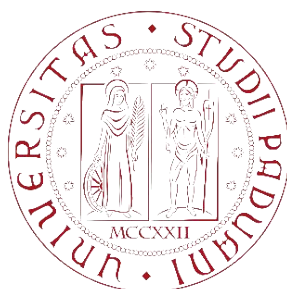


Università degli studi di Padova

Dipartimento di Scienze Chimiche

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie per l'Ambiente



TESI DI LAUREA

Identificazione di geni coinvolti nello sviluppo precoce dell'ovulo di *Ginkgo biloba*

Relatore: **Prof.ssa Barbara Baldan**

Dipartimento di Biologia

Centro di Ateneo "Orto Botanico"

Correlatore: **Dott.ssa Greta D'Apice**

Dipartimento di Biologia

Centro di Ateneo "Orto Botanico"

Laureanda: **Anna Vaiana**

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Storia ed ecologia di <i>Ginkgo biloba</i> L.....	1
1.2 Sviluppo dell'ovulo nelle piante a seme.....	4
1.3 Sviluppo dell'ovulo in <i>Ginkgo biloba</i>	7
2. SCOPO DEL LAVORO.....	9
3. MATERIALI E METODI	11
3.1 Campionamenti e osservazione	11
3.2 Fissazione dei campioni, inclusione in paraffina e sezionamento	11
3.3 Geni oggetto di studio	12
3.4 Disegno dei primers	12
3.5 Retrotrascrizione dell'RNA.....	13
3.6 PCR	14
3.7 Sintesi delle sonde	15
3.8 Trascrizione <i>in vitro</i>	15
3.9 Controllo marcatura delle sonde.....	17
3.10 Ibridazione <i>in situ</i>	18
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	21
4.1 Analisi morfologica	21
4.2 Identificazione dei geni da studiare mediante esperimenti di ibridazione <i>in situ</i> ..	23
4.2.1 Dominio di espressione del gene Gb_06228	24
4.2.2 Dominio di espressione del gene Gb_10868	25
4.2.3 Dominio di espressione dei geni Gb_30325 e Gb_38581	26
5. CONCLUSIONI	27
6. BIBLIOGRAFIA	28

1. INTRODUZIONE

1.1 Storia ed ecologia di *Ginkgo biloba* L.

Ginkgo biloba L. è l'unica specie esistente della divisione Ginkgophyta, appartenente al gruppo delle gimnosperme. È una pianta singolare che possiede una serie di caratteristiche affascinanti tra cui un genoma molto grande (Guan et al., 2016), una resistenza eccezionale a stress biotici e abiotici e diverse proprietà medicinali (Ventura, 1987). Gli individui appartenenti alla specie *Ginkgo biloba* sono piante dall'aspetto maestoso, infatti vengono spesso utilizzati come alberi ornamentali nei giardini e lungo le strade delle città. Il nome del genere "*Ginkgo*" deriva probabilmente da un'erronea trascrizione degli stessi ideogrammi del botanico tedesco Engelbert Kaempfer del nome "yin xing", che in cinese vuol dire "albicocca d'argento", chiaro rimando all'aspetto dei semi maturi che assomigliano appunto ad albicocche infarinate (Hori et al., 2012). Il nome della specie "*biloba*" è stato scelto da Linneo nel 1771 con riferimento alla forma bilobata della foglia (Ventura, 1987).

Dai ritrovamenti fossili di foglie appartenenti a piante morfologicamente molto simili a *Ginkgo biloba* è stato stabilito che l'origine della divisione Ginkgophyta risale a circa 250 milioni di anni fa, nel periodo Permiano dell'era Paleozoica (Gong et al., 2008; **Fig.1**). Nel periodo del Giurassico superiore, circa 150 milioni di anni fa, le specie di *Ginkgo* ebbero il loro periodo di massima espansione, colonizzando sia l'emisfero boreale che quello australe. Sembra che siano state le successive glaciazioni a segnarne il declino nel Cenozoico, confinando la naturale distribuzione del *Ginkgo* in alcune aree della Cina (Rothwell & Holt, 1997; Hori et al., 2012). Attualmente in Cina ci sono ancora molti esemplari di *Ginkgo* antichissimi, e protetti a livello governativo. L'esemplare più antico si trova nel tempio di Dinlinzi nella provincia di Shandong e ha un'età di oltre 3000 anni. Tuttavia è ancora oggetto di dibattito se gli esemplari di *Ginkgo* esistenti siano sopravvissuti allo stato selvatico in natura o solo come alberi coltivati in giardini e templi (Shan-An et al., 1997). Individui di *Ginkgo* in Europa sono stati introdotti nella prima metà del Settecento e molto rapidamente si sono diffusi come alberi ornamentali per la loro bellezza e la loro grande adattabilità alle condizioni ambientali delle zone temperate (Zhao et al., 2010).



Figura 1: Foglia fossile di *Ginkgo*
(<https://www.imago-images.com/st/0091751696>)

In condizioni favorevoli, con spazio e luce a sufficienza e nessuna operazione di potatura, un esemplare di *Ginkgo* può raggiungere altezze anche superiori ai 30 metri. Ha un portamento monopodiale: dal fusto principale ben dritto si dipartono i rami laterali, di maggiore lunghezza e spessore, che si allungano perpendicolarmente al fusto. Sui macroblasti, i rami principali, crescono numerosi brachiblasti, che portano le foglie e gli organi riproduttori (Ventura, 1987; **Fig.2**). Le foglie sono indubbiamente il carattere che dà alla pianta la sua singolarità. Ha foglie decidue, di lunghezza di circa 5–8 cm, dalla forma tipica a ventaglio, appunto “bilobata”, e percorse da un elevato numero di nervature dicotomiche (Ventura, 1987; Pasqua et al., 2008). La morfologia fogliare varia a seconda dell’età e della posizione nella chioma: infatti le incisioni della lamina, che separano i lobi, vengono gradualmente perse con l’invecchiamento dell’albero. In autunno le foglie assumono una colorazione giallo vivo molto suggestiva che rende *Ginkgo* immediatamente riconoscibile fra tutti gli alberi (Pancaldi et al., 2019; **Fig.2,3,4**).



Figura 2: Brachiblasto portante mazzetti di foglie
(<https://viviendosan.com/wp-content/uploads/2013/05/ginkgo-biloba-ramas.jpg>)

Ginkgo biloba è una pianta dioica. Gli organi riproduttori maschili sono costituiti da uno stelo centrale da cui si dipartono diversi corti peduncoli. Ciascuno di essi regge due sacche

pendule contenenti milioni di granuli di polline (Niklas, 1987). Gli organi riproduttori femminili consistono in un peduncolo con un colletto che porta alle estremità una coppia di ovuli. L'impollinazione è prevalentemente anemofila, mentre la dispersione dei semi avviene per endozoocoria (Norstog et al., 2004).



Figura 3: Illustrazione botanica di organi riproduttivi maschili e femminili, semi e foglie (<https://stock.adobe.com/images/botanical-illustration-of-the-cosmetic-and-medicinal-plant-of-ginkgo-biloba-presented-are-fruits-seeds-male-and-female-plants-of-ginkgo-watercolor-drawing-classic-retro/212139736>)

La latitudine di coltivazione del *Ginkgo biloba* incide sulle tempistiche di tutte le fasi del suo ciclo riproduttivo, dall'impollinazione alla germinazione. I semi prodotti dagli alberi che crescono in climi temperato-caldi germinano all'inizio dell'anno, prima rispetto ai semi prodotti in climi freddo-temperati (Del Tredici, 2007). Gli embrioni di *Ginkgo* possiedono un meccanismo di ritardo dello sviluppo dipendente dalla temperatura che consente ai semi di sopravvivere in inverno, prevenendo la germinazione prematura in autunno (Del Tredici, 2007). È una specie altamente adattabile che cresce bene nella maggior parte delle regioni con una stagionalità distinta e precipitazioni moderate, comprese le aree con clima temperato o mediterraneo (He et al., 1997). In Cina si coltiva in aree che presentano un'elevata umidità, e gradienti topografici compresi tra 25 ° e 42°N di latitudine, dove le temperature minime invernali possono raggiungere -32°C e massime temperature estive 42°C (He et al., 1997).

Ginkgo biloba era una delle specie più rare e in pericolo di estinzione nel mondo, ma ora le sue popolazioni sono ormai diffuse a livello globale, grazie al suo utilizzo come un albero ornamentale (Kuniyal, 2013). Grazie alla sua elevata tolleranza alle condizioni di stress urbano e alla sua straordinaria bellezza *Ginkgo* è presto diventato uno degli alberi più popolari per decorare parchi e strade in tutti i paesi del mondo (**Fig.4**). Il ruolo degli alberi urbani è di estrema importanza poiché essi modellano il clima locale, influenzando il livello di esposizione alla luce solare, la temperatura, l'umidità, livello di inquinamento e tasso di ricambio dell'aria (Dmuchowski et al., 2019). Per quanto riguarda *Ginkgo*, per il giardinaggio urbano vengono preferiti gli alberi maschili a causa dell'odore sgradevole emesso dai semi degli alberi femminili (Flint, 1985). *Ginkgo biloba* possiede un alto grado di resistenza ai danni degli insetti e alle malattie fungine, virali e batteriche, nonché all'inquinamento da ozono e biossido di zolfo. Gli unici svantaggi sono la sensibilità alle piogge acide e alla siccità estiva. Studi recenti hanno dimostrato che gli individui di sesso femminile sono meno sensibili alle condizioni di stress salino rispetto agli individui di sesso maschile (Dmuchowski et al., 2019).



Figura 4: Viale di *Ginkgo biloba* L. in autunno
(<https://www.greenme.it/ambiente/natura/showa-memorial-park-foliage-ginkgo-biloba/>)

1.2 Sviluppo dell'ovulo nelle piante a seme

Le spermatofite sono piante vascolari dotate di ovulo, struttura di estrema importanza e innovazione in termini evolutivi, dal quale si sviluppa il seme (Rudall, 2021). Rappresentano il gruppo più cospicuo di piante vascolari attualmente viventi e sono riconducibili a cinque gruppi principali: cicadee, conifere, *Ginkgo*, gnetofite e

angiosperme. I primi quattro gruppi vengono comunemente chiamati gimnosperme (dal greco *gymnos* che significa “nudo”) poiché presentano ovuli non racchiusi in un ovario e di conseguenza semi esposti all’aria, siccome non producono fiori (Pasqua et al., 2008). Al contrario le angiosperme hanno ovuli racchiusi all’interno di foglie modificate (carpelli) che costituiscono l’ovario, che successivamente alla fecondazione si trasformerà nel frutto (Pasqua et al., 2008). L’ovulo è la sede di alcuni processi chiave per la riproduzione sessuale delle piante, quali la formazione del gametofito femminile, la fecondazione e l’embrionogenesi. A maturità, quindi dopo la fecondazione, gli ovuli si trasformano in semi, che contengono gli embrioni, spesso dormienti (Pancaldi et al., 2019). Una volta rilasciati dalla pianta madre i semi sono in grado di sopravvivere per tempi molto lunghi, e spesso anche in condizioni ambientali avverse, prima di germinare e dare origine ad un nuovo individuo adulto (Altamura et al., 2007). La riproduzione sessuale e lo sviluppo dell’ovulo non si svolgono allo stesso modo in gimnosperme e angiosperme. Le gimnosperme hanno un ciclo biologico lento, in cui l’impollinazione e la fecondazione sono due eventi temporalmente distinti (Pasqua et al., 2008). L’impollinazione prevede il trasporto dei granuli di polline dalle sacche polliniche agli ovuli. Gli sporangi dei due sessi sono portati in strutture separate: i microsporofilli che portano le sacche polliniche sono riuniti in strobili semplici; gli ovuli (macrosporangi) sono portati da squame raccolte in strobili complessi (Pinales), su corti peduncoli (*Ginkgo*, Taxaceae), oppure alle estremità di macrosporofilli fogliosi (Cicadee) (Pasqua et al., 2008). Dentro l’ovulo per meiosi si formano quattro macrospore. Solo una di esse rimane vitale e origina un macrogametofito, che in seguito a molteplici divisioni nucleari e successiva cellularizzazione avrà funzione di riserva per il futuro embrione, costituendo l’endosperma primario (Pasqua et al., 2008). All’interno dell’endosperma primario si formano gli archegoni, i quali contengono la cellula uovo che sarà fecondata dalla cellula spermatica al momento della fecondazione (Pancaldi et al., 2019). Generalmente nelle gimnosperme, quando l’ovulo è recettivo emette dal micropilo una goccia pollinica, un liquido zuccherino che trattiene e trascina i granuli pollinici all’interno della camera pollinica, collocata nella nucella (Pasqua et al., 2008). Qui il tubetto pollinico germina e quando i gameti maschili sono maturi raggiungono l’oosfera e la fecondano. Lo zigote si trasforma in embrione, racchiuso e protetto dai tegumenti dell’ovulo, costituendo il seme (Pancaldi et al., 2019). Tra impollinazione e fecondazione può passare anche un anno e

mezzo e la maturazione del seme può richiedere tre anni come avviene ad esempio per il genere *Pinus* (Pasqua et al., 2008). Diversamente dalle gimnosperme, le angiosperme presentano il fiore, una struttura evoluta appositamente per la riproduzione. Il fiore è costituito da sepali, petali, stami, carpelli e ha la funzione di favorire l'impollinazione e proteggere l'apparato riproduttore femminile. Gli ovuli sono racchiusi all'interno dell'ovario, formato dai carpelli riuniti in uno o più pistilli, da cui si sviluppa il frutto (Pasqua et al., 2008). Durante lo sviluppo del primordio dell'ovulo si differenziano tre regioni lungo l'asse prossimo-distale che andranno incontro a tre processi di sviluppo differenti, ma interconnessi: la regione nucellare, la regione calazale e la regione del funicolo, che connette l'ovulo alla placenta. La placenta costituisce il rivestimento interno dell'ovario e ha la funzione di nutrire l'ovulo fino alla sua completa maturazione. Il funicolo si espande alla base della nucella per formare la calaza (Pancaldi et al., 2019). Delle cellule della nucella, una sola, definita cellula madre delle macrospore, produce quattro meiospore per meiosi (megasporogenesi). Di queste macrospore, tre abortiscono e una va incontro a tre mitosi successive originando otto nuclei. Sei di questi nuclei cellularizzano: tre cellule dette antipodali si dispongono in prossimità della calaza, due cellule dette sinergidi si dispongono in prossimità del micropilo, ciascuna a fianco della sesta cellula che costituisce la oosfera (gamete femminile, cellula uovo). I due nuclei rimanenti sono detti nuclei polari si trovano al centro e successivamente si fondono per dare una cellula diploide (Altamura et al., 2007). L'insieme di queste cellule, derivate da un'unica cellula madre e costituisce il gametofito femminile, chiamato anche sacco embrionale. Durante la megasporogenesi dal lato calazale inizia la formazione dei due tegumenti interno ed esterno, che avvolgeranno il sacco embrionale lasciando una piccola apertura, il micropilo. Dal micropilo entra il tubetto pollinico che rilascia le due cellule spermatiche nel sacco embrionale. A questo punto si ha la doppia fecondazione: un nucleo spermatico andrà a unirsi con la cellula diploide formando un tessuto di riserva triploide chiamato endosperma secondario, l'altro nucleo spermatico andrà a fecondare l'oosfera originando lo zigote (Altamura et al., 2007; Pancaldi et al., 2019). L'ovulo e il suo successore ontogenetico, il seme, rappresentano senza dubbio l'innovazione più significativa delle piante da seme perché rappresentano una struttura evolutivamente dinamica e un mezzo efficiente di riproduzione e di dispersione in una varietà di habitat. (Rudall, 2021).

1.3 Sviluppo dell'ovulo in *Ginkgo biloba*

Ginkgo biloba L. è una specie dioica, che non presenta caratteristiche morfologiche che permettano di distinguere i due sessi fino alla comparsa degli organi riproduttori, ovvero quando l'albero ha circa 20 anni (Del Tredici, 2007). Gli organi riproduttori femminili compaiono tra i mazzetti di foglie sui brachiblasti e sono costituiti da un peduncolo all'estremità del quale si trova una coppia di ovuli (Ventura, 1987). L'ovulo è costituito da un tessuto chiamato nucella, circondato da un tessuto protettivo, o tegumento (Hori et al., 1997). Una descrizione morfologica dettagliata degli stadi di sviluppo dell'ovulo di *Ginkgo* è fornita nell'articolo di D'Apice et al. (2021). Allo stadio 1 i primordi degli ovuli non sono ancora differenziati. Il peduncolo dell'ovulo, che porta al suo apice una coppia di ovuli, emerge direttamente dall'ascella fogliare. Gli ovuli diventano riconoscibili quando inizia l'allungamento distale delle due estremità opposte, allo stadio 2 (**Fig. 5a**). Gli ovuli continuano a crescere fino a quando il solco dorsale tra i due tegumenti in crescita diventa visibile e separa nettamente i due primordi (**Fig. 5b**). I margini del tegumento in formazione circondano la nucella in via di sviluppo (stadio 3, **Fig. 5b**). Allo stadio 4, il tegumento in crescita si ispessisce nelle regioni fiancheggianti la nucella, (**Fig. 5c**). Allo stadio 5 il tegumento cresce fino a coprire completamente la nucella situata al centro dell'ovulo, il solco che separa i due ovuli è visibile e il collare dell'ovulo inizia a differenziarsi alla base del tegumento (**Fig. 5d**). Il tegumento maturo avvolge completamente la nucella formando anche il micropilo e il canale micropilare e nella nucella si forma la camera pollinica (**Fig. 5f**). All'inizio della primavera, alla latitudine di Padova, le gemme di *Ginkgo* si aprono, esponendo le giovani foglie e le strutture riproduttive femminili (stadio 6), le quali, dopo poche settimane, sono pronte per essere impollinate ed emettono la goccia pollinica (**Fig. 5g**). Dopo l'impollinazione il tegumento inizia a differenziarsi in tre strati (**Fig. 5h**): endotesta, sclerotesta e sarcotesta. L'endotesta è lo strato più interno che circonda il gametofito femminile. Inizialmente è morbido e traslucido, dopo il differenziamento diventa di una consistenza simile a carta. Lo sclerotesta maturo lignifica prima che avvenga la fecondazione e fornisce ulteriore protezione al futuro seme (**Fig. 5j**). Il sarcotesta è lo strato più esterno e diventa carnoso una volta maturo (**Fig. 5j**). Esso è analogo al pericarpo del frutto delle angiosperme poiché svolge un ruolo chiave nel favorire la dispersione zoocora dei semi (D'Apice et al., 2021). Allo stadio 12, l'archegonio è completamente formato (**Fig. 5k**) e, poco prima

dell'evento di fecondazione (circa 140 giorni dopo l'impollinazione), la cellula centrale si divide per formare la cellula uovo e una cellula del canale centrale (Wang et al., 2014). In seguito alla fecondazione, si forma l'embrione che aumenta rapidamente di dimensioni (**Fig. 5l**). La presenza di acidi organici come l'acido butirrico nel tegumento esterno è la causa del caratteristico odore rancido che si presenta una volta che i semi sono caduti dall'albero, circa un mese dall'avvenuta la fecondazione (Singh et al., 2008).

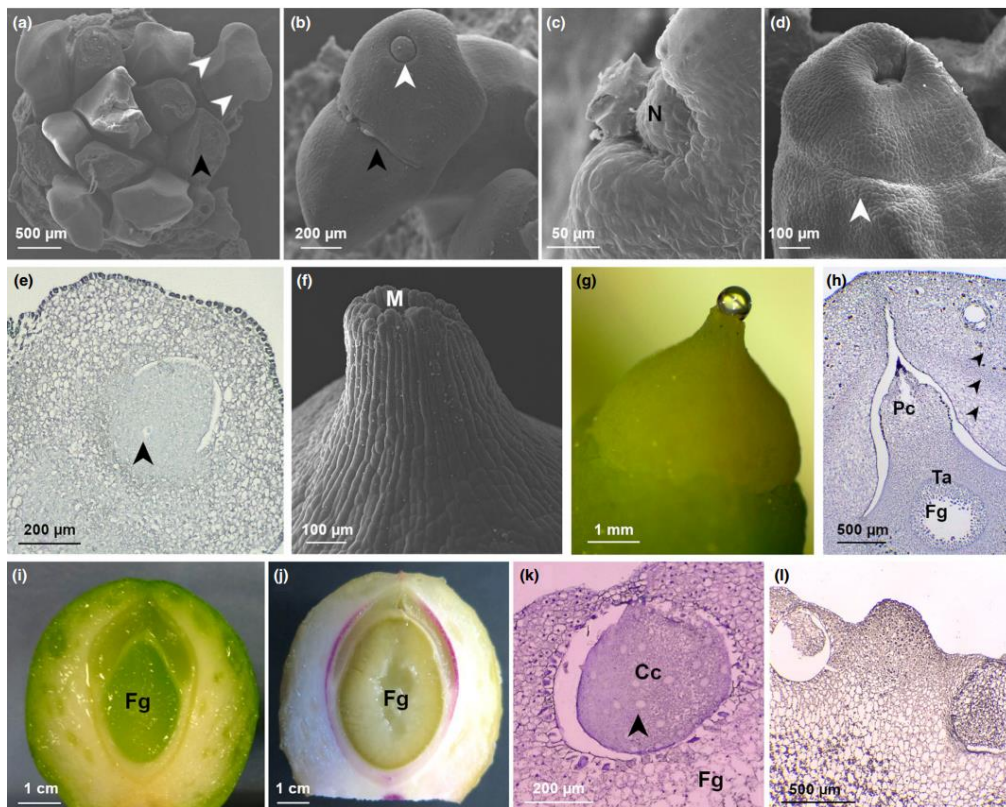


Figura 5: immagine da D'Apice et al. (2021), *New Phytol.* 232: 2353. 12 stadi di sviluppo (dallo stadio 2 allo stadio 13) dell'ovulo di *Ginkgo biloba* (D'Apice et al., 2021). (a) primordi ovulari. Le frecce nere indicano i primordi delle foglie, le frecce bianche indicano i primordi dell'ovulo. (b) Differenziamento della nucella e del tegumento. La freccia nera indica il solco che divide i due ovuli, la freccia bianca indica la nucella in formazione. (c) tegumento che circonda la nucella. (d) nucella quasi completamente avvolta dal tegumento, differenziazione del collare indicata con una freccia bianca. (e) cellula madre delle megaspore, che originerà il gametofito femminile. (f) formazione completa del micropilo e del canale micropilare. (g) emissione della goccia pollinica. (h) differenziazione del tegumento, le frecce indicano i tre strati in formazione già osservabili. (i) cellularizzazione dell'endosperma primario o gametofito femminile. (j) lignificazione dello sclerotesta. (k) formazione completa dell'archegonio. (l) Embrione formato. Fg, gametofito femminile; L primordio fogliare; N nucella; Ov primordio dell'ovulo; Pc camera pollinica.

2. SCOPO DEL LAVORO

Gli studi sullo sviluppo dell'ovulo, del seme, del pistillo e del frutto sono la chiave per la creazione di nuove tecniche di miglioramento genetico su piante di interesse commerciale. La comprensione del controllo genetico e ormonale di questi processi in *Arabidopsis thaliana* è stata straordinariamente importante per sviluppare nuove strategie promettenti nell'agricoltura, in particolare per le piante di interesse commerciale strettamente imparentate ad essa (Barro-Trastoy et al., 2020). I principali geni e ormoni coinvolti nello sviluppo dell'ovulo sono stati ampiamente studiati in *Arabidopsis thaliana*, la pianta modello delle angiosperme, mentre nelle gimnosperme questi meccanismi non sono ancora ben conosciuti. La comprensione di questi processi non è solo importante dal punto di vista economico e agronomico, ma anche per capire la storia evolutiva delle piante a seme.

Ginkgo biloba, una delle più antiche gimnosperme esistenti ed è una specie rimasta morfologicamente invariata per più di 200 milioni di anni (Zhou et al., 2009). Per questi motivi studiare la storia evolutiva del *Ginkgo biloba* e i meccanismi che guidano lo sviluppo dell'ovulo è importante al fine di chiarire le tappe evolutive che hanno portato all'affermarsi di queste importanti strutture nelle piante a seme.

Lo studio condotto in questo elaborato di laurea ha avuto l'obiettivo di individuare e caratterizzare il dominio di espressione di nuovi putativi geni ovulo-specifici coinvolti nello sviluppo precoce dell'ovulo di *Ginkgo biloba* tramite la tecnica dell'ibridazione *in situ*.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamenti e osservazione

I campioni di ovuli di *Ginkgo biloba* utilizzati in questo studio sono stati prelevati da due alberi centenari che si trovano all'interno dell'Orto Botanico di Padova. Si tratta di due individui maschili a cui sono stati innestati rami femminili. Sono stati campionati ovuli allo stadio 4 in accordo con la descrizione morfologica dello sviluppo dell'ovulo descritta da D'Apice et al. (2021). Allo stadio 4, i primordi degli ovuli sono contenuti nelle gemme insieme ai primordi delle foglie e il tegumento dell'ovulo sta già crescendo per circondare la già riconoscibile nucella. Prima del mio arrivo in laboratorio sono stati condotti l'estrazione e il sequenziamento dell'RNA da primordi di ovuli e primordi di foglie separatamente. I campioni prelevati per le ibridazioni *in situ* sono stati processati come segue.

3.2 Fissazione dei campioni, inclusione in paraffina e sezionamento

I campioni appena raccolti vengono fissati in una soluzione di 1X PBS (Phosphate Buffer Saline, 10X pH 7.0: 1.3 M NaCl; 70 nM Na₂HPO₄·2H₂O, 30 nM Na₂HPO₄·2H₂O) contenente paraformaldeide al 4%. Per facilitare la penetrazione del fissativo nei tessuti, i campioni vengono sottoposti a uno o più cicli di vuoto di 20 min. La soluzione di fissativo viene poi sostituita con una fresca e i campioni vengono lasciati a 4°C per una notte. Il giorno dopo i campioni vengono lavati due volte con 1X PBS (30 minuti per ciascun lavaggio) e disidratati mediante dei lavaggi di un'ora ciascuno in etanolo a concentrazione crescente (30%, 50%, 70%, 85%), seguiti da un lavaggio di etanolo 95% overnight e due lavaggi di 30 minuti in etanolo 100%. Dopo l'ultimo passaggio di disidratazione, l'etanolo 100% viene gradualmente sostituito con xilene a concentrazione crescente (25%, 50%, 75%, 100%; un'ora per ciascun passaggio). Lo xilene viene poi sostituito gradualmente i campioni vengono inclusi all'interno di stampi in acciaio, orientati verso la superficie di taglio, lasciati solidificare a temperatura ambiente e conservati a 4°C finché non verranno processati. I campioni sono stati tagliati con il microtomo Leica RM 2125 RTS e le sezioni di spessore di 8-10 µm sono state posizionate su dei vetrini portaoggetti con polilisina.

3.3 Geni oggetto di studio

Grazie al sequenziamento dell'RNA di ovuli e foglie allo stadio 4 di sviluppo è stato possibile identificare i 50 geni più altamente espressi nell'ovulo di *Ginkgo biloba*. Questi dati erano già presenti in laboratorio prima dell'inizio di questo studio. Tra questi 50 geni ovulo-specifici sono stati studiati in modo approfondito in questo studio le seguenti Sequenze Codificanti (CDS; dal genoma pubblicato da Guan et al., 2016): Gb_10868, Gb_30325, Gb_06228 e Gb_38581.

3.4 Disegno dei primers

La tecnica dell'ibridazione *in situ* si basa sull'associazione molecolare fra due sequenze poliribonucleotidiche complementari. Una sonda marcata di RNA complementa un frammento di mRNA endogeno del gene di interesse. Le sequenze dei geni di interesse per la sintesi delle sonde sono state analizzate con il software NCBI Conserved Domain (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) al fine di identificare la posizione di eventuali domini conservati ed escluderli. Per sintetizzare una sonda quanto più specifica infatti è necessario creare dei primers che non amplifichino porzioni del gene altamente conservate (domini conservati) per evitare che avvenga l'ibridazione della sonda con sequenze di mRNA aspecifiche. Mediante il software Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) sono state disegnate due coppie di primers per ogni gene per l'amplificazione univoca delle porzioni di interesse (**Tabella 1**). Per accertarsi che i primers amplifichino univocamente i geni di interesse sono state effettuate PCR (Reazione a Catena della Polimerasi) di controllo, utilizzando come DNA stampo il cDNA retrotrascritto da RNA precedentemente estratto da ovuli di *Ginkgo*.

Tabella 1: Elenco dei primer forward e reverse disegnati per amplificare i geni target con rispettive lunghezze e temperature di melting

nome del primer	sequenza 5' -> 3'	Lunghezza bp	Tm (°C)
Gb_10868 for1	TGAGATTTGAGCCTCTCGGC	460	59,8
Gb_10868 rev1	AAATCGGTGCTGGGCATGTA	460	60
Gb_10868 for2	TTTGAGCCTCTCGGCTTTCAC	590	60,8
Gb_10868 rev2	TCTCCGGTGGCCTTCTCTAA	590	59,9
Gb_30325 for1	ATGTCTGGCGTCTGGGTTTT	326	59,8

Gb_30325 rev1	TCGAAGGCACTGCGATTCTT	326	60
Gb_30325 for2	GTTGGTATCCAACCCAATGGC	300	59,5
Gb_30325 rev2	AGATCTCTAACTTCGAAGGCACT	300	58,9
Gb_06228 for1	TCGAGTCGTATGGAGAGGCT	380	59,8
Gb_06228 rev1	CCAATCTGCGGAATCATGCG	380	60
Gb_06228 for2	TGGGAAGCCATATGAGTCCG	433	59,2
Gb_06228 rev2	CTGGTGTGGAGTTTCCCGT	433	60,1
Gb_38581 for1	GCTCTCACTCCTCGATGCAA	652	59,8
Gb_38581 rev1	TGACACAGCAAACCAGTTGGA	652	60,3
Gb_38581 for2	GTCTCCATGGGCCATTTTGTG	620	59,7
Gb_38581 rev2	ACCCACATTCCATTGACACAG	620	58,4

3.5 Retrotrascrizione dell'RNA

Prima di procedere con le PCR è stata eseguita la retrotrascrizione dell'RNA. 1000 ng di RNA purificato vengono retro-trascritti in cDNA utilizzando la retrotrascrittasi SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher), seguendo le istruzioni del protocollo. Per assicurarsi di trascrivere soltanto l'RNA messaggero (mRNA) si utilizza un primer oligo-dT specifico, che si lega alla coda poli(A) propria dell'mRNA. Si preparano due mix (per un volume finale di 20 µl):

MIX 1:

- 1 µl oligo-dT
- 1 µl dNTP mix
- X µl RNA (corrispondente a 1000 ng)
- Nuclease-free H₂O fino a 13 µl

Incubare a 65°C per 5 minuti e trasferire in ghiaccio per almeno 1 minuto.

MIX 2:

- 4 µl First-Strand Buffer
- 1 µl DTT
- 1 µl RNaseOUT™
- 1 µl SuperScript III RT

Incubare a 50°C per 1 ora e infine a 75°C per 5 minuti per inattivare l'enzima.

3.6 PCR

Una volta ottenuto il cDNA si può procedere con la PCR. I componenti per la reazione di PCR per volume finale di 25 μL sono i seguenti:

- 5 μL 5x Wonder Taq reaction Buffer (EuroClone)
- 0,2 μL Enzima Polimerasi Wonder Taq (EuroClone)
- 1 μL cDNA (50 ng/ μL)
- 1 μL primer forward 20 μM
- 1 μL primer reverse 20 μM
- 16,8 μL acqua deionizzata

Il termociclatore (Q-Cycler 96, Hain Lifesciences) è stato così impostato: Denaturazione a 95°C per 1 minuto (1 ciclo); Denaturazione a 95°C per 15 secondi, Annealing a 55°C per 15 secondi, amplificazione a 72°C per 30 secondi (35/40 cicli). Sono state provate varie temperature di annealing prima di fissarsi a 55°C, tutte in un intervallo di $\pm 2^\circ\text{C}$ da tale valore.

Per controllare che l'amplificazione sia andata a buon fine un quinto del prodotto di PCR è stato sottoposto a corsa elettroforetica su gel di agarosio al 1,2% in tampone TAE 1X con l'aggiunta di un intercalante fluorescente (**Fig. 6**). I prodotti purificati della PCR sono poi stati mandati a una ditta esterna per essere sequenziati.



Figura 6: Elettroforesi su gel PCR

3.7 Sintesi delle sonde

Per sintetizzare le sonde, dopo essersi accertati che le sequenze sono corrette, vengono eseguite altre due PCR. La prima viene eseguita come la precedente in 25 μL , ma in doppio in modo da avere più materiale da purificare.

Nella seconda PCR (in doppio e in 50 μL totali) viene utilizzato il DNA amplificato e purificato della prima PCR come template (2 μL) e si usa il primer reverse contenente il sito di legame per la T7 polimerasi invece del primer reverse normale. I componenti per la reazione di PCR2 con volume finale di 50 μL sono i seguenti:

- 10 μL 5x Wonder Taq reaction Buffer (EuroClone)
- 0,4 μL Enzima Polimerasi Wonder Taq (EuroClone)
- 2 μL DNA (PCR1 purificata)
- 2 μL primer forward 20 μM
- 2 μL T7-reverse primer 20 μM
- 33,6 μL acqua deionizzata

Includere la sequenza per il legame con la T7 RNA polimerasi all'interno dell'amplificazione è infatti un passaggio necessario per la successiva trascrizione *in vitro*. Un amplificato con il segmento T7 inserito all'estremità 5' del primer reverse (quindi inserito nella sequenza amplificata) produrrà, quando trascritto, un segmento di RNA complementare alla sequenza bersaglio, chiamato sonda antisenso.

Dopo aver controllato mediante la corsa elettroforetica su gel di agarosio che la seconda reazione di amplificazione sia avvenuta, 90 μL di prodotto della PCR2 vengono purificati e concentrati con il PureLink PCR Purification Kit (Qiagen), quindi eluiti in 20 μL di acqua DEPC.

3.8 Trascrizione *in vitro*

I componenti per la reazione per la trascrizione *in vitro* (marcatura delle sonde) sono i seguenti:

- 10 μL di prodotto di PCR2 purificata
- 2 μL acqua DEPC
- 2 μL 10x transcription buffer (T7 buffer)

- 2 μ L 10x mix ribonucleotidi marcati con digossigenina (mix NTP e dig-11-Utp) (Roche)
- 2 μ L Invitrogen RNaseOUT™ (Thermo-Fischer)
- 2 μ L T7 RNA Polimerasi (ThermoFischer)

La reazione è stata lasciata incubare a 37°C per 90 minuti.

Il passaggio successivo è stata la rimozione del DNA mediante trattamento con DNAsi. Prima sono stati aggiunti 1 μ L di DNAsi I (NEB) e 2 μ L di Invitrogen RNaseOUT (ThermoFischer) per ogni reazione e lasciati in incubazione per 15 minuti a 37°C. Poi sono stati aggiunti 2 μ L di EDTA 0,2M per bloccare la reazione della DNase I ed è stato prelevato 1 μ L da conservare a 4°C per la successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio (**Fig. 7**).

Per la precipitazione della sonda ad ogni reazione sono stati aggiunti 1 μ L di yeast T-RNA, 2,5 μ L di acetato di sodio 3M e 62,5 μ L di EtOH 100% e sono stati riposti a -20°C per due ore. Successivamente le Eppendorf contenenti le sonde sono state messe in centrifuga per 15 minuti a 13000 rpm, il surnatante è stato rimosso e il pellet è stato lavato con EtOH 70%. Dopo una seconda centrifuga come la precedente, l'etanolo è stato rimosso e i pellet sono stati lasciati ad asciugare. I pellet sono poi stati risospesi in 100 μ L di Hybridation Buffer (6x SSC, 3% SDS, 50% Formammide, 100 μ g/mL yeast t-RNA).

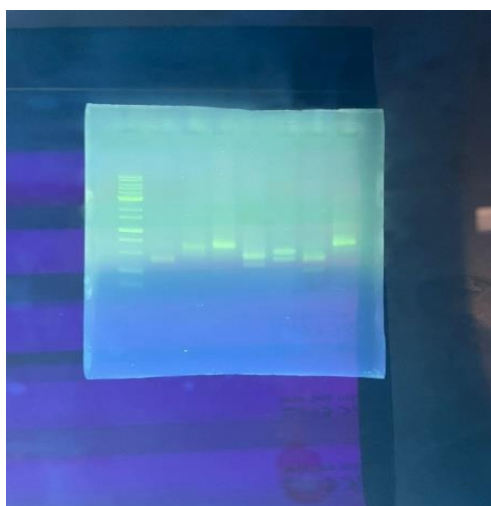


Figura 7: Elettroforesi su gel delle sonde antisenso marcate

3.9 Controllo marcatura delle sonde

Per controllare che le sonde siano state effettivamente marcate per il successivo esperimento di ibridazione *in situ* si sono eseguiti i seguenti passaggi:

- Fare 5 diluizioni seriali delle sonde antisense marcate, includendo un controllo positivo: A(1:10), B(1:100), C(1:1000), D(1:10000), E (1:100000)
- Posizionare 1µL di ciascuna diluizione su carta di nitrocellulosa Hybond™ posizionata in una piastra Petri
- Fissare l'RNA alla membrana tramite cross-link con raggi UV per 10/15 minuti
- Bagnare la membrana con Tris/NaCl Buffer
- Aggiungere 40 mL di Blocking Solution e lasciare incubare per 5 minuti
- Diluire anticorpo Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments (Roche) nella Blocking Solution (2 µL in 10 mL)
- Lasciare incubare nella soluzione con l'anticorpo per 5 minuti al buio
- Lavare 2 volte in Tris/NaCl Buffer per 5 minuti
- Incubare in Genius Buffer (1M Tris pH 9,5, 5M NaCl, 1M MgCl₂, H₂O) per 2 minuti
- Gettare la soluzione e aggiungere i coloranti a 10 mL di Genius Buffer (34 µL di Nitro Blue Tetrazolium Chloride, NBT e+ 35 µL di 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, BCIP)
- Coprire con carta stagnola e lasciare a incubare per 30 minuti
- Lavare più volte con acqua deionizzata e lasciare asciugare overnight

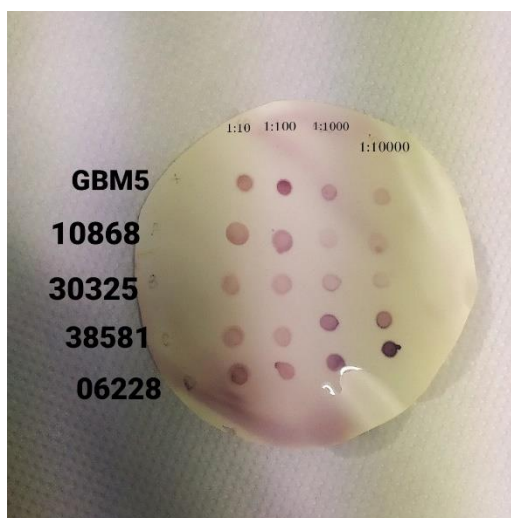


Figura 8: marcatura delle sonde avvenuta correttamente. *GBM5* controllo positivo.

3.10 Ibridazione *in situ*

Per verificare dove sono espressi i quattro geni target all'interno degli ovuli di *Ginkgo* allo stadio 4 di sviluppo, è stato fatto l'esperimento di ibridazione *in situ*. L'esperimento si svolge in tre giorni e in questo studio è stata seguita la procedura descritta da Ambrose et al. (2000). Nei giorni prima dell'inizio dell'esperimento sono stati scelti 19 vetrini con le migliori sezioni dei campioni e preparate le seguenti soluzioni:

- 20X SSC pH 6,8 (3M NaCl, 300 mM Na citrate)
- Tris (Tris-HCl) 1M pH 8
- EDTA 0,5M pH 8
- 10X PBS pH 7,4 (1,3M NaCl, 70 mM Na₂HPO₄, 30mM NaH₂PO₄)
- 10X TBS pH 7.5 (1M tris, 4M NaCl)
- Detection Buffer (1M Tris, 1M NaCl) pH 9,5
- MgCl₂ 1M
- Blocking Buffer 0,5% w/v blocking reagent (Roche) in 1X TBS
- EtOH 95%, 90%, 80%, 75%, 60%, 30%
- Hybridation Buffer (6x SSC, 3% SDS, 50% Formammide, 100 µg/mL yeast t-RNA di lievito)

Si preparano anche almeno 6 L di acqua deionizzata DEPC-treated e si autoclava tutto. I vetrini scelti sono stati siglati con attenzione indicando la sonda che verrà messa su ciascuno di essi.

Il primo giorno i vetrini sono stati messi due ore a 37°C per togliere l'umidità e poi posizionati a zig-zag nel porta-vetrini. Tutte le vaschette che saranno utilizzate per contenere le soluzioni dei diversi passaggi sono state siglate con scotch carta e matita e sono state messe in fila sotto cappa. Ogni vaschetta verrà posizionata in ordine di utilizzo e riempita con 200-250 mL di soluzione in modo che tutti i vetrini rimangano completamente immersi. Prima di cominciare si pesano 500 mg di Glicina in un pacchetto di carta stagnola, e si preparano circa 2L di 1X PBS, HCl (10 mL HCl al 37%+ 190 mL H₂O), Formaldeide 3,7% in PBS (25 mL formaldeide + 225 mL 1X PBS), SSC 2X (25 mL SSC 20X + 225 mL H₂O) e TE Buffer per la proteinasi K (160 mL acqua DEPC + 20 mL 1M Tris + 20 mL 0,5 M EDTA) da posizionare in stufa a 37°C.

- Deparaffinare: Xylene (2x10 min),
- Disidratare: EtOH 100%, EtOH 100%, EtOH 95%, EtOH 90%, EtOH 80%, EtOH 75%, EtOH 60%, EtOH 30%, H₂O, H₂O (2 min ciascuno).
- Acidificare: HCl 3,7% per 20 min.
- Lavare: Acqua DEPC (5 min), 2X SSC (5 min), Acqua DEPC (5 min).
- Trattamento con Proteinasi K: 10 µL di Proteinasi K 20 mg/mL in 250 mL di TE preriscaldato a 37°C (30 min a 37°C).
- Blocking con Glicina: 1X PBS (2 min), 500 mg Glicina sciolta al momento nella vaschetta con PBS (2min), 1X PBS (2x30 sec).
- Fissazione: 3,7% formaldeide in 1X PBS per 10 min.
- Lavaggio: 1X PBS (2x5 min)
- Idratazione: EtOH 30%, EtOH 60%, EtOH 75%, EtOH 80%, EtOH 90 %, EtOH 95%, EtOH 100%, EtOH 100% (2 min per ciascun passaggio), ricordandosi di scambiare le due vaschette di etanolo 100% perché la seconda ha meno xylene residuo della prima.

Ibridazione:

- Preparare la camera umida per l'ibridazione mettendo dello scottex inumidito con 50% formaldeide in acqua DEPC all'interno di scatole portavetrini Kartell
- Appoggiare i vetrini in ordine in base alla sonda di utilizzo
- Per ciascun vetrino la quantità di sonda sarà 2,5 µL di sonda diluita in 125 µL di Hybridation Buffer (prima dell'utilizzo la sonda diluita va denaturata a 80°C per 5 min)
- Distribuire 127,5 µL di sonda a gocce su ogni vetrino e coprire con parafilm
- Chiudere la scatola, avvolgerla nella pellicola trasparente, e posizionarla delicatamente in stufa a 55°C overnight

Secondo giorno:

- Lavaggio: 2X SSC + 50% formammide (125 mL di formammide, 100 mL H₂O DEPC, 25 mL 2X SSC) 2x60 min a 55°C.
- Blocking: 1X TBS per 5 min, Blocking Buffer per 60 min
- Lavaggio: 1%BSA 0,3%Triton-X 1XTBS per 30 min

Incubazione con anticorpo:

- Diluire l'anticorpo Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche) 1:700 in 1%BSA 0,3%Triton-X 1XTBS (6 μ L di anticorpo in 4,2 mL di soluzione 1%BSA 0,3%Triton-X 1XTBS)
- Posizionare i vetrini su dei supporti su scottex bagnato con acqua deionizzata
- Applicare 200 μ L di anticorpo su ogni vetrino e coprire con parafilm
- Incubare a temperatura ambiente per due ore
- Posizionare i vetrini a zig-zag in una vaschetta coplin jar

Lavaggio: 1%BSA 0,3%Triton-X 1XTBS 3x20 min a temperatura ambiente

Detection soluzione (255 mL H₂O DECP, 30 mL 10X Detection buffer, 15 mL 1M MgCl₂) per 5 min

Detection ON: aggiungere in una nuova vaschetta Detection solution + coloranti (100 mL di Detection solution, 300 μ L di NBTC, 150 μ L BCIP e incubare al buio overnight.

Al terzo giorno si controlla che la reazione si sia sviluppata, vedendo le sezioni di colore viola. I vetrini vanno poi disidratati immergendoli velocemente per qualche secondo uno alla volta in falcon contenenti in serie: H₂O DEPC x2, EtOH (30%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100%, 100%), xylene 100%. Dopo averli lasciati asciugare sotto cappa su carta scottex i vetrini vengono chiusi con 2-3 gocce di Entellan (Merk) e un vetrino coprioggetto. Si procede infine al controllo dei risultati al microscopio e alle fotografie.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Analisi morfologica

Lo studio di questo elaborato è stato condotto su ovuli di *Ginkgo biloba* allo stadio 4 di sviluppo descritto in D'Apice et al. (2021). Per interpretare al meglio i risultati ottenuti dagli esperimenti di ibridazione *in situ*, sono state prima condotte delle analisi morfologiche per capire come sono posizionati i primordi di ovuli e foglie all'interno delle gemme chiuse. Il campionamento delle gemme dai due esemplari di *Ginkgo* dell'Orto Botanico è iniziato nella stagione invernale, prima dell'apertura delle gemme che solitamente avviene nella seconda metà del mese di marzo. In **Fig. 9** sono mostrate le immagini osservate allo stereomicroscopio di gemme a cui sono state rimosse le brattee protettive per poter osservare ovuli e foglie. Si può notare come gli abbozzi ovulari e fogliari hanno una disposizione concentrica all'interno delle brattee. I primordi ovulari si sviluppano dall'ascella delle foglie, le quali si presentano ripiegate su sé stesse. In questo stadio il peduncolo dell'ovulo è ingrossato nella parte superiore e inizia già a delinearsi il solco centrale che separerà i due ovuli durante le successive fasi di sviluppo. In **Fig. 10** sono mostrate delle sezioni longitudinali di gemme incluse in paraffina colorate con blu di toluidina. Le sezioni provengono da campioni prelevati nel mese di marzo 2022. I primordi degli ovuli sono riconoscibili grazie alla loro caratteristica forma simile a quella di un osso (**Fig. 10a**). Le foglie sono strettamente impacchettate e ravvolte (**Fig. 10b**) e assumeranno la loro tipica forma a ventaglio solo dopo che le gemme si apriranno. Allo stadio 4 di sviluppo gli ovuli mostrano un tegumento ancora indifferenziato e incompleto poiché non ha ancora completamente circondato la nucella sottostante, rappresentando quindi uno stadio di sviluppo molto precoce che non è stato finora caratterizzato in termini di pattern di espressione genica (D'Apice et al., 2022).

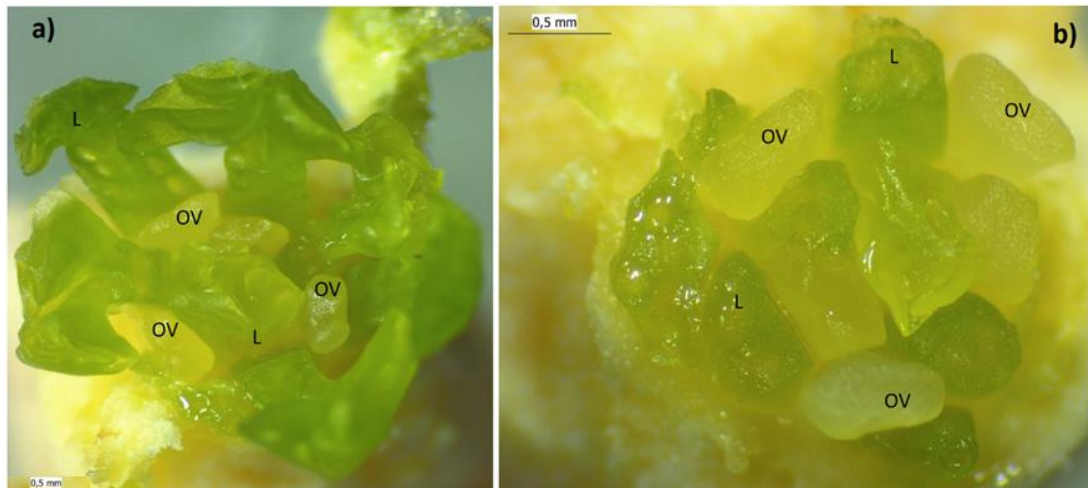


Figura 9: Stadio 4 dello sviluppo dell'ovulo di *Ginkgo biloba* (immagini da Ciarle, 2021, tesi di laurea magistrale). a) gemma osservata allo stereomicroscopio in cui le perule sono state rimosse per mostrare ovuli e primordi delle foglie. b) gemma in cui sono stati rimossi anche i primordi fogliari. L primordio fogliare; Ov primordio dell'ovulo; Scala=0,5mm.

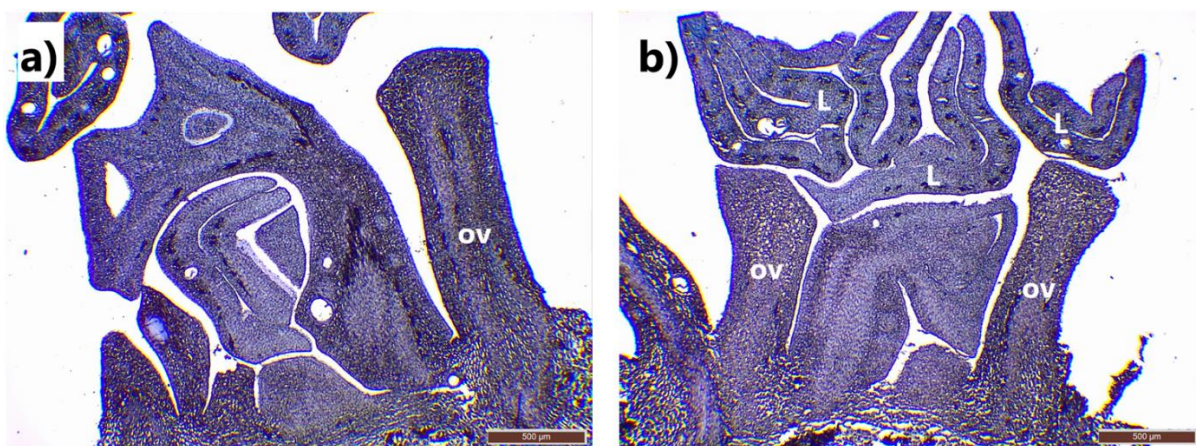


Figura 10: Sezioni longitudinali di gemme di *Ginkgo biloba* con ovuli e foglie incluse in paraffina e colorate con blu di toluidina. Le gemme risalgono a Marzo 2022. a) singolo ovulo con la caratteristica forma ad osso e foglie. b) due ovuli e foglie avvolte su sé stesse. L primordio fogliare; Ov primordio dell'ovulo. Scala=500µm

4.2 Identificazione dei geni da studiare mediante esperimenti di ibridazione *in situ*

I risultati ottenuti dal sequenziamento dell'RNA di ovuli e foglie allo stadio 4 di sviluppo, condotto prima del mio arrivo in laboratorio, hanno evidenziato alcune interessanti CDS di *Ginkgo*. L'annotazione delle CDS (D'Apice et al., 2021) ha permesso di caratterizzare ciascuna di esse di esse sulla base della somiglianza della stessa sequenza con altre sequenze già note e depositate sui maggiori database (UniProtKB/TrEMBL). Inoltre, il sequenziamento dell'mRNA ha permesso di individuare geni espressi solo negli ovuli o solo nelle foglie. Per i 50 geni più espressi negli ovuli è stata fatta una ricerca tramite Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; National Center for Biotechnology Information, NCBI) per meglio caratterizzare le CDS di *Ginkgo* e per poter selezionare quelle di maggior interesse. Tra i 50 geni più altamente espressi nell'ovulo di *Ginkgo* sono stati scelti quattro nuovi putativi geni da studiare tramite esperimenti di ibridazione *in situ*. Con questa tecnica è possibile osservare il dominio di espressione dei geni di interesse. Le CDS scelte, sono descritte in **Tabella 2**. Queste sequenze non sono mai state approfondite prima d'ora in *Ginkgo*. È quindi interessante indagare se questi geni sono effettivamente coinvolti negli stadi di sviluppo precoci dell'ovulo di *Ginkgo* e l'eventuale localizzazione del loro dominio di espressione.

Tabella 2: CDS di *Ginkgo* studiate con esperimenti di ibridazione *in situ*

<i>Ginkgo</i> CDS code (from Guan et al. 2016)	Annotazione tramite BLAST
Gb_06228	<i>Cryptomeria japonica</i> mRNA, clone: CSFL008_G08, expressed in reproductive shoots
Gb_10868	<i>Cryptomeria japonica</i> mRNA, clone: CFFL049_N07, expressed in female strobili
Gb_30325	PREDICTED: <i>Salvia splendens</i> flowering-promoting factor 1-like protein 3 (LOC121801053), mRNA
Gb_38581	<i>Ginkgo biloba</i> S-adenosyl-L-methionine:flavonoid O-methyltransferase (FOMT) mRNA, complete cds

4.2.1 Dominio di espressione del gene Gb_06228

L'espressione del gene Gb_06228 è stata studiata su primordi ovuli all'interno di gemme chiuse campionate il giorno 16 marzo 2022, poco prima della loro apertura. Le analisi indicano che Gb_06228 si esprime principalmente nei tessuti che si stanno dividendo e differenziando alla base delle gemme (**Fig. 11a-c**). Dai risultati ottenuti tramite il software BLAST dell'NCBI, il gene Gb_06228 risulta avere un'alta percentuale di somiglianza con la sequenza codificante per mRNA espresso in germogli riproduttivi della gimnosperma appartenente alla famiglia delle Cupressaceae, *Cryptomeria japonica* (**Tab. 2**). Dai miei risultati in *Ginkgo*, data la posizione del segnale, si può supporre che il gene abbia un ruolo nell'accrescimento alla base dei primordi degli ovuli. Il segnale di ibridazione è localizzato nella stessa regione del gene *AINTEGUMENTALike2* di *Ginkgo* (GbANTL2; D'Apice et al., 2022) (**Fig. 11d**). ANT è un gene pianta-specifico, membro della grande famiglia di fattori di trascrizione APETALA2/ETILENE-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING FACTOR (AP2/ERF; Kim et al., 2006) e il suo dominio di espressione durante lo sviluppo dell'ovulo è stato ampiamente studiato in diverse piante a seme, tra cui *Petunia hybrida*, *Antirrhinum majus*, *Malus domestica*, *Pinus thumbergii*, *Gnetum parvifolium* e *Gnetum gnemon* (Yamada et al., 2008; Dash and Malladi, 2012; Manchado-Rojo et al., 2014; Zumajo-Cardona and Ambrose, 2021). In *Ginkgo* GbANTL2 è espresso nei tessuti che si dividono alla base delle gemme e nei primordi sia delle foglie che dell'ovulo. Nelle fasi successive di sviluppo, dopo l'impollinazione, l'espressione si restringe alla base del tegumento, nella zona di abscissione (D'Apice et al., 2022). Ulteriori studi sono necessari per vedere se anche il dominio di espressione della CDS Gb_06228 è confinato solo in ovuli allo stadio 4 di sviluppo, o se presente anche in stadi successivi e se i due geni possono avere funzioni correlate nella regolazione di processi di sviluppo data la sovrapposizione parziale dei loro domini di espressione.

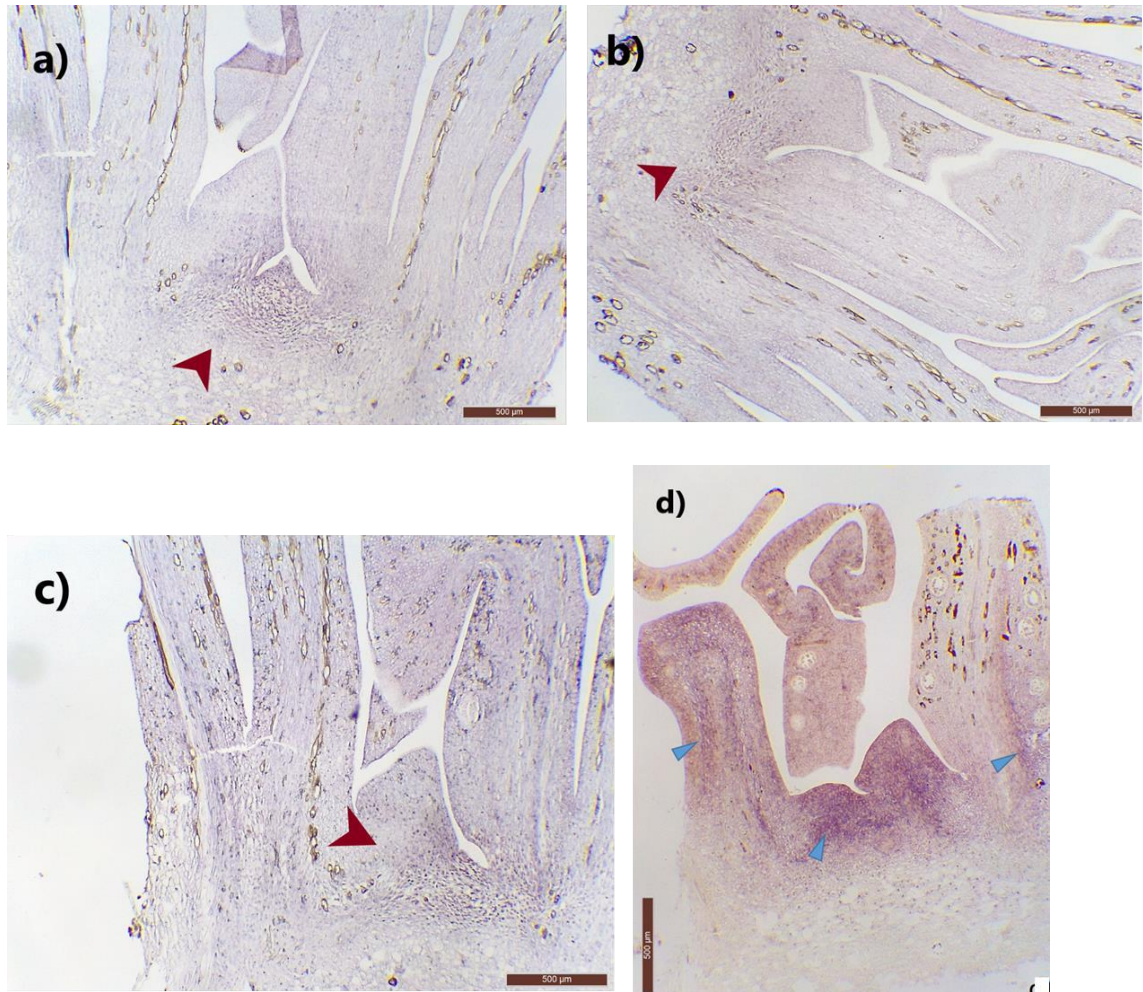


Figura 11: Ibridazione *in situ* in gemme di *Ginkgo biloba* stadio 4 di sviluppo. (a - c) Segnale di ibridazione per la CDS di *Ginkgo* Gb_06228. Le frecce indicano le aree dove è concentrato il segnale. (d) Segnale di ibridazione del gene *GbANTL2* (immagine presa da D'Apice et al., 2022, *Am. J. Bot.*, 887). Scala=500 µm

4.2.2 Dominio di espressione del gene Gb_10868

Le gemme di *Ginkgo biloba* utilizzate per studiarne il dominio di espressione del gene Gb_10868 sono state campionate il giorno 16 marzo 2022. La sequenza codificante di *Ginkgo* è simile alla sequenza codificante per mRNA di *Cryptomeria japonica* espresso in strobili femminili. Le immagini riportate in **Figura 12** mostrano che il segnale di ibridazione è molto debole, ma tuttavia presente. L'espressione è localizzata nei tessuti alla base delle gemme all'origine del primordio ovulare (**Fig. 12**). Si può quindi supporre che l'espressione del gene Gb_10868 sia implicata nei

meccanismi di divisione e differenziamento dei tessuti coinvolti nell'accrescimento del primordio dell'ovulo. Inoltre, questi geni di *Ginkgo* sembrano avere un'elevata similarità con geni di *C. japonica* espressi in strobili femminili o in strutture riproduttive, e quanto da me osservato è consistente con questo dato dal momento che in *Ginkgo* si nota un'espressione in strutture riproduttive femminili, suggerendo una conservazione nella funzione di questi geni.

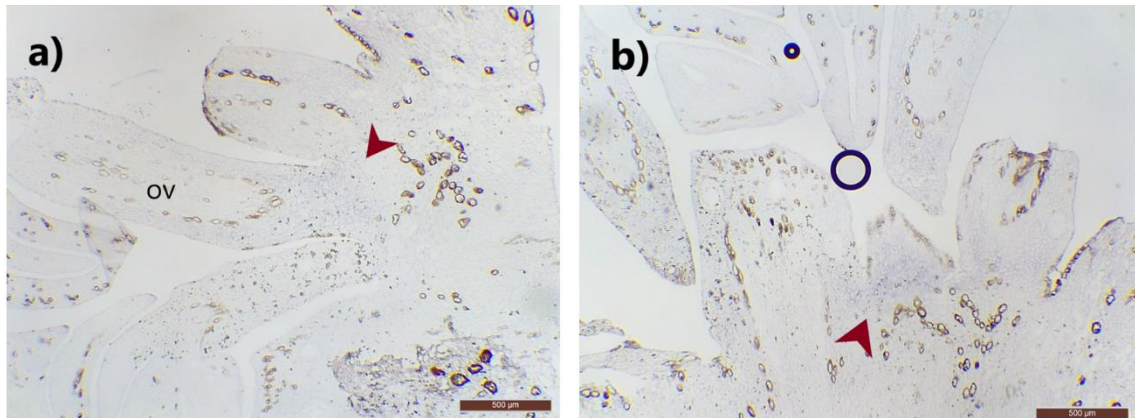


Figura 12: Ibridazione in situ in gemme di *Ginkgo biloba* allo stadio 4 di sviluppo. (a – b) Segnale di ibridazione per la CDS Gb_10868. Le frecce indicano il dominio di espressione. Scala=500 µm

4.2.3 Dominio di espressione dei geni Gb_30325 e Gb_38581

Il dominio di espressione di Gb_30325 è stato studiato in gemme chiuse risalenti al 3 marzo 2022, mentre le gemme utilizzate per lo studio del gene Gb_38581 risalgono al 16 marzo 2022. Dalla **Figura 13** si può notare come non sia presente segnale per i due geni target, rivelando quindi che nessuno dei due geni sembra essere espresso allo stadio 4 di sviluppo dell'ovulo. Una possibile spiegazione dell'assenza di segnale può essere imputata al fatto che queste CDS non siano reali, ma derivino da errori del sequenziamento. Tuttavia non si può escludere un basso livello di espressione costitutiva in queste strutture, che potrebbe non essere rilevabile mediante l'ibridazione *in situ*. Data l'assenza di espressione rilevata, per ora si possono fare poche ipotesi sul ruolo generale di questi geni nello sviluppo dell'ovulo di *Ginkgo biloba*, ma sarebbe interessante studiarne l'espressione nelle fasi successive dello sviluppo.

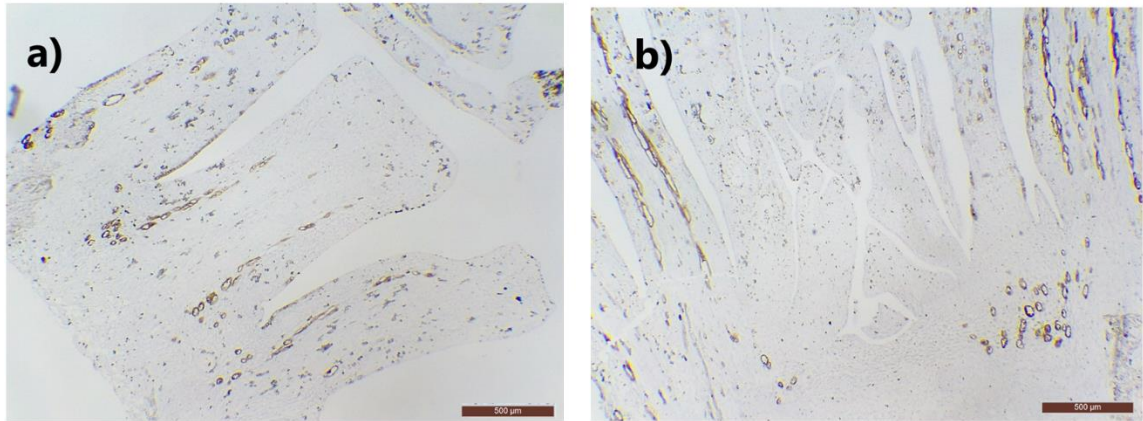


Figura 13: Ibridazione *in situ* in gemme di *Ginkgo biloba* allo stadio 4 di sviluppo. (a) Segnale di ibridazione per la CDS di *Ginkgo* Gb_30325. (b) Segnale di ibridazione per la CDS di *Ginkgo* Gb_38581. Scala=500 μm

5. CONCLUSIONI

Lo scopo principale di questo lavoro di tesi è stato quello di caratterizzare l'espressione di nuovi putativi geni coinvolti nello sviluppo precoce dell'ovulo di *Ginkgo biloba*. Attraverso esperimenti di ibridazione *in situ* è stato possibile caratterizzare i domini di espressione dei geni coinvolti nella crescita dei primordi ovariali contenuti nelle gemme invernali. I risultati ottenuti mostrano che alcuni geni (Gb_06228 e Gb_10868), seppure con segnale debole, sono espressi all'interno delle gemme. Questi risultati suggeriscono che i geni studiati svolgono un ruolo nello sviluppo precoce dell'ovulo. Altri geni (Gb_30325 e Gb_38581) non mostrano alcun segnale di ibridazione nella fase di sviluppo studiata, rendendo difficile trarre delle conclusioni significative sulla loro funzione senza studiarne il dominio di espressione in altre fasi di sviluppo. Ottenere informazioni sul pattern di espressione genica durante lo sviluppo dell'ovulo di *Ginkgo* è un buon punto di partenza per ampliare la conoscenza dei meccanismi molecolari che regolano lo sviluppo dell'ovulo delle piante a seme. Sebbene non abbiamo ottenuto risultati soddisfacenti per tutti i geni studiati questo è uno studio soltanto preliminare e sarà necessario identificare altri geni regolatori dello sviluppo.

6. BIBLIOGRAFIA

- Altamura M. M., Biondi S., & Guzzo F. (2007). *Elementi di biologia dello sviluppo delle piante*. Edises.
- Barro-Trastoy, D., Dolores Gomez, M., Tornero, P., & Perez-Amador, M. A. (2020). On the way to ovules: the hormonal regulation of ovule development. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 39(5), 431-456.
- Ciarle R. (2021), Identification and expression assessment of regulatory genes during ovule development in *Ginkgo biloba*, tesi magistrale in Biologia evoluzionistica
- D'Apice G., Moschin S., Araniti F., Nigris S., Di Marzo M., Muto A., Banfi C., Bruno L., Colombo L., Baldan B. (2021) The role of pollination in controlling *Ginkgo biloba* ovule development. *New Phytologist*, 232(6), 2353-2368
- D'Apice G., S. Moschin S. Nigris, R. Ciarle, A. Muto, L. Bruno, and B. Baldan. (2022). Identification of key regulatory genes involved in the sporophyte and gametophyte development in *Ginkgo biloba* ovules revealed by in situ expression analyses. *American Journal of Botany*, 109(6), 887-898
- Dash, M., & Malladi, A. (2012). The AINTEGUMENTA genes, MdANT1 and MdANT2, are associated with the regulation of cell production during fruit growth in apple (*Malus domestica* Borkh.). *BMC Plant Biology*, 12(1), 1-15.
- Del Tredici, P. (2007). The phenology of sexual reproduction in *Ginkgo biloba*: ecological and evolutionary implications. *The Botanical Review*, 73(4), 267-278.
- Dmuchowski, W., Brągoszewska, P., Gozdowski, D., Baczewska-Dabrowska, A. B., Chojnacki, T., Jozwiak, A., ... & Suwara, I. (2019). Strategy of *Ginkgo biloba* L. in the mitigation of salt stress in the urban environment. *Urban Forestry & Urban Greening*, 38, 223-231.
- Flint, H. L. (1985). Plants showing tolerance of urban stress. *Journal of Environmental Horticulture*, 3(2), 85-89.
- Gong, W., Chen, C., Dobeš, C., Fu, C. X., & Koch, M. A. (2008). Phylogeography of a living fossil: Pleistocene glaciations forced *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) into two refuge areas in China with limited subsequent postglacial expansion. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(3), 1094-1105.
- Guan R., Zhao Y., Zhang H., Fan G., Liu X., Zhou W., ... & Chen W. (2016). Draft genome of the living fossil *Ginkgo biloba*. *Gigascience*, 5(1), 49.
- Holt B.F., Rothwell G.W. (1997). Is *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) really an oviparous plant? *American Journal of Botany* 84(6), 870-872.
- Hori, T., Ridge, R. W., Tulecke, W., Del Tredici, P., Trémouillaux-Guiller, J., & Tobe, H. (Eds.). (2012). *Ginkgo biloba* a global treasure: from biology to medicine. Springer Science & Business Media.
- Kim, S., Soltis, P. S., Wall, K., & Soltis, D. E. (2006). Phylogeny and domain evolution in the APETALA2-like gene family. *Molecular Biology and Evolution*, 23(1), 107-120.

- KUNIYAL, C. P. (2013). Conservation through cultivation: a promising opportunity for the critically endangered tree *Gymnocladus assamicus*. *Current Science*, 105(3), 294.
- Manchado-Rojo, M., Weiss, J., & Egea-Cortines, M. (2014). Validation of Aintegumenta as a gene to modify floral size in ornamental plants. *Plant Biotechnology Journal*, 12(8), 1053-1065.
- Niklas, K. J. (1987). Pollen capture and wind-induced movement of compact and diffuse grass panicles: implications for pollination efficiency. *American Journal of Botany*, 74(1), 74-89.
- Norstog, K. J., Gifford, E. M., & Stevenson, D. W. (2004). Comparative development of the spermatozoids of cycads and *Ginkgo biloba*. *The Botanical Review*, 70(1), 5-15.
- Pancaldi S., Baldisserotto C., Ferroni L., Pantaleoni L. (2019). “FONDAMENTI DI BOTANICA GENERALE teoria e pratica in laboratorio”. Seconda edizione. McGraw-Hill Education (Italy).
- Pasqua G., Abbate G., Forni C. (2008). In AA.VV. “Botanica generale e diversità vegetale”. Italia. Piccin.
- Rothwell, G. W., & Holt, B. (1997). Fossils and phenology in the evolution of *Ginkgo biloba*. In *Ginkgo Biloba: A Global Treasure* (pp. 223-230). Springer, Tokyo.
- Rudall P. J. (2021). Evolution and patterning of the ovule in seed plants. *Biological Reviews* 96, 943-960.
- Shan-An, H., Gu, Y., & Zi-Jie, P. (1997). Resources and prospects of *Ginkgo biloba* in China. In *Ginkgo biloba a global treasure* (pp. 373-383). Springer, Tokyo.
- Singh, B., Kaur, P., Singh, R. D., & Ahuja, P. S. (2008). Biology and chemistry of *Ginkgo biloba*. *Fitoterapia*, 79(6), 401-418.
- Ventura S. (1987). *Ginkgo biloba: vita e storia di una pianta singolare*. Edizioni del centro Villa Ghigi.
- Wang, D., Lu, Y., Zhang, M., Lu, Z., Luo, K., Cheng, F., & Wang, L. (2014). Structure and function of the neck cell during fertilization in *Ginkgo biloba* L. *Trees*, 28(4), 995-1005.
- Yamada, T., Hirayama, Y., Imaichi, R., & Kato, M. (2008). AINTEGUMENTA homolog expression in Gnetum (gymnosperms) and implications for the evolution of ovulate axes in seed plants. *Evolution & development*, 10(3), 280-287.
- Zhao, Y., Paule, J., Fu, C., & Koch, M. A. (2010). Out of China: Distribution history of *Ginkgo biloba* L. *Taxon*, 59(2), 495-504.
- Zhou, Z. Y. (2009). An overview of fossil Ginkgoales. *Palaeoworld*, 18(1), 1-22.
- Zumajo-Cardona, C., & Ambrose, B. A. (2021). Deciphering the evolution of the ovule genetic network through expression analyses in *Gnetum gnemon*. *Annals of Botany*.