi trasponibili e alla formazione delle copie extra-cromosomali ne segue una integrazione nel genoma solo in mutanti per epiregolatori appartenenti al pathway degli sRNA. Non vi è integrazione invece nella progenie di piante di *Arabidopsis* wild type.

Questi risultati ottenuti nella pianta modello *Arabidopsis thaliana* sono molto interessanti e potrebbero rappresentare un punto di partenza per indurre la creazione di nuovi epialleli stabili, ereditabili dalla progenie anche in mais per cui si è deciso di provare questo tipo di approccio anche nel nostro laboratorio.

Per effettuare lo stesso tipo di trattamento su *Zea mays*, si è dovuto innanzitutto trovare le condizioni di stress adatte che inducano la destabilizzazione del silenziamento genico ma che mantenga la vitalità della pianta, tenendo in considerazione che rispetto ad *Arabidopsis* il mais è una pianta di origine subtropicale e che quindi le condizioni termiche di crescita e di stress sono quindi completamente

diverse. È stato quindi effettuato un primo esperimento con condizioni diverse di temperatura (illustrate in figura 5.11) per trovare le condizioni stressanti che fossero in grado di preservare la capacità riproduttiva delle piante.

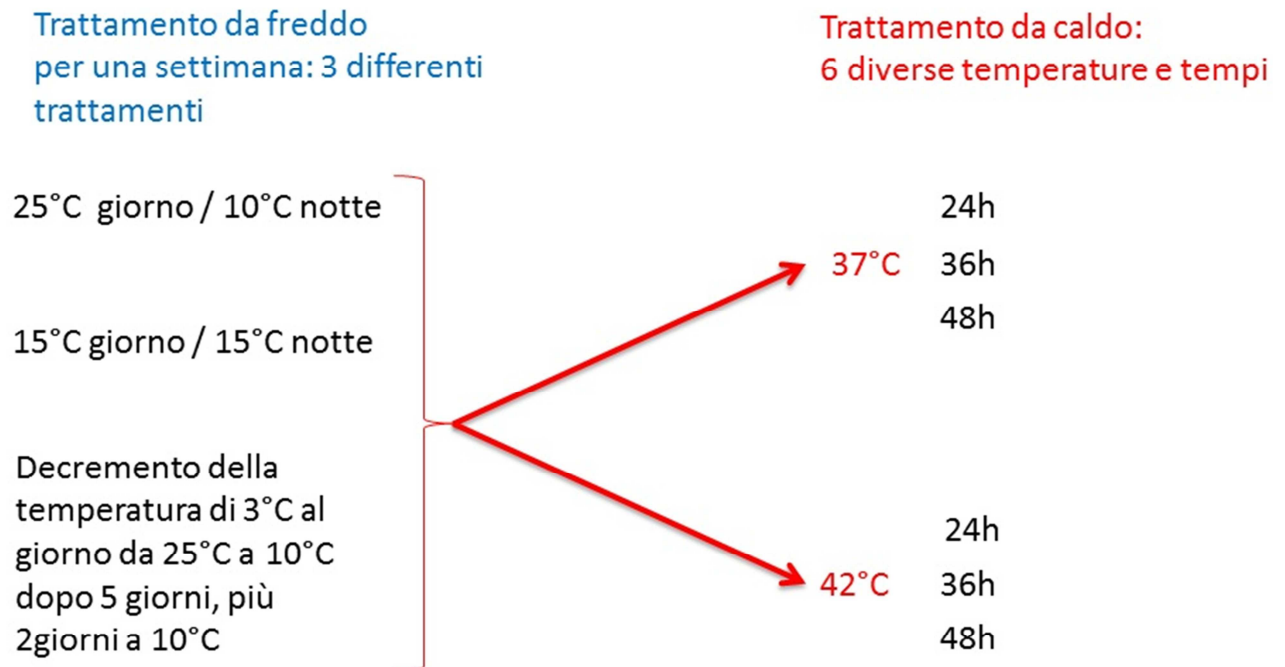


Fig.5.11: esperimento preliminare per verificare il tipo di stress che possa mantenere la vitalità della pianta.

Dopo aver individuato lo stress adatto, è stato effettuato l'esperimento applicando lo shift termico (Fig.5.14) in parallelo con la linea B73 e una linea transgenica silenziata portante l'istone H2B fuso alla YFP (yellow fluorescent protein), una proteina fluorescente (con emissione di colore giallo). Questa linea risulta essere silenziata epigeneticamente in quanto il transgene si è inserito in prossimità di un trasposone. La metilazione a carico della sequenza del trasposone mantiene silenziato anche il transgene, rendendo questa linea un ottimo "sensore" per individuare condizioni in grado di provocare un rilassamento del silenziamento epigenetico.



Fig.5.12: Rappresentazione schematica del gene della YFP. La metilazione, quindi il conseguente silenziamento, del transgene Δ KAN provoca a sua volta il silenziamento dell'espressione del gene della YFP e quindi la mancata fluorescenza.

All'inizio dell'esperimento avevamo a disposizione dei semi segreganti di questa linea, quindi prima di procedere con il trattamento si è dovuto procedere ad un genotyping delle piante per verificare la presenza della YFP. Primers specifici disegnati sulla sequenza della YFP nella cassetta del transgene sono stati utilizzati per identificare le piante mutanti tramite PCR, e il conseguente gel elettroforetico è riportato in figura 5.13. Le piante sottoposte a stress sono state suddivise in 4 gruppi in base al trattamento applicato, per ogni trattamento sono state utilizzate le piante che presentano la YFP, le piante di B73 e quelle che non presentano la YFP. Il trattamento 1 consiste nel lasciare le piante a temperatura ambiente (circa 27°C), in modo da avere un confronto con quelle che subiscono lo stress. Il trattamento 2 invece, prevede uno stress da freddo a 15°C per una settimana ed il successivo ritorno alla temperatura ambiente. Per quanto riguarda il trattamento tre, dopo una settimana di stress da freddo a 15°C, si procede con uno shock termico a 42°C per due giorni ed un successivo recovery a 27°C. l'ultimo trattamento a differenza del trattamento tre prevede che non vi sia un recovery a 27°C ma che la temperatura di 42°C sia mantenuta per altri 2 giorni. Per una rappresentazione schematica si veda la figura 5.14.

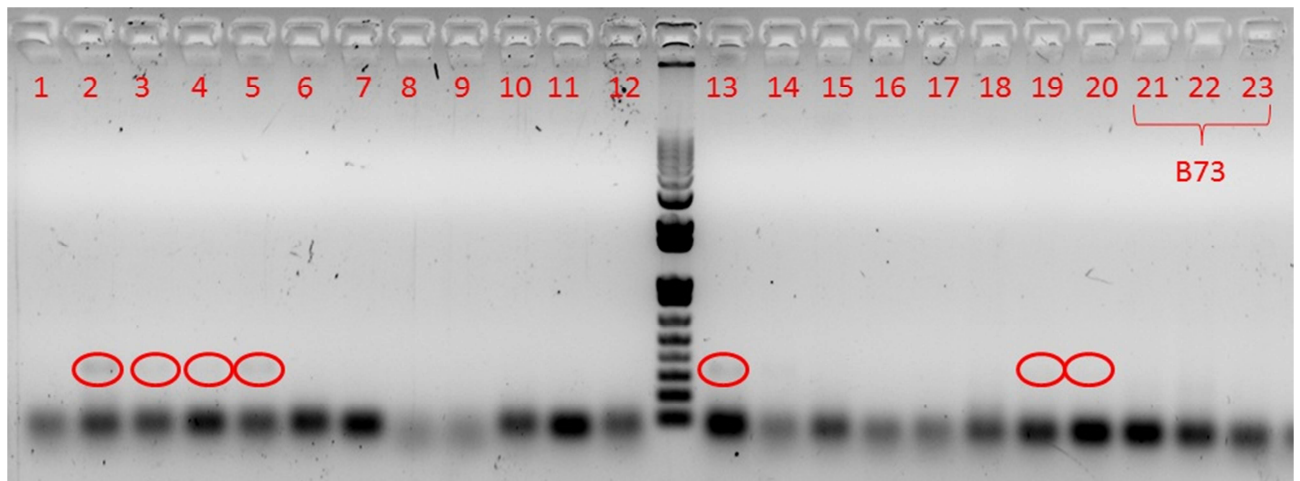


Fig.5.13: Gel elettroforetico risultante dalla reazione di PCR effettuata per verificare la presenza della YFP. I Campioni sono stati numerati da 1 a 23 (21, 22, 23 sono campioni di B73 inseriti per accertamento), solamente 7 di questi campioni presentano la banda di amplificazione che conferma la presenza della YFP.

YFP +: 7 piante YFP ?: 3 piante B73: 3 piante YFP -: 7 piante

27° C → To 17/01 ore 10.00
 15° C → T₁₅₋₁ 18/01 ore 10.00 -11.00
 15° C → T₁₅₋₈ 24/01 ore 10.00-11.00

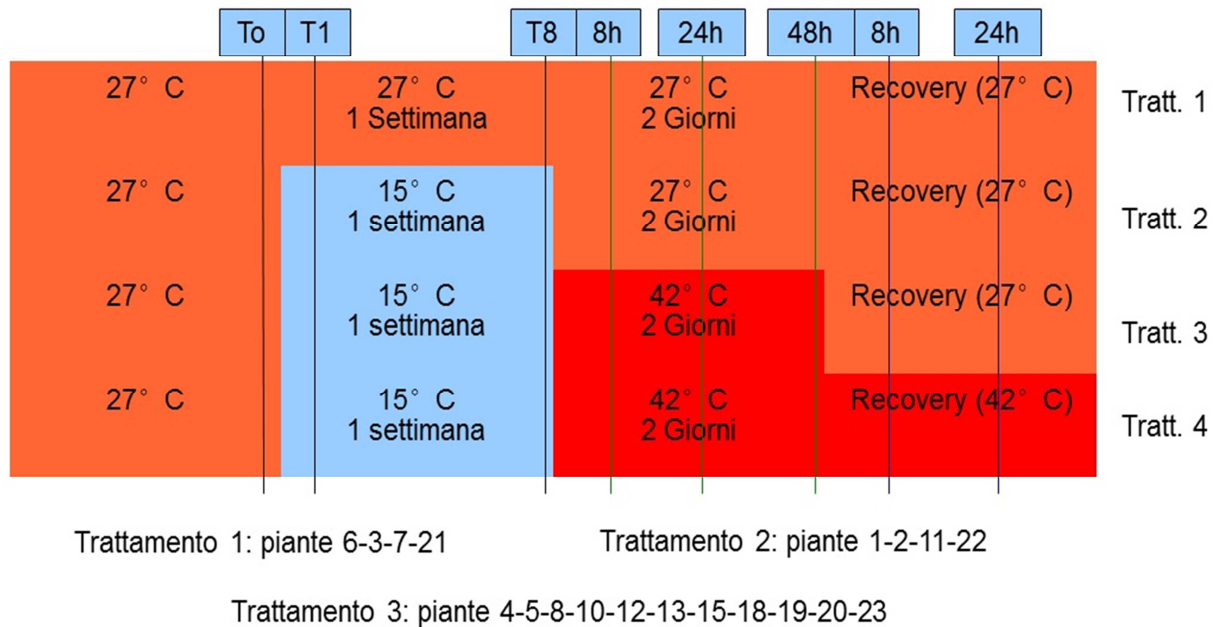


Fig.5.14: Rappresentazione schematica dello stress applicato sulle linee che presentala YFP e sulle linee B73. Con T₀, T₁, T₈ sono indicati i prelievi dei campioni ed i giorni in cui sono stati eseguiti (T₈ rappresenta il prelievo a 8 giorni dopo T₀). Sono inoltre rappresentati i prelevamenti effettuati durante il trattamento.

Durante il periodo in cui le piante sono state sottoposte allo stress sono stati prelevati dei campioni a varie temperature ed effettuate delle fotografie mediante microscopio con focale, in modo da poter verificare l'eventuale attivazione dell'espressione della YFP. Nelle fotografie risultanti, riportate nelle figure 5.15, 5.16 e 5.17, si può notare chiaramente la presenza della YFP mediante l'emissione della fluorescenza di colore giallo a livello dei nuclei delle piante dopo un solo giorno dallo shift termico.

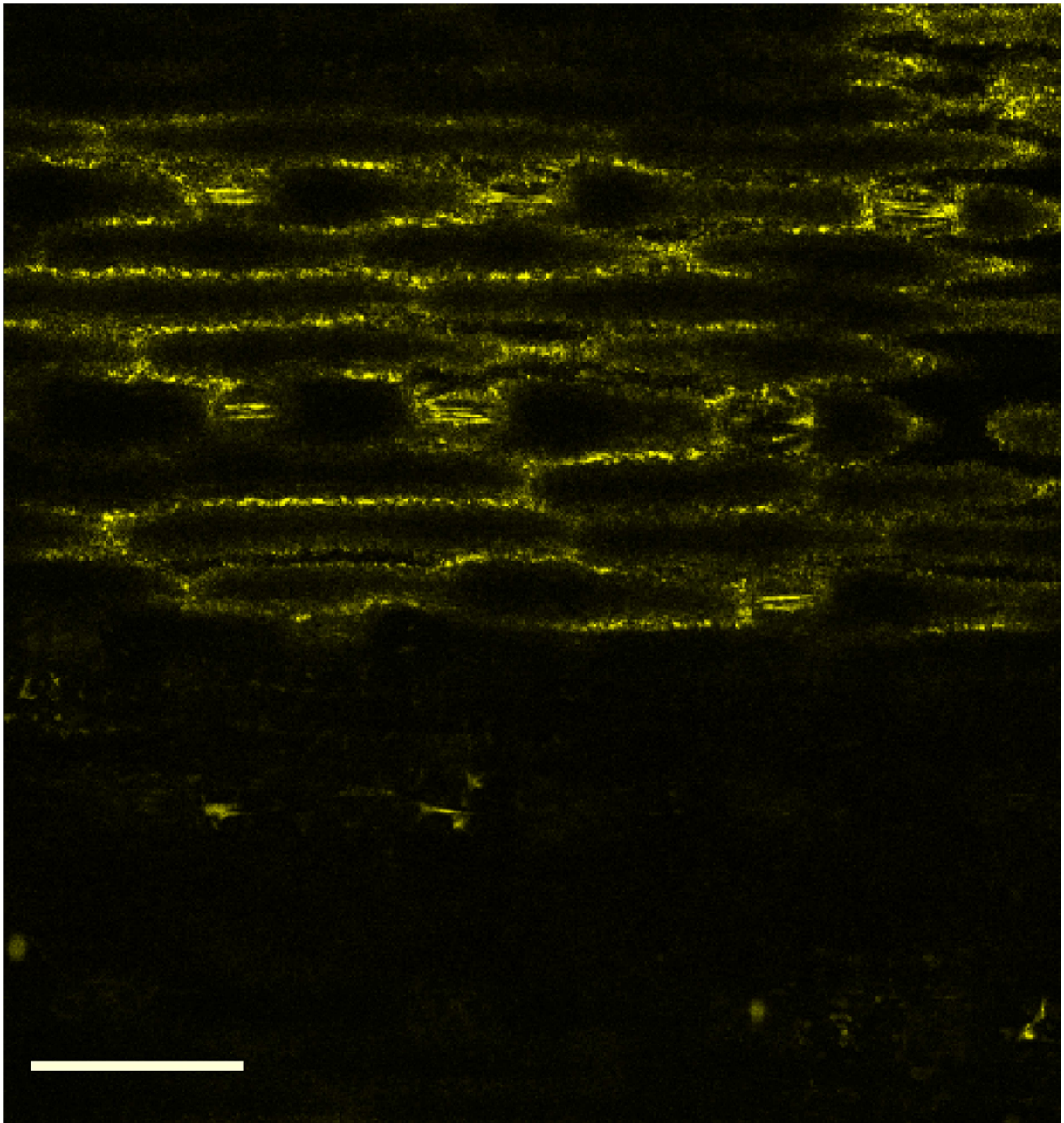


Fig.5.15: Campione della pianta 03 a 25°C la colorazione gialla rappresenta l'autofluorescenza delle pareti cellulari.

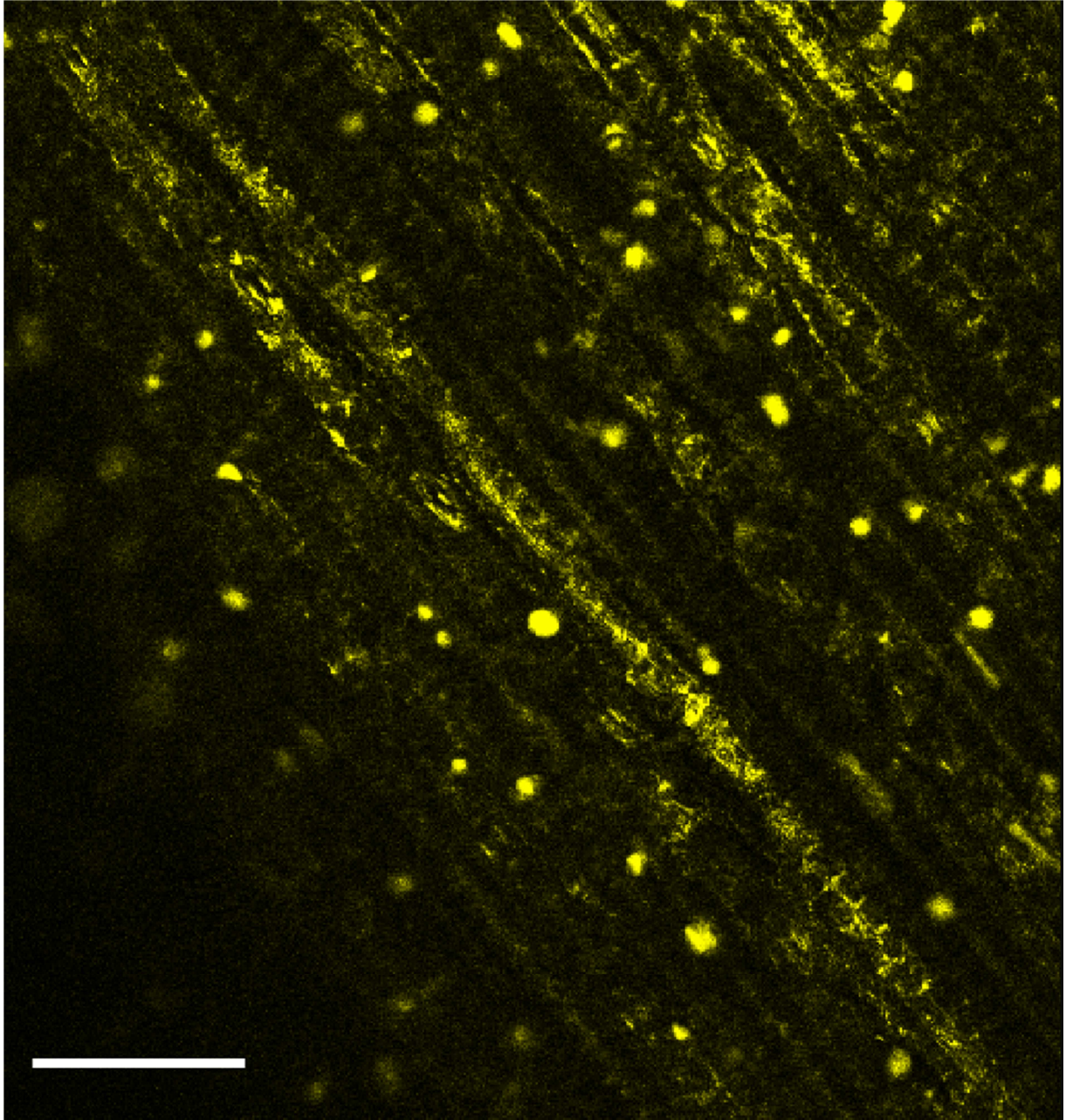


Fig.5.16: Campione della pianta 04 dopo 24h a 42°C, la pianta è stata sottoposta al trattamento 3.

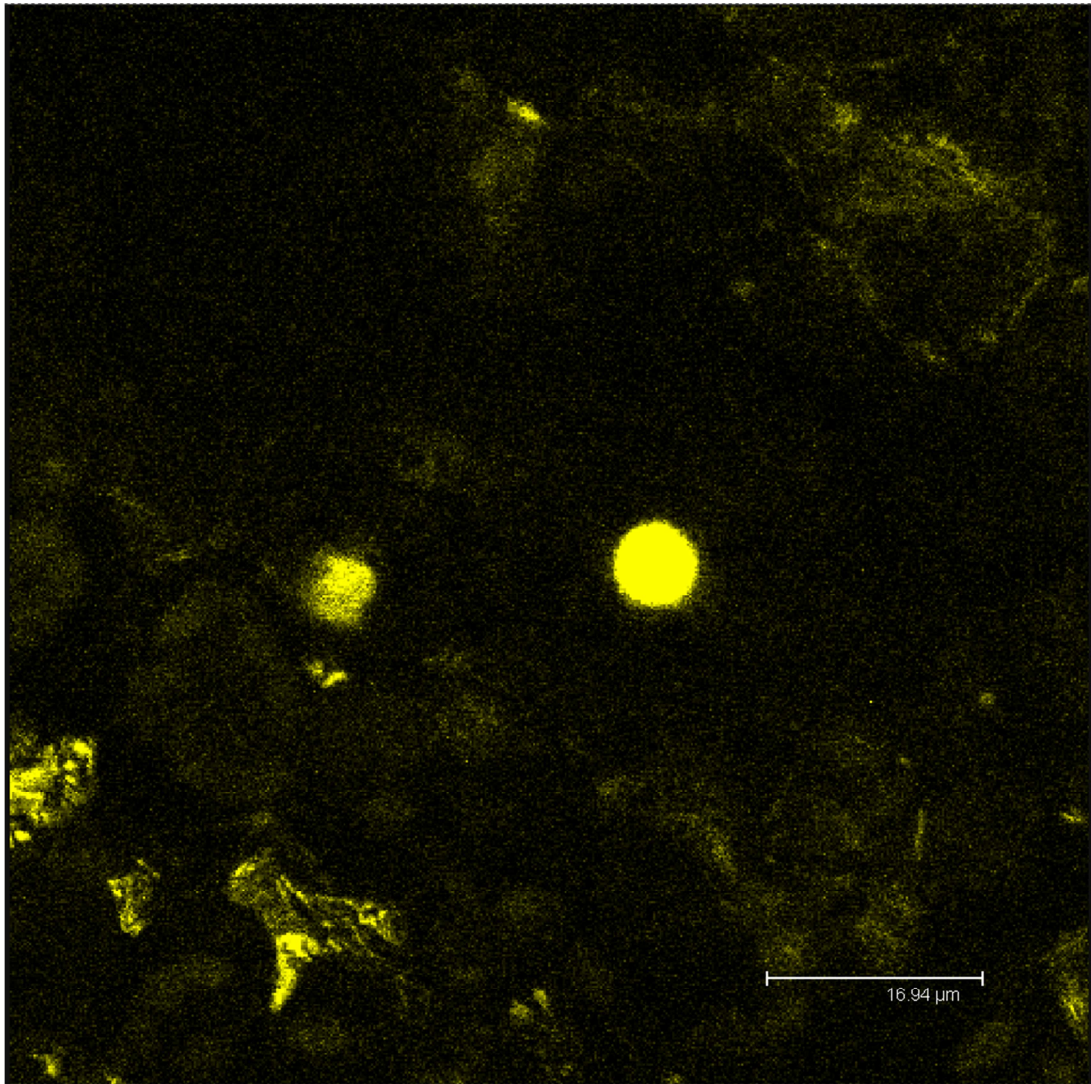


Fig.5.17: Foto dei nuclei della pianta numero 20 (YFP⁺) dopo 24h a 42°C, la pianta di riferimento è stata sottoposta al trattamento tre.

Lo stress applicato si è quindi dimostrato essere in grado di provocare un rilassamento del silenziamento epigenetico e quindi si può rivelare utile per indurre la formazione di epialleli in piante wild type e mutanti per epiregolatori e per poi analizzarne l'ereditabilità.

6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Fin dai tempi antichi l'uomo ha effettuato una selezione sulle piante coltivate di tipo fenotipico, in base ai caratteri ritenuti vantaggiosi. Questo tipo di selezione era basata principalmente sulla selezione naturale stessa e la comparsa di mutazioni spontanee che apportavano dei miglioramenti alle piante. Oggi come oggi si ha la certezza che sono dei cambiamenti nella sequenza di un gene a creare nuovi caratteri e fenotipi. Con questa certezza si sono potute creare nuove e specifiche mutazioni da utilizzare sia per scopi di ricerca sia per accelerare il miglioramento genetico delle piante coltivate. La creazione di questi mutanti infatti è di fondamentale importanza per capire e studiare la funzione dei vari geni. Grazie a questi studi si è potuto effettuare una selezione di tipo genotipico delle piante coltivate, ovvero una selezione di piante che portano quei geni legati a caratteri considerati vantaggiosi, oltre alla selezione di tipo fenotipico.

La prima parte di questo progetto di tesi è stata incentrata sulla produzione di specifici mutanti per epiregolatori al fine di studiare gli epitarget, ovvero quei geni che sono indotti da stress e regolati epigeneticamente. A questo scopo sono state costituite 5 linee mutanti di particolari geni contenenti una specifica mutazione inserzionale causata dal trasposone Mu, questa inserzione è a carico dei geni DMT101, CHR120, HDA108, AGO5 e FPA poiché sono geni coinvolti nella regolazione epigenetica. Queste linee mutanti inserzionali sono state ottenute attraverso l'incrocio di una linea di mais wild-type con polline derivante da una linea in cui il trasposone Mu è particolarmente attivo. Attraverso questa procedura però, vengono costituiti dei mutanti in un *background* ibrido ed è quindi necessario procedere con almeno 5 reincroci sulla linea B73, in modo da introgradire queste mutazioni nel background omozigote della linea B73. In questo processo è stato necessario seguire la segregazione della mutazione nel reincrocio utilizzando un protocollo di genotipizzazione basato sulla reazione di PCR (reazione a catena della polimerasi). Sono stati utilizzati dei primers gene-specifici, con un primer universale disegnato sulle sequenze terminali invertite e ripetute (TIR) del trasposone, per individuare la presenza della mutazione inserzionale in ogni pianta. Le piante che portano la mutazione inserzionale per ciascuna linea così identificate sono state quindi fatte

crescere e incrociate con piante della linea B73, all'interno del programma di reincroci successivi per introdurre la mutazione nel background omozigote B73.

La seconda parte invece si è focalizzata sulla messa a punto di un protocollo di stress termico per indurre la formazione di epialleli, in quanto uno stress di questo tipo porta all'espressione di geni presenti nelle regioni eterocromatiche e alla trascrizione e inserzione di alcuni retrotrasposoni. Questo lavoro è stato applicato in base ai risultati ottenuti in *Arabidopsis thaliana* da un gruppo di ricerca svizzero partecipante al progetto AENEAS. Uno shift termico da 4°C a 37°C è infatti in grado di indurre l'attivazione di una linea transgenica silenziata epigeneticamente e la trasposizione di una particolare classe di retrotrasposoni. Queste condizioni di stress non è applicabile alla pianta di mais, in quanto la temperatura di 4°C sarebbe letale per le piante mentre i 37°C rappresentano una temperatura quasi ottimale di crescita. A questo scopo è stato condotto un esperimento preliminare atto a trovare le condizioni di stress ottimali che inducano condizioni di stress senza intaccare la vitalità e la capacità riproduttiva della pianta. Questo stress è stato applicato in parallelo con la linea B73 (linea di riferimento) e la linea reporter silenziata epigeneticamente. Questa linea porta infatti un transgene esprime la YFP, la yellow fluorescent protein, una proteina che emette una fluorescenza gialla se osservata al microscopio a fluorescenza o con focale, ma in questa linea il transgene non si esprime. Il transgene infatti si è inserito in una sequenza intergenica, immediatamente a valle di un trasposone che risulta essere metilato e quindi silenziato. L'effetto di questa metilazione si estende anche al transgene che quindi risulta essere normalmente silenziato epigeneticamente. Questa linea, analogamente a quella utilizzata in Arabidopsi, risulta essere particolarmente utile per identificare condizioni di stress che inducano modificazioni epigenetiche in grado di sbloccare questo silenziamento e che quindi possono portare alla formazione di epialleli. Infatti lo stress termico da noi messo a punto, che prevede una settimana a 15°C e il successivo trasferimento delle piante ad una temperatura di 42°C per due giorni, si è rivelato essere in grado di attivare l'espressione della YFP, rilassando probabilmente il meccanismo di silenziamento epigenetico.

Attraverso questo lavoro di tesi è stato quindi possibile creare le basi (mutanti e protocolli di stress) per studiare come gli stress abiotici possano indurre modificazioni

epigenetiche che portano alla creazione di epialleli in mais, che possono anche essere ereditati nella progenie. Su queste basi, con questi strumenti di indagine in futuro si potrà chiarire il ruolo della regolazione epigenetica nella risposta a stress e soprattutto utilizzare epialleli stabili in programmi di miglioramento genetico.

7. BIBLIOGRAFIA

Aaron Greenup, W. James Peacock, Elizabeth S. Dennis and Ben Trevaskis (2009) The molecular biology of seasonal flowering-responses in Arabidopsis and the cereals. *Annals of Botany* 103: 1165–1172

Bensen RJ, Johal GS, Crane VC, Tossberg JT, Schnable PS (1995) Cloning and characterization of the maize *An1* gene. *Plant Cell* 7: 75–84

Bob B. Buchanan , Wilhelm Gruissem, Russell L. Jones (2003) *Biochimica e Biologia molecolare delle Piante*. Zanichelli 325-333; 914-915

Carlos M. Vicent (2010) Transcriptional activity of transposable elements in maize. *Vicent BMC Genomics*, 11:601

China F. Lunde, Darren J. Morrow, Laura M. Roy (2003) Progress in maize gene discovery: a project update *Funct Integr Genomics* 3 : 25–32

Damon Lisch (2009) Epigenetic Regulation of Transposable Elements in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:43–66

Daniel H. Chitwood & Marja C. P. Timmermans (2010) Small RNAs are on the move. *Research Review VOL 467 | NATURE | 415-418*

Das L., Martienssen R (1995) Site-selected transposon mutagenesis at the hcf106 locus in maize. *Plant Cell* **7**:287–294

Francois Roudier, Felipe Karam Teixeir* and Vincent Colot (2009) Chromatin indexing in Arabidopsis: an epigenomic tale of tails and more. *Trends in Genetics* Vol.25 No.11

Frank Johannes, Emmanuelle Porcher, Felipe K. Teixeira, Vera Saliba-Colombani, Matthieu Simon, Nicolas Agier¹, Agne` s Bulski, Juliette Albuisson, Fabiana Heredia, Pascal Audigier, David Bouchez, Christine Dillmann, Philippe Guerche, Fre´de´ ric Hospital, Vincent Colot (2009) Assessing the Impact of Transgenerational Epigenetic Variation on Complex Traits. *PLoS Genetics* Volume 5 | Issue 6 | e1000530

Jennifer Pfluger and Doris Wagner (2007) Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 645–652

Hanley S., Edwards D, Stevenson D, Haines S, Hegarty M, Schuch W, Edwards KJ (2000)

Identification of transposontagged genes by the random sequencing of Mutator-tagged DNA fragments from *Zea mays*. *Plant J* **22** : 557–566

Hidetaka Ito, Herve' Gaubert, Etienne Bucher, Marie Mirouze, Isabelle Vaillant & Jerzy Paszkowski () An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. Letter Research VOL 000 | NATUR E | 1-5

Lisch D, Chomet P, Freeling M (1995) Genetic characterization of the *Mutator* system in maize: behavior and regulation of *Mu* transposons in a minimal line. Genetics **139**: 1777–179

Marcelina Garcia-Aguilar, Caroline Michaud, Olivier Leblanc, and Daniel Grimanelli (2010) Inactivation of a DNA Methylation Pathway in Maize Reproductive Organs Results in Apomixis- like Phenotypes. The Plant Cell, Vol. 22: 3249–3267

Mary Gehring, Steven Henikoff (2007) DNA methylation dynamics in plant genomes. Biochimica et Biophysica Acta 1769: 276–286

McClintock B. (1950) The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize. Proc Natl Acad Sci U S **36** : 344 – 355

Meishan Zhang, Josphert N. Kimatua, Kezhang Xu, Bao Liu (2010) DNA cytosine methylation in plant development. journal of genetics and genomics 37: 1-12

Mireille Tittel-Elmer, Etienne Bucher, Larissa Broger, Olivier Mathieu, Jerzy Paszkowski, Isabelle Vaillant (2010) Stress-Induced Activation of Heterochromatic Transcription. PLoS Genetics Volume 6 | Issue 10 | e1001175

Miho M. Suzuki and Adrian Bird (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. Nature reviews | **genetics** volume 9: 465-476

Snustad D. P., M. J. Simmons (2010) Principi di Genetica. Elementi genetici trasponibili, ed. Edises 535-557

Rebecca A. Mosher and Charles W. Melnyk (2010) siRNAs and DNA methylation: seedy epigenetics. Trends in Plant Science Vol.15 No.4

<http://en.wikipedia.org/>

<http://epigenome.eu/it/>