



Università degli Studi di Padova

Facoltà di Scienze mm.ff.nn.

Laurea di primo livello in
Biotecnologie

Elaborato di Laurea

Studio del metabolismo del potassio nella pianta di vite (*Vitis vinifera* L.)

Tutor: Dott.ssa Zottini Michela

Laureando: Zanella Marco

Anno Accademico 2008/2009

Indice:

Abstract.....
.....p.1

Introduzione.....
.....p.2

Materiali e
metodi.....
.....p.4

Risultati.....
.....p.10

Discussione.....
.....p.18

Bibliografia.....
.....p.20

Abstract

Il potassio è un importante macronutriente, nonché il più abbondante catione riscontrabile nelle piante superiori e riveste un ruolo chiave in molteplici processi cellulari. Il suo assorbimento dal terreno e la sua diffusione all'interno dei vari tessuti della pianta vengono mediati da molteplici famiglie di proteine trasportatrici (Shaker Channel, TPK Channel, KUP/HAK/KT, HKT, CPA), il cui studio può contribuire in maniera cruciale alla comprensione dei meccanismi di approvvigionamento delle piante.

Questo elaborato riporta una serie di studi eseguiti su campioni di vite (*Vitis vinifera* L.) di Prosecco, atti a correlare la trascrizione di due geni codificanti per presupposte proteine trasportatrici di potassio al fabbisogno del nutriente da parte della pianta. Ad una comparazione iniziale tra diverse cultivar selvatiche, provenienti dalla zona di produzione tipica del Prosecco, segue il confronto diretto con esemplari di laboratorio, cresciuti su terreni contenenti quantità note di potassio. Mediante la valutazione quantitativa di trascrizione dei geni nei diversi soggetti è stato possibile stimare la correlazione tra la quantità potassio disponibile nel terreno (in condizioni standard, di surplus e di carenza) e l'attivazione di questi geni. Per tener conto anche delle variabili di metabolismo della pianta tutti i campioni sono stati raccolti più volte in mesi successivi.

Introduzione

Il potassio è un nutriente fondamentale nonché il catione più diffuso nelle piante superiori; gioca un ruolo fondamentale in svariati processi cellulari come il bilanciamento delle cariche, l'attivazione di processi enzimatici cruciali e un contributo sostanziale al mantenimento della pressione osmotica del vacuolo e quindi al turgore dell'intera cellula. Inoltre, il potassio è essenziale per il trasporto dei soluti nel floema e per il mantenimento dell'equilibrio catio-anionico del citosol e del vacuolo. Infine, ioni K^+ sono coinvolti nell'espansione cellulare, nei movimenti stomatici e nella trasduzione di vari segnali. L'accumulo di potassio proveniente dal terreno e la sua distribuzione nei vari tessuti cellulari è mediato da trasportatori proteici operanti simultaneamente e solitamente situati sulle membrane plasmatica e vacuolare della cellula. L'intero sistema di trasporto consiste di due componenti principali, trasportatori e canali, rispettivamente caratterizzati da alta e bassa affinità per gli ioni K^+ ; l'attività di questi ultimi è stata maggiormente studiata grazie alle avanzate tecniche elettrofisiologiche sviluppatesi negli ultimi anni, mentre si ha una limitata conoscenza riguardo ai trasportatori, a causa della loro minore attività.

E' comunque possibile uno studio dell'espressione e della regolazione dei geni codificanti queste proteine a partire dalla trascrizione dell'RNA da parte delle cellule; conoscendo la sequenza genica originale delle proteine si può procedere a ritroso a partire dall'RNA per ottenere cDNA a singola elica e successivamente DNA a doppia elica, per poi procedere ad un'analisi quantitativa dell'espressione dei geni codificanti per le proteine in questione. Questo permette di saggiare la diversa espressione genica in condizioni ambientali predeterminate e quindi di valutare l'effettiva importanza di tali componenti per il metabolismo cellulare.

Questo elaborato tratta di due trasportatori particolari: il primo, denominato KEA5, che è il meno studiato della sua famiglia (CPA2, antiporto di scambio K^+) il secondo, MDM38, per il fatto che la sua funzione di trasporto di potassio è solamente putativa e come tale, considerata al pari di altre ipotesi che lo caratterizzano più come proteina integrale dei mitocondri. Entrambi sono già stati caratterizzati e studiati in organismi modello

come l'arabetta (*Arabidopsis thaliana* L.) e il riso (*Oryza sativa* L.), ma sempre separatamente, in quanto MDM38 non viene annoverato tra i trasportatori di potassio certi; lo scopo di questo elaborato è di valutare una eventuale correlazione fra la concentrazione di potassio nel terreno di crescita delle piante e la trascrizione dei geni in esame. Un trasportatore di potassio dovrebbe avere un livello trascrizionale stabile in condizioni standard ed eventualmente essere soggetto ad un aumento di trascrizione in caso di scarsità di potassio nel terreno di crescita della pianta (condizione facilmente riproducibile in laboratorio), ma è anche utile considerare l'eventualità di una eccessiva concentrazione di potassio nel terreno di coltura: il mantenimento della pressione osmotica non può permettere la sovrabbondanza di ioni K^+ ed è quindi interessante osservare come la cellula provvede a liberarsi dal potassio in eccesso.

Non potendo conoscere a priori i valori standard di trascrizione dei geni di interesse, l'unico modo di poterne valutare i cambiamenti è quello di confrontarli con la normale attività di geni costitutivi, normalmente attivati e trascritti nel ciclo vitale della cellula, in questo modo è possibile ricavare un rapporto il cui variare è indice di maggiore o minore attività dei geni di interesse. A questo scopo è stata scelta come termine di paragone la sequenza "18S", del complesso ribosomale, in questo modo possiamo affermare che i livelli trascrizionali della sequenza di riferimento siano più o meno stabili durante l'intero ciclo cellulare e che rappresentino un riferimento valido per la quantificazione trascrizionale dell'RNA sotto studio.

Materiali e metodi

Sono stati presi in considerazione 20 campioni di foglie di vite di 6 varietà differenti, raccolti in tre periodi diversi (giugno, luglio, settembre) e mantenuti in freezer (-80°C) dal momento di raccolta a quello di impiego.

I campioni provenivano dalle seguenti cultivar:

- Bianchetta, proveniente dall'azienda vinicola di Menin;
- Verdiso, proveniente dall'azienda di Menin;
- Perera, proveniente dall'azienda di Menin;
- dai cloni 10 e 19 di Prosecco provenienti dall'azienda di Menin;
- dai cloni 10 e 19 di Prosecco provenienti dall'azienda vinicola di Bortolin;
- dal clone 19 di Prosecco coltivato nell'area denominata Cartizze.

I campioni sono stati ridotti in polvere con azoto liquido, in mortai di ceramica e successivamente trasferiti in tubi Falcon da 15ml, pesati, contrassegnati e conservati in azoto liquido.

Da ogni campione è stato prelevato 1g di polvere per l'estrazione dell'RNA.

Ogni campione è stato trasferito in tubi Falcon da 50ml e sospeso per agitazione in 12ml di buffer di estrazione CTAB (preriscaldato a 50°C); successivamente sono stati aggiunti 12 ml di cloroformio isoamil alcool (rapporto 24:1) e i tubi sono stati posti in agitazione meccanica su piano basculante per 10 minuti. In seguito, ogni campione è stato trasferito in un tubo Corex e centrifugato per 10 minuti a 4°C in una centrifuga "Super Beckman" a 10000rpm, ottenendo una suddivisione in tre fasi: una inferiore liquida principalmente costituita dal cloroformio, una intermedia semi-solida contenente composti proteici e una superiore liquida, che è stata prelevata e sottoposta ad ulteriori due estrazioni di identica procedura con cloroformio isoamil alcool. Ad ogni prelievo della fase superiore, effettuato mediante pipette Falcon da 15ml, è seguito un bilanciamento del volume dei campioni con eccesso di cloroformio isoamil alcool, al fine di ottimizzare la successiva centrifugazione. Dopo un totale di 3 estrazioni, con la quasi scomparsa della fase intermedia, la fase superiore di ogni campione è stata nuovamente prelevata con pipette Falcon e trasferita in tubi Falcon da 15ml.

Ad ogni campione è stato aggiunto litio cloruro (LiCl in soluzione 10M) e dopo vigorosa agitazione manuale è stato conservato overnight a 4°C per consentire la precipitazione del pellet genomico.

I tubi Falcon sono stati centrifugati per 40min a 4°C in una centrifuga "Jouan CR3i" a 4000rpm e successivamente da ogni campione è stata eliminata la fase liquida per versamento, mentre il pellet rimasto è stato lavato con 500µl di etanolo (EtOH in soluzione acquosa al 70%), vortexato e trasferito per versamento in una eppendorf da 1,5ml, per prepararlo alla successiva precipitazione alcolica.

Le eppendorf sono state centrifugate a 13000rpm per 10min in una microcentrifuga "Heraeus Biofuge Fresco", preraffreddata a 4°C. Il pellet di acidi nucleici è stato nuovamente isolato dalla fase liquida mediante pipette Gilson e lavato con 500µl di sodio acetato (C₂H₃O₂Na in soluzione 3M) per diminuirne la solubilità e precipitarlo ulteriormente.

Sono susseguiti due lavaggi con etanolo (70%) e due centrifugazioni (13000rpm, 4°C, 10min), dopodiché ogni campione è stato fatto asciugare sotto cappa chimica. Ad ogni eppendorf sono stati aggiunti 40µl di acqua pretrattata per eliminare le eventuali RNAsi (H₂O DEPC), in cui è stato fatto sciogliere il pellet; immediatamente le eppendorf sono state trasferite in un thermoblock a 65°C per 5 minuti e successivamente sono state vortexate, spinnate in una micro centrifuga e poste in ghiaccio per almeno 2 minuti. Da ogni campione sono stati prelevati, con pipette Gilson, 4µl per l'analisi della concentrazione di RNA e del Ratio allo spettrofotometro (GeneQuant Pro). I risultati sono mostrati nella tabella che segue.

MAGGIO

GIUGNO

LUGLIO

SETTEMBRE

| Campione | (RNA) µg/ml | Ratio | (RNA) µg/ml | Ratio | (RNA) µg/ml | Ratio | (RNA) µg/ml | Ratio |
|--------------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|---------------|----------------|--------------|
| Verdiso | --- | --- | 28.8 | 1.44 | --- | --- | 84 | 2.019 |
| Perera | --- | --- | 99.2 | 1.797 | 99.2 | 801.6 | 360.8 | 1.969 |
| Menin 10 | --- | --- | 111.2 | 2.014 | 314.4 | 2 | 149.6 | 1.9 |
| Menin 19 | --- | --- | 384.8 | 2.106 | 668.8 | 1.96 | 207.2 | 1.997 |
| Bianchetta | --- | --- | 55.2 | 1.917 | --- | --- | 59.2 | 1.762 |
| Cartize | --- | --- | --- | --- | 468.8 | 1.826 | 120.8 | 1.888 |
| Bor 10 | --- | --- | --- | --- | 801.6 | 2.02 | 92 | 1.949 |
| Bor 19 | --- | --- | --- | --- | 69.6 | 1.3592 | 282.4 | 1.994 |
| CI 10 (vitro) -K | 348.8 | 2.086 | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| CI 10 (vitro) +K | 684.8 | 1.928 | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| CI 10 (vitro) Ctrl | 183 | 2.082 | --- | --- | --- | --- | --- | --- |

Figura 1: tabella delle concentrazioni e del ratio dei campioni analizzati.

Da ogni campione sono stati quotati 10µg di RNA che sono stati posti a -80°C fino al successivo trattamento.

Per ogni campione sono state preparate delle eppendorf da 1,5ml contenenti 10µg di RNA, 5µl di DNAsi (2U/µl, Ambion, UK, conservata a -20°C) e 10µl di Buffer 10x, il tutto portato a volume finale di 100µl con acqua MilliQ. I campioni sono stati incubati a 37°C per 30min in bagno termostatico per permettere alla DNAsi di agire sul campione, successivamente l'enzima è stato inattivato ponendo le eppendorf in un thermoblock a 70°C per 15min. Ad ogni eppendorf è stato aggiunto un volume (10µl) di sodio acetato (C₂H₃O₂Na in soluzione 3M) e 2,5 volumi di etanolo assoluto (EtOH 100%); i campioni sono stati conservati overnight a -20°C.

Le eppendorf sono state centrifugate a 13000rpm per 15min ed è stato eliminato il surnatante; successivamente i campioni sono stati sottoposti a due lavaggi con 500µl di etanolo (EtOH 70%) alternati a due centrifugazioni di 5min a 13000rpm e lasciati asciugare sotto cappa.

Ad ogni eppendorf sono stati aggiunti 10µl di acqua MilliQ mediante pipetta Gilson facendo attenzione a lavare la parete della provetta per distaccarne l'RNA depositatosi durante la centrifuga.

Le provette sono state trasferite in un thermoblock a 65°C (temperatura di distensione dell'RNA) per 5min, vortexate e immediatamente poste in ghiaccio per almeno 2min, in preparazione al successivo trattamento.

Al fine di ottenere filamenti di cDNA, è stato preparato il seguente composto per ogni campione, una eppendorf da 1,5ml contenente:

- 5µg RNA (aliquotato dalla soluzione in acqua MilliQ)
- 1µl dNTPs (10µM)
- 0,5µl decameri (random primers) (500µg/ml)
- 6,5µl H₂O

I preparati sono stati portati a 65°C per 5min e successivamente spinnati e conservati in ghiaccio; in seguito ad ogni campione sono stati aggiunti:

- 4µl buffer 5x
- 5µl DTT (0,1M)

A questo punto le eppendorf sono state lasciate a temperatura ambiente (RT) per circa 2 minuti ed è stata infine aggiunto a ciascuna 1 µl di Superscript (da uno stock in concentrazione di 200U/µl).

I campioni così preparati sono stati incubati in bagno termostatico a 42°C per 50min e successivamente in thermoblock a 70°C per 15min al fine di inattivare la trascrittasi inversa.

I filamenti a singola elica così ottenuti sono stati impiegati in PCR con *Taq* DNA Polimerasi.

E' stata preparata una mini-ependorf per ogni campione contenente:

| COMPONENTE | Conc. Stock | Quantità aggiunta | Conc. Finale |
|-----------------------|--|-------------------|--------------------------------------|
| cDNA | --- | 5µl | --- |
| 10X PCR Buffer | 200mM Tris HCl pH8.4 / 500mM KCl | 5µl | 20mM Tris HCl pH8.4 / 50mM KCl |
| MgCl ₂ | 50mM | 5µl | 5mM |
| dNTP Mix | 10µM | 1µl | 0,2µM |
| Forward Primer | 10µM | 1µl | 0,2µM |
| Reverse Primer | 10µM | 1µl | 0,2µM |
| Taq DNA Polimerasi | 5U/µl | 0,2µl | 0,02U/µl |

Figura 2: tabella della composizione del preparato; vengono riportate le concentrazioni sia dello stock sia delle ependorf

Il tutto portato a volume finale di 50µl con acqua (H₂O) distillata e autoclavata.

In seguito le mini-ependorf sono state poste in termociclatori ThermoHybaid e sottoposti a un numero predeterminato di cicli di PCR.

Per ottimizzare la reazione, è stata precedentemente realizzata una curva dei cicli usando una mix di campioni in una PCR di prova nella quale è stato impiegato metà (5 µg) del volume successivamente adoperato per la PCR effettiva, seguita da un'analisi mediante corsa elettroforetica per determinare il numero ottimale di cicli a cui sottoporre i campioni per quanto riguarda ogni singolo gene analizzato; la tabella seguente riporta i cicli di PCR scelti per ogni campione.

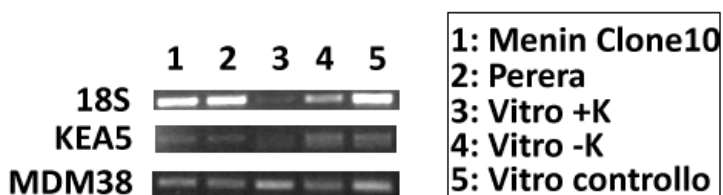
| CAMPIONI | 18S (controllo) | KEA5 | MDM38 |
|------------------|------------------------|-------------|--------------|
| Giugno | 15 | 33 | 27 |
| Luglio | 17 | 35 | 32 |
| Settembre | 17 | 32 | 28 |
| Vitro | 17 | 30 | 28 |

Figura 3: tabella dei cicli di PCR scelti per ogni amplificazione.

Successivamente i campioni (10µl per ogni eppendorf) sono stati analizzati in una corsa elettroforetica in gel d'agarosio (soluzione 1,5% da 100ml contenente 4µl EtBr); ad ogni campione sono stati aggiunti 5µl di Orange Loading Buffer. I gel ottenuti sono stati fotografati con GelDoc™ e la fluorescenza all'ultravioletto è stata quantificata con ImageJ™; in seguito i risultati sono stati rapportati al computer con Microsoft Excel™.

Risultati:

Le tabelle e i grafici che seguono riportano i risultati della quantificazione delle bande derivate dalla corsa elettroforetica dei campioni; la mancanza di dati relativi ad alcune varietà ha reso necessaria la selezione dei campioni da confrontare in relazione ai tre prelievi (giugno, luglio e settembre): dove possibile sono mostrati i risultati relativi a tutti i campioni.



| | 31/10/2008 | | 17/11/2008 | |
|-----------------|------------|----------|------------|----------|
| | kea/18s | mdm/18s | kea/18s | mdm/18s |
| Menin 10 | 0,4336429 | 0,472287 | | |
| Perera | 0,3621272 | 0,429729 | 1,3010683 | 0,948097 |

| | kea/18s | | mdm/18s | |
|-----------------|----------|------------|----------|------------|
| | Media | σ_x | Media | σ_x |
| Menin 10 | 0,433643 | | 0,472287 | |
| Perera | 0,831598 | 0,663932 | 0,688913 | 0,366542 |

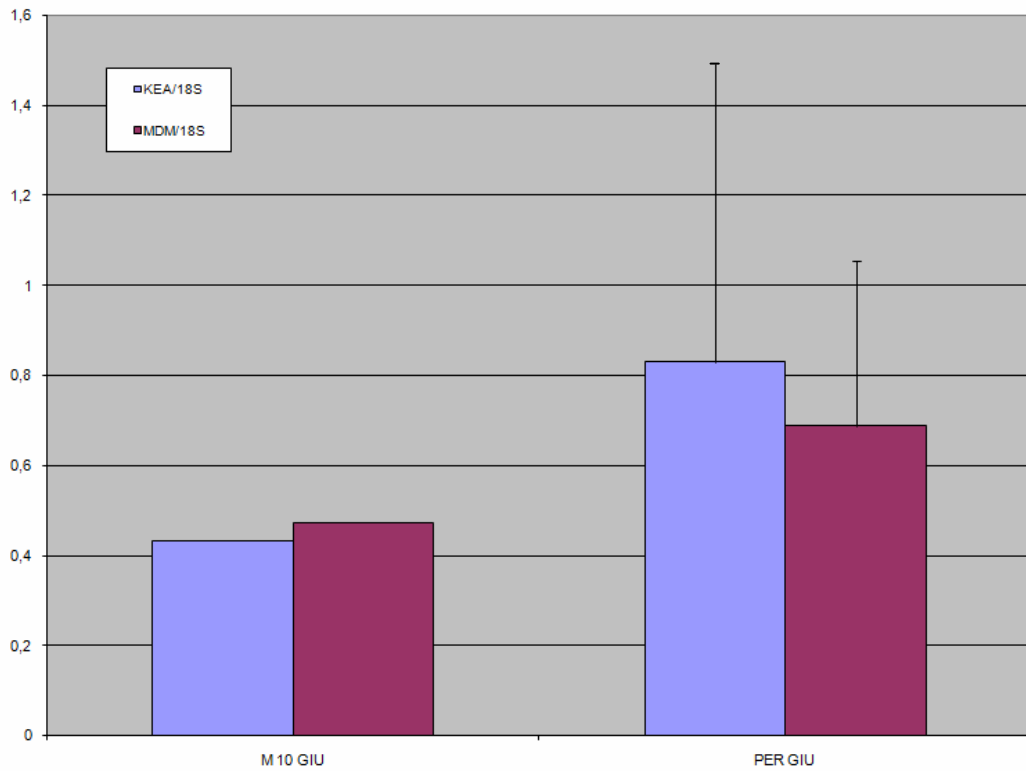
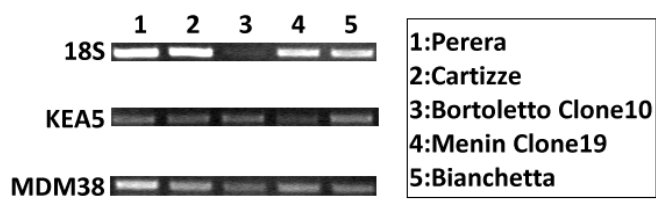


Figure 5-6: contenuto relativo di trascritto di kea e mdm38 nei campioni di giugno. a) gel PCR, b) tabella di confronto, c) grafico riassuntivo dei valori.

LUGLIO:



| | 18S | KEA | MDM | KEA/18S | MDM/18S |
|-------------------------|-----|-----|-----|----------|----------|
| Perera | 214 | 107 | 149 | 0,499342 | 0,698882 |
| Cartizze | 210 | 99 | 125 | 0,473338 | 0,595767 |
| Bortoletto Cl.10 | 93 | 102 | 108 | 1,096715 | 1,162805 |
| Menin Cl.19 | 159 | 91 | 119 | 0,570783 | 0,744338 |
| bianchetta | 152 | 113 | 110 | 0,743124 | 0,722621 |

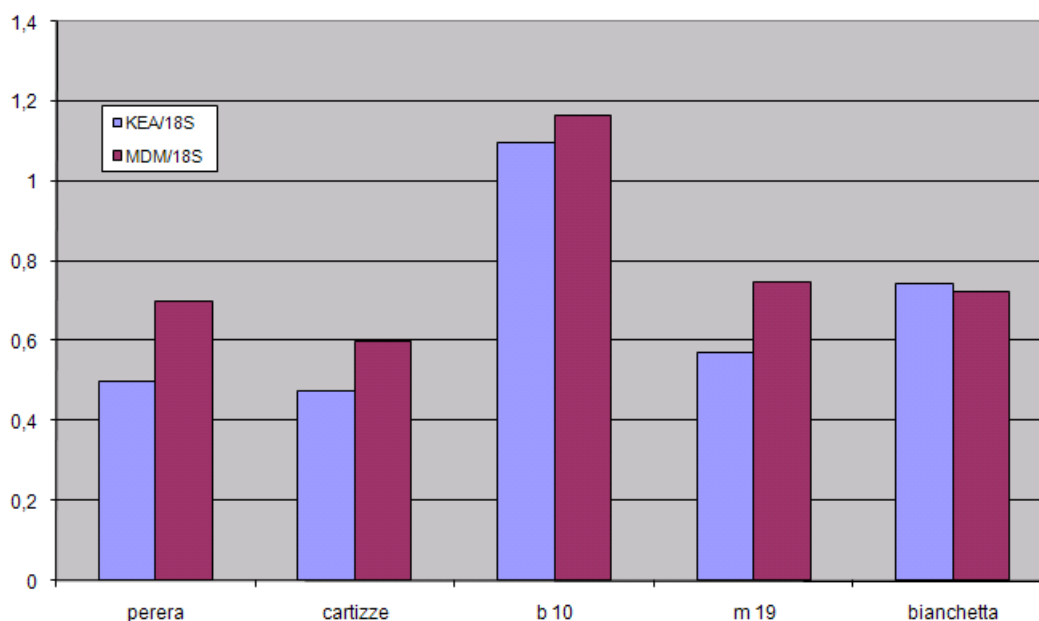
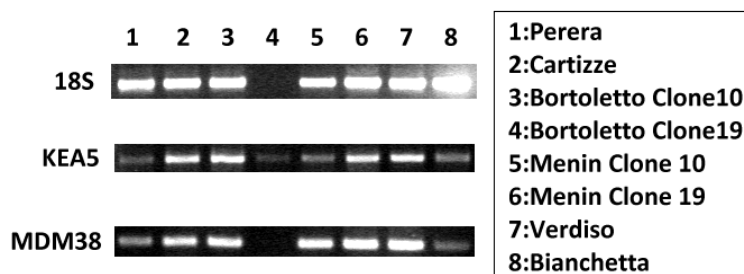


Figure 5-6: contenuto relativo di trascritto di kea e mdm38 nei campioni di luglio. a) gel PCR, b) tabella di confronto, c) grafico riassuntivo dei valori.



| | 18S | KEA | MDM | KEA/18S | MDM/18S |
|-----------------|---------|--------|--------|----------|----------|
| Perera | 158.209 | 61.321 | 69.179 | 0,387595 | 0,437263 |
| Cartizze | 201.990 | 95.842 | 95.776 | 0,474489 | 0,474162 |

| | | | | | |
|-------------------------|---------|---------|---------|----------|----------|
| Bortoletto Cl.10 | 193.398 | 102.939 | 103.163 | 0,532265 | 0,533423 |
| Bortoletto Cl.19 | 52.995 | 52.066 | 42.367 | 0,98247 | 0,799453 |
| Menin Cl.10 | 162.036 | 63.194 | 110.546 | 0,39 | 0,682231 |
| Menin Cl.19 | 237.515 | 90.959 | 136.628 | 0,382961 | 0,575239 |
| Verdiso | 234.658 | 93.719 | 146.434 | 0,399385 | 0,624032 |
| Bianchetta | 250.184 | 64.429 | 66.694 | 0,257526 | 0,26658 |

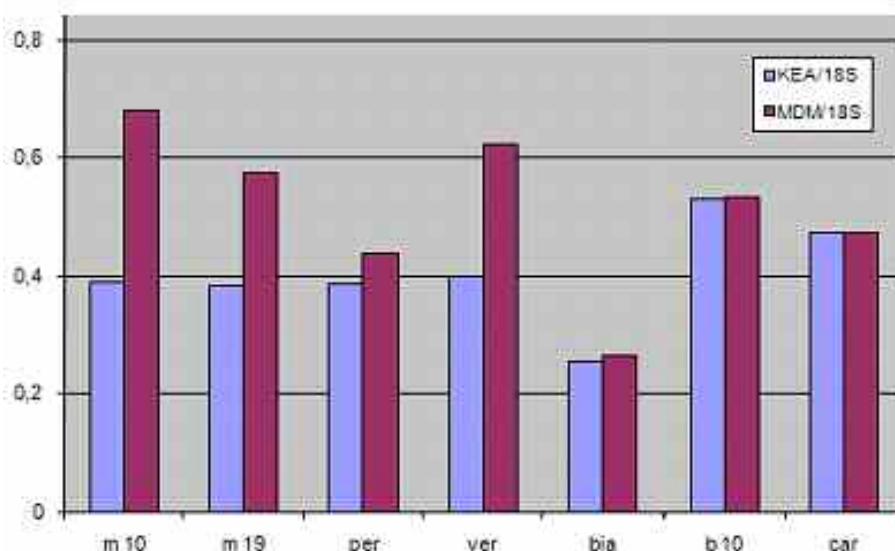


Figure 5-6: contenuto relativo di trascritto di kea e mdm38 nei campioni di settembre. a) gel PCR, b) tabella di confronto, c) grafico riassuntivo dei valori.

Il campione di Clone 19 della cultivar Bortoletto non ha dato fluorescenza per cui i dati, riportati per correttezza, non sono stati utilizzati.

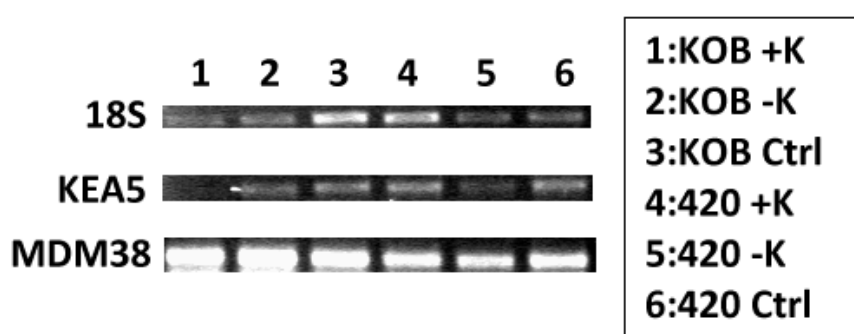
CAMPIONI IN VITRO DI SETTEMBRE.

Questi dati riguardano una nuova analisi di campioni provenienti da piante di laboratorio (Kober 5bb e 420A), cresciute su terreni diversi in triplice copia a diverse concentrazioni di potassio (arricchita, impoverita e standard). Le foglie di queste piante, a differenza dei campioni di giugno, non sono state conservate a -80°C.

| CONTROLLO | | SOLUZIONE -K | | SOLUZIONE +K | |
|---------------------------------|-----|---------------------------------|-----|---------------------------------|-----|
| MACROELEMENTI | mM | MACROELEMENTI | mM | MACROELEMENTI | mM |
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 | KH ₂ PO ₄ | 0,3 | KH ₂ PO ₄ | 0,5 |
| K ₂ SO ₄ | 0,5 | MgHPO ₄ | 0,2 | K ₂ SO ₄ | 2,5 |

| | | | | | |
|---|-------|---|-------|---|-------|
| Ca(NO ₃) ₂ | 2 | Ca(NO ₃) ₂ | 2 | Ca(NO ₃) ₂ | 2 |
| MgSO ₄ | 0,65 | MgSO ₄ | 0,45 | MgSO ₄ | 0,65 |
| MICROELEMENTI | μM | MICROELEMENTI | μM | MICROELEMENTI | μM |
| H ₃ BO | 0,5 | H ₃ BO | 0,5 | H ₃ BO | 0,5 |
| CuSO ₄ | 0,045 | CuSO ₄ | 0,045 | CuSO ₄ | 0,045 |
| ZnSO ₄ | 0,05 | ZnSO ₄ | 0,05 | ZnSO ₄ | 0,05 |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ | 0,02 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ | 0,02 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ | 0,02 |
| MnSO ₄ | 0,5 | MnSO ₄ | 0,5 | MnSO ₄ | 0,5 |
| Fe-EDDHA | 0,5 | Fe-EDDHA | 0,5 | Fe-EDDHA | 0,5 |

Prima estrazione:



| | 18S | KEA | MDM | KEA/18S | MDM/18S |
|-----------------|-----|-----|-----|----------|----------|
| kob +K | 74 | 55 | 186 | 0,736069 | 2,496401 |
| kob -K | 76 | 69 | 198 | 0,913469 | 2,614614 |
| kob ctrl | 105 | 75 | 161 | 0,714524 | 1,530869 |
| 420 +K | 95 | 79 | 124 | 0,830353 | 1,315737 |
| 420 -K | 62 | 58 | 114 | 0,935213 | 1,829313 |
| 420 ctrl | 66 | 77 | 130 | 1,166963 | 1,972229 |

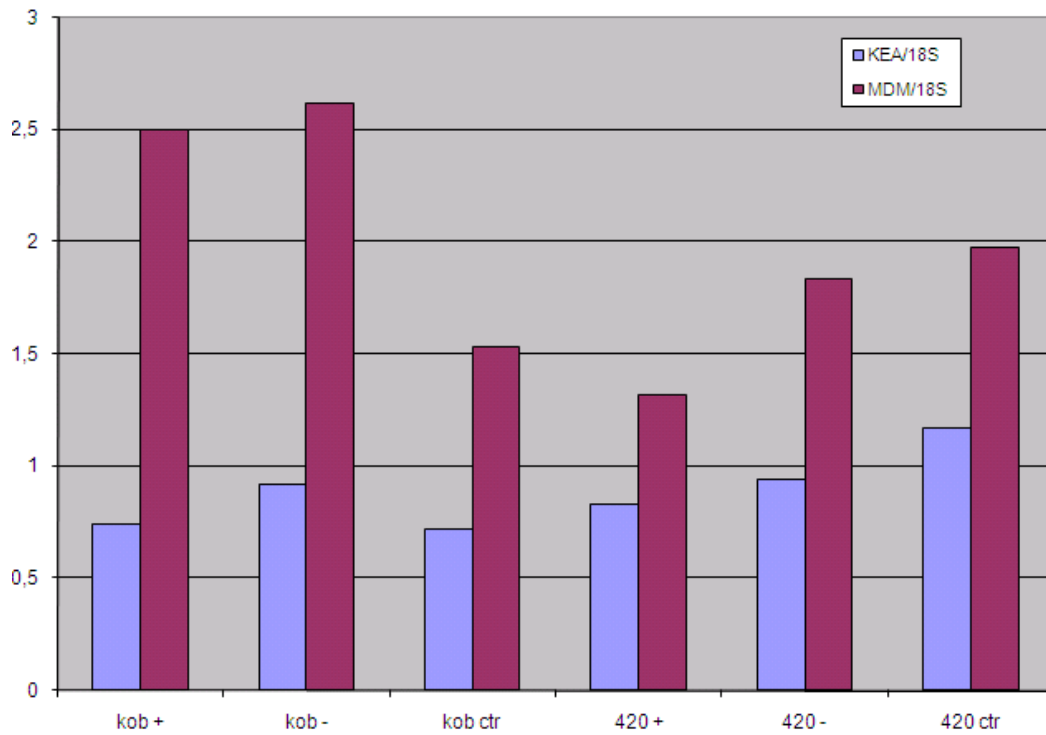
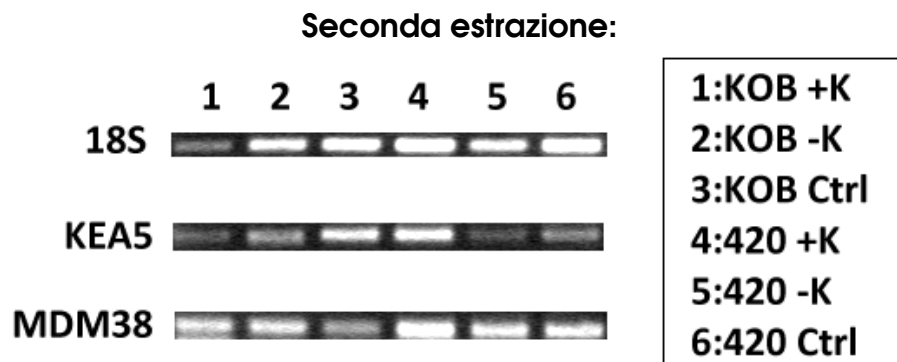


Figure 5-6: contenuto relativo di trascritto di *kea* e *mdm38* nei campioni *in vitro* di settembre. a) gel PCR, b) tabella di confronto, c) grafico riassuntivo dei valori.



| | 18S | KEA | MDM | KEA/18S | MDM/18S |
|-----------------|-----|-----|-----|----------|----------|
| kob +K | 97 | 91 | 137 | 0,936048 | 1,410176 |
| kob -K | 152 | 109 | 138 | 0,716684 | 0,909067 |
| kob ctrl | 183 | 141 | 114 | 0,768252 | 0,62071 |
| 420 +K | 218 | 150 | 170 | 0,68797 | 0,780928 |
| 420 -K | 150 | 87 | 142 | 0,581596 | 0,946718 |
| 420 ctrl | 219 | 104 | 146 | 0,473054 | 0,66381 |

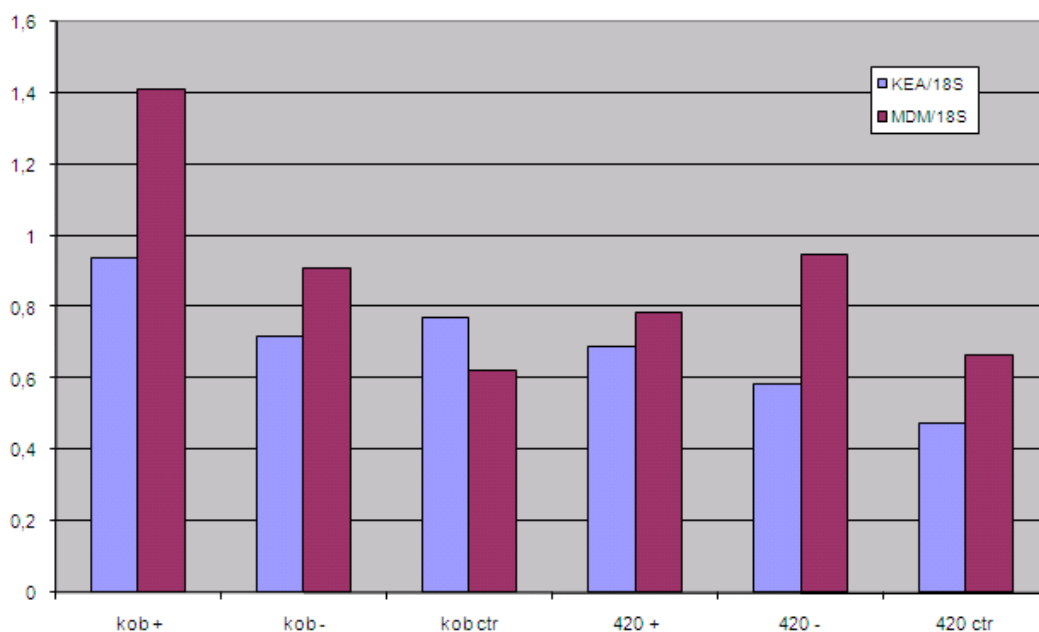


Figure 5-6: contenuto relativo di trascritto di kea e mdm38 nei campioni in vitro di settembre. a) gel PCR, b) tabella di confronto, c) grafico riassuntivo dei valori.

CONFRONTO DELLE DUE ESTRAZIONI:

| | 26/11/2008 | | 27/11/2008 | |
|-----------------|------------|-----------|------------|-----------|
| | KEA/18S | MDM/18S | KEA/18S | MDM/18S |
| kob +K | 0,736069 | 2,4964014 | 0,936048 | 1,4101759 |
| kob -K | 0,9134686 | 2,6146141 | 0,7166839 | 0,9090669 |
| kob ctrl | 0,7145239 | 1,5308695 | 0,7682525 | 0,6207098 |
| 420 +K | 0,830353 | 1,3157366 | 0,6879704 | 0,7809276 |
| 420 -K | 0,9352127 | 1,8293126 | 0,581596 | 0,9467179 |
| 420 ctrl | 1,1669629 | 1,9722286 | 0,4730542 | 0,6638102 |

| | KEA/18S | | MDM/18S | |
|-----------------|----------|------------|----------|------------|
| | media | σ_x | media | σ_x |
| kob +K | 0,836058 | 0,141407 | 1,953289 | 0,768077 |
| kob -K | 0,815076 | 0,139148 | 1,761841 | 1,206004 |
| kob ctrl | 0,741388 | 0,037992 | 1,07579 | 0,64358 |
| 420 +K | 0,759162 | 0,10068 | 1,048332 | 0,378167 |
| 420 -K | 0,758404 | 0,250045 | 1,388015 | 0,624089 |
| 420 ctrl | 0,820009 | 0,490668 | 1,318019 | 0,925191 |

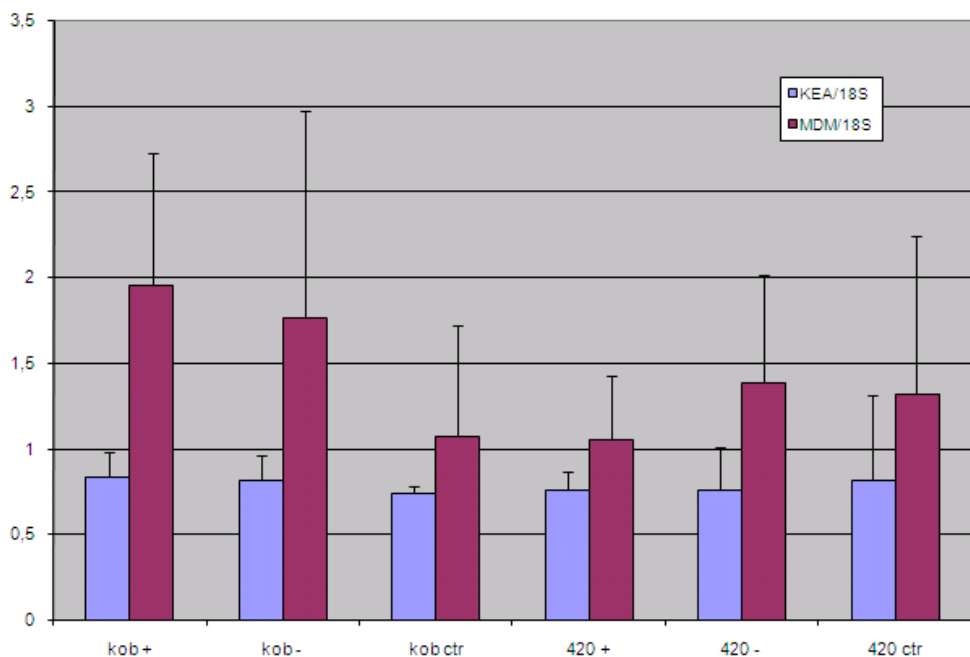


Figure 5-6: riassunto delle due estrazioni. Contenuto relativo di trascritto di Kea05 e Mdm38 nei campioni in vitro di settembre. a) gel PCR, b) tabella di confronto, c) grafico riassuntivo dei valori.

Discussione:

Prima di procedere all'analisi dei dati ottenuti, va premesso che durante lo svolgimento dell'esperimento sono sopraggiunti numerosi ostacoli, sia dovuti all'inesperienza sia vere e proprie fatalità, che hanno in parte compromesso i risultati dell'esperienza; da evidenziare, sicuramente:

- la scarsità o la cattiva qualità di alcuni campioni;
- l'esaurimento delle scorte di TaQ Polimerasi e successivo inevitabile impiego di una polimerasi di tipo diverso (solo in un caso di RIPETIZIONE di una estrazione);
- la rottura di un tubo Corex durante una centrifuga, nonostante il bilanciamento, con conseguente perdita del campione contenuto;
- errori di campionamento dovuti a pipette Gilson fuori taratura;
- la formazione di schiuma durante la preparazione del gel d'agarosio che ha reso illeggibili le bande fluorescenti;

Lo scopo dell'esperimento era verificare la correlazione tra l'espressione dei geni corrispondenti a KEA5 / MDM38 e il livello di potassio contenuto nel terreno di coltura, nella pianta di vite (*Vitis vinifera* L.). L'effettivo variare dell'espressione dei geni indicherebbe il loro coinvolgimento nel metabolismo del potassio nella vite. Il confronto fra i livelli di espressione nei campioni di varietà diverse (Cartize, Perera, Bortoletto cloni 10 e 19, Menin cloni 10 e 19, Verdiso e Bianchetta) è sostanzialmente lineare, mentre l'espressione genica nel tempo (campioni di giugno, luglio e settembre) subisce un leggero incremento, probabilmente dovuto all'avvicinarsi della fase fruttifera della pianta.

Questa analisi preliminare sui campioni in vivo suggerisce una effettiva correlazione tra l'espressione genica e il metabolismo della pianta.

L'analisi dei campioni in vitro mostra lo stesso andamento, ma presenta una anomalia non trascurabile rispetto all'ipotesi che sta alla base dell'esperimento: i campioni in vitro di controllo (Ctrl) presentano una espressione genica inferiore a quella dei campioni il cui terreno è stato privato di potassio (-K). Questo pone un problema di considerazione dei campioni: ci si

aspetterebbe di trovare l'espressione genica dei campioni di controllo su valori medi rispetto ai terreni modificati sperimentalmente, in modo da rispettare la relazione lineare "quantità di potassio : quantità di canali del potassio". In un primo momento questo dato discordante porterebbe a dover negare la tesi, nonostante il comportamento dei campioni sia così lineare.

Se invece si considerano i due geni non come semplici canali di potassio ma come regolatori attivi della concentrazione di ioni K^+ nel citoplasma, i dati che prima sembravano discordanti acquistano un senso concordante con la nostra tesi. L'importanza del mantenimento di livelli di potassio determinati è cruciale nel metabolismo della pianta, per cui possiamo assumere che i livelli espressi dalla pianta nel terreno standard (Ctrl) corrispondano ad un metabolismo normale; infatti sono in linea con le medie dell'espressione nelle piante selvatiche (media dei campioni e delle tre estrazioni in mesi successivi).

Le piante cresciute in laboratorio su un terreno deprivato di potassio (K^-), invece, hanno avuto a disposizione una quantità minore un di nutriente fondamentale per il proprio metabolismo: è facilmente ipotizzabile, quindi, che abbiano sovraespresso i propri carrier del potassio per aumentarne l'assimilazione dal terreno e la diffusione. Un'ipotesi di questo tipo spiegherebbe i valori di espressione superiori a quelli delle piante in terreno standard, rendendo obsoleta la concezione del rapporto lineare "quantità di potassio : quantità di canali del potassio".

Allo stesso modo si spiegherebbero i valori marcatamente più alti nelle piante di laboratorio cresciute su terreni arricchiti di potassio (K^+): l'eccessiva concentrazione di potassio, come di ogni altro nutriente, può risultare dannosa per la pianta, specie se si considera il fatto che lo ione K^+ è spesso impiegato dalle cellule come contropartita di ioni H^+ , attraverso proteine antiporto (alla cui categoria sembra appartenga proprio KEA5). Un "sovradosaggio" è meglio gestibile da un numero maggiore di canali (problema frequente in caso di modifiche genetiche, in cui il carico metabolico è spesso reso critico dall'ingolfamento dei canali di trasporto), ecco quindi che si ristabilisce la linearità "quantità di potassio : quantità di canali del potassio" dalla quale si era partiti

per provare l'effettivo coinvolgimento di KEA5 e MDM38 nel metabolismo del potassio.

Ovviamente questa nuova teoria, nata durante l'esperienza di laboratorio, dovrà essere verificata con nuovi esperimenti e test più incentrati su campioni cresciuti in laboratorio: è suggeribile impiegare sempre terreni arricchiti, deprivati e standard, ma variando la concentrazione di potassio sullo stesso terreno per osservare, mediante campionature prese dallo stesso soggetto in tempi successivi, il cambiamento dell'espressione genica al variare della disponibilità di potassio nel terreno.

Bibliografia:

Naga Amrutha R., Nataraj Sekhar P., Varshney K. Rajeev, Kishor Kavi P.B. – Genome-wide analysis and identification of genes related to potassium transporter families in rice (*Oryza sativa* L.) – *Plant Science* 172 (2007) pp 708–721

Grabov Alexander – Plant KT/KUP/HAK Potassium Transporters: Single Family – Multiple Functions – *Annals of Botany* 99: pp 1035–1041, 2007

Ashley M. K., Grant M., Grabov A.(2006) – Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins – *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, No. 2, pp 425–436

Dimmer K.S., Navoni F., Casarin A., Trevisson E., Endeke S., Winterpacht A., Salviati L. and Scorrano L.(2007) – LETM1, deleted in Wolf–Hirschhorn syndrome is required for normal mitochondrial morphology and cellular viability – *Human Molecular Genetics*, Vol. 17, No. 2, pp 201–214

Grabov A.(2007) – Plant KT/KUP/HAK Potassium Transporters: Single Family – Multiple Functions – *Annals of Botany* 99, pp 1035–1041

Hasegawa A. and van der Bliek A.M.(2007) – Inverse correlation between expression of the Wolfs Hirschhorn candidate gene Letm1 and mitochondrial volume in *C. elegans* and in mammalian cells – *Human Molecular Genetics*, Vol. 16, No. 17, pp 2061–2071

Nowikovsky K., Reipert S., Devenish R.J., Schweyen R.J.(2007) – Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K^p/H^p exchange activity, osmotic swelling and mitophagy – *Cell Death and Differentiation* 14, pp 1647–1656

Yi-Fang Chen, Yi Wang and Wei-Hua Wu(2008) – Membrane Transporters for Nitrogen, Phosphate and Potassium Uptake in Plants – *Journal of Integrative Plant Biology* 50 (7), pp 835–848