



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente
DAFNAE

CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

IL GENE HDA 108 CONTROLLA L'ARCHITETTURA DELLA PIANTA DI MAIS

Relatore: Prof.ssa Serena Varotto
Correlatore: Dott. Silvia Farinati

Laureanda: Silvia Zecchin
Matricola n. 1005934

ANNO ACCADEMICO 2013 – 2014

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1 L'IMPORTANZA DEL MAIS ED IL SUO GENOMA	5
1.2 GENETICA ED EPIGENETICA	7
1.2.1 LA STRUTTURA DELLA CROMATINA	9
1.2.2 LE MODIFICHE ISTONICHE E LA METILAZIONE DEL DNA	12
1.3 GLI ENZIMI RPD3/HDA1	16
2. SCOPO DELLA TESI	20
3. MATERIALI E METODI	21
3.1 ESTRAZIONE, PURIFICAZIONE DNA GENOMICO	21
3.1.1 CORSA ELETTROFORETICA SU GEL DI AGAROSIO	21
3.1.2 PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i> , "reazione a catena della polimerasi")	22
3.2 ANALISI DI ESPRESSIONE	25
3.2.1 RT-PCR (<i>Reverse Transcription PCR</i>)	25
3.2.2 REAL TIME PCR	25
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	28
4.1 GENOTIPIZZAZIONE E FENOTIPIZZAZIONE	28
4.2 ANALISI DI ESPRESSIONE	36
5. CONCLUSIONI	39
6. BIBLIOGRAFIA	40

RIASSUNTO

Il mais è una tra le colture più diffuse e coltivate al mondo. Grazie alle biotecnologie e all'ingegneria genetica, si sta cercando di rendere questa coltura più resistente ed efficiente. Questa tesi ha lo scopo di studiare una linea mutante per il gene *hda108*, al fine di valutare fenotipicamente e molecolarmente gli effetti della mutazione sulla pianta. La mutazione del gene *ZmHDA108* è stata ottenuta tramite inserzione del trasposone Mu (*Mutator*) a monte del gene stesso, con il fine di interromperlo e inibirne la traduzione in proteina. Il gene *HDA108* codifica per una deacetilasi istonica, ovvero un enzima responsabile della rimozione dei gruppi acetile dalle code N-terminali delle proteine istoniche. Questa modifica istonica, assieme ad altre, come la metilazione, la fosforilazione e l'ubiquitinazione giocano un ruolo chiave nel controllo dell'espressione genica attraverso il rimodellamento della cromatina e di conseguenza l'accessibilità alla doppia elica di DNA da parte dei fattori di trascrizione e della RNA polimerasi.

Le popolazioni portanti la mutazione nel gene *hda108* studiate in questa tesi sono le seguenti BC5S1, BC5 σ 2 e BC5S2. Hanno subito infatti 5 cicli di introgressione nella linea B73, per poi essere autofecondate (BC5S2) o incrociate tra di loro (BC5 σ 2) per ottenere individui omozigoti.

Queste tre progenie sono state confrontate fenotipicamente ed in seguito sono state eseguite analisi di espressione per verificare l'assenza del trascritto del gene *hda108* in quattro tessuti (11° foglia, area meristemica, infiorescenza femminile e maschile). Le analisi di espressione non si sono limitate a studi sull'espressione del gene *HDA108*, ma hanno coinvolto altri geni della stessa famiglia di deacetilasi istoniche *HDA* (*HDA101*, *HDA119*, *HDA116*, *HDA102*). Inoltre un'ultima analisi di espressione è stata eseguita su geni di mais putativi target delle deacetilasi, nei quattro tessuti in cui si esprimono, per verificare se le alterazioni del fenotipo sono determinate dalle variazioni della loro espressione.

ABSTRACT

Maize is one of the most widely used and cultivated crops in the world. Thanks to biotechnologies and genetics engineerings, breeding is trying to make this culture more dynamic and efficient.

This thesis has the purpose of studying a mutation in *ZmHDA 108* gene, to observe the effects of mutation both on plant phenotype and putative target gene expression. The mutation of the *ZmHDA108* gene was obtained by insertion of the Mu transposon (*Mutator*), at the 5' of the gene sequence. *ZmHDA108* encodes a histone deacetylase, that is an enzyme responsible for the removal of acetyl groups from the N-terminal tails of histone proteins. This histone modification, with other histone modifications such as methylation, phosphorylation and ubiquitination are essential in the control of gene expression, through chromatin remodeling and consequent accessibility to the double helix of DNA by transcription factors and RNA polymerase II.

The progenies studied in this thesis are BC5S1, BC5 σ 2 and BC5S2. They have been subjected to five round of introgression in the B73 inbred reference line, and then self-pollinated (BC5S2) or crossed (BC5 σ 2) to obtain mutant homozygous plants.

These three populations were compared phenotypically with wild type plants, and then expression analyzes were performed to verify the presence of *hda108* transcript in four tissues (11th leaf, meristematic aerea, inflorescence male and female). However, the analysis of expression was not limited to verify the *HDA108* gene knockdown, but expression analysis involved other genes of the *HDA* family (*HDA101*, *HDA119*, *HDA116*, *HDA102*). Finally expression analysis was performed on the putative target genes of *ZmHDA108*, in the four different tissues, to analyze their expression in the *hda108* mutant.

1. INTRODUZIONE

1.1 L'IMPORTANZA DEL MAIS ED IL SUO GENOMA

Il mais (*Zea mays* L.) è una pianta erbacea annuale della famiglia delle Graminacee, tribù delle Maydeae, specie Mays. Venne domesticato più di 10.000 anni fa nell'America Centrale, dove rappresentava l'ingrediente base della cucina azteca ed il suo ancestrale fu il teosinte. In Italia, la coltura era già presente a partire dal 1700, sostituendo rapidamente il miglio e panico e divenendo così la base dell'alimentazione contadina e del bestiame.

Più o meno consapevolmente, i primi agricoltori avevano capito che, facendo riprodurre il seme delle piante migliori, nell'anno successivo sarebbe stata più alta la possibilità di ottenerne piante con caratteristiche organolettiche ed agronomiche favorevoli, attuando così un primo miglioramento genetico del mais, definito selezione massale.

La svolta arrivò nel 1909, quando ebbe inizio l'era del mais ibrido, grazie alle pubblicazioni di due genetisti americani, Shull e East, che dettarono i principi generali per la costituzione di ibridi di mais. Gli ibridi sono l'incrocio di linee pure, linee inbreed o cloni opportunamente scelte, con lo scopo di generare manifestazioni di eterosi, che portano caratteri fenotipici superiori a quelle dei parentali. Il mais è un esempio in cui la ricerca ha dato e darà i migliori risultati: si tratta infatti di una specie in cui la particolare morfologia delle infiorescenze, maschili e femminili, e la loro separazione sulla pianta ha permesso di effettuare l'incrocio controllato per l'ottenimento degli ibridi. Numerosi studi cercano di migliorare le specie già esistenti, in termini di produttività, qualità, adattabilità, resistenza alle malattie, efficienza di utilizzazione di acqua e nutrienti. Si stima un consumo mondiale di circa 868 milioni di tonnellate nel 2012/2013, in cui il maggiore produttore sono gli Stati Uniti (274 milioni di tonnellate) seguiti dalla Cina (208 milioni di tonnellate).

Il mais, dunque, è una coltura importante e un sistema biologico modello. Con il cambiamento climatico globale e l'aumento calorico e le richieste delle materie prime, lo sviluppo di maggiori cultivar di mais resistenti a queste variazioni, sarà una grande sfida per gli agricoltori del 21° secolo (Schanable et al. 2009).

Le biotecnologie agrarie assumono quindi un ruolo fondamentale per la ricerca di nuove cultivar e per il miglioramento di quelle pre-esistenti. Utilizzando l'ingegneria genetica, che è l'insieme di tecnologie che permettono la manipolazione in vitro di molecole di DNA, studia il genoma e ed i suoi meccanismi. Parlando più specificatamente delle piante, il genoma, permette loro di affrontare le condizioni ambientali spesso avverse in maniera differente da una specie all'altra o addirittura da un individuo all'altro.

Il genoma di mais contiene circa due miliardi di basi, con 32.000 geni raccolti in 10 cromosomi. Questi sono strutturalmente diversi e hanno subito cambiamenti dinamici nella composizione della cromatina. La decifrazione del genoma del mais è stata complessa, l'85

% dei segmenti di DNA è ripetuto più volte e una parte rilevante di esso è costituito da trasposoni, ossia elementi genetici mobili che possono spostarsi in una nuova posizione sullo stesso cromosoma o possono passare a cromosomi diversi, causando mutazioni e l'inattivazione di geni in cui si inseriscono. È per questo motivo che la decifrazione del genoma del mais è stata più complessa di quella di gran parte delle specie (Shanable et al. 2009). Inoltre, il mais è il terzo cereale, dopo riso e sorgo, di cui sia stato interamente sequenziato il genoma.

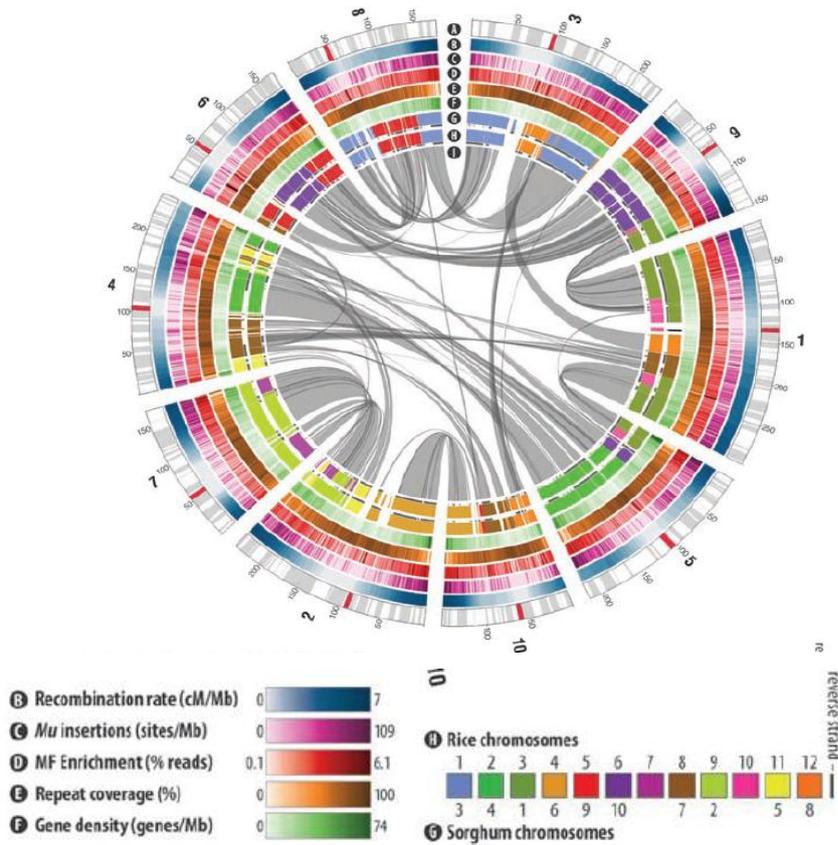


Fig. 1.1 Rappresentazione grafica del genoma di mais B73 (Shanable et al. 2009).

1.2 GENETICA ED EPIGENETICA

La genetica è la scienza che studia i fenomeni dell'ereditarietà e della variabilità biologica. Un gene è l'unità ereditaria fisica e funzionale responsabile del trasferimento dell'informazione genetica da una generazione alla successiva e della manifestazione fenotipica dei caratteri. Può essere definito, inoltre, come una unità costituita da un frammento della molecola del DNA, che presiede alla sintesi di una particolare catena polipeptidica. Negli eucarioti il DNA è contenuto nel nucleo e la sintesi proteica ha luogo nei ribosomi, il processo viene veicolato dall'RNA, che porta l'informazione genetica dal nucleo al citoplasma. La relazione tra DNA, RNA e proteine costituisce l'essenza del dogma centrale della biologia molecolare: le molecole di RNA si formano sullo stampo del DNA (trascrizione) e l'RNA a sua volta funge da stampo per la sintesi delle proteine (traduzione) (vedi fig. 1.2) (Barcaccia e Falcinelli, 2008).

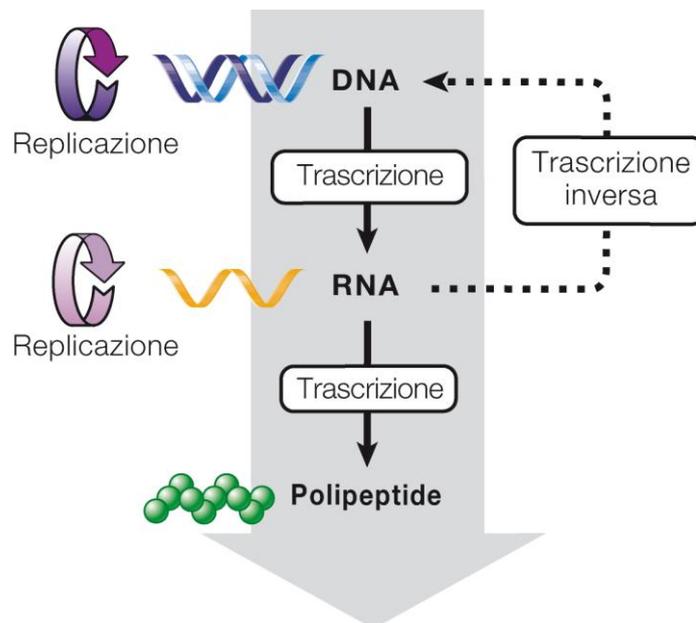


Fig. 1.2 Dogma centrale della biologia molecolare.

Un gene può esistere in forme alternative, tali sono definiti alleli. Gli alleli di un gene possono codificare prodotti quantitativamente o qualitativamente diversi. Ogni individuo eredita due alleli per carattere, uno da ciascuno genitori. Per uno stesso gene gli organismi possono essere omozigoti se i due alleli sono geneticamente identici o eterozigoti se i due alleli sono diversi.

Il DNA è organizzato nel nucleo in una struttura nucleoproteica nota come "cromatina". La cromatina è costituita da DNA e proteine, dette istoni, e ha lo scopo di rendere attiva o inattiva la trascrizione del DNA.

Il genoma compattato nella cromatina, forma una barriera fisica per la trascrizione del gene. Pertanto, i meccanismi che alterano la struttura della cromatina svolgono un ruolo essenziale nella regolazione genica. Quando i cambiamenti degli stati della cromatina sono ereditati attraverso la divisione cellulare meiotica o mitotica, i meccanismi responsabili di questi cambiamenti sono definiti cambiamenti epigenetici (Lauria and Rossi, 2011). Il termine epigenetica fu coniato da Conrad Waddington nel 1942, definendolo come il fattore intermedio tra genotipo e fenotipo. L'epigenetica studia quindi il rimodellamento della cromatina e di conseguenza l'accessibilità alla doppia elica di DNA da parte dei fattori di trascrizione. Il rimodellamento può influenzare l'espressione genica di qualsiasi organismo, con effetti che possono essere ereditari durante le divisioni cellulari e persino attraverso le generazioni (Grant-Downton and Dickinson, 2005). La ricerca epigenetica è all'avanguardia della biologia vegetale e genetica molecolare. Studi su piante superiori sottolineano il ruolo significativo svolto dall'epigenetica sia sullo sviluppo della pianta e sia sulla risposta allo stress (Ming Chen et al. 2010).

Nello specifico, è importante sottolineare il fatto che la cromatina può essere divisa in: eucromatina, poco condensata che permette l'accesso alla Pol II per iniziare la trascrizione, ed eterocromatina, al contrario molto condensata che non permette l'accesso della Pol II (vedi fig. 1.3).

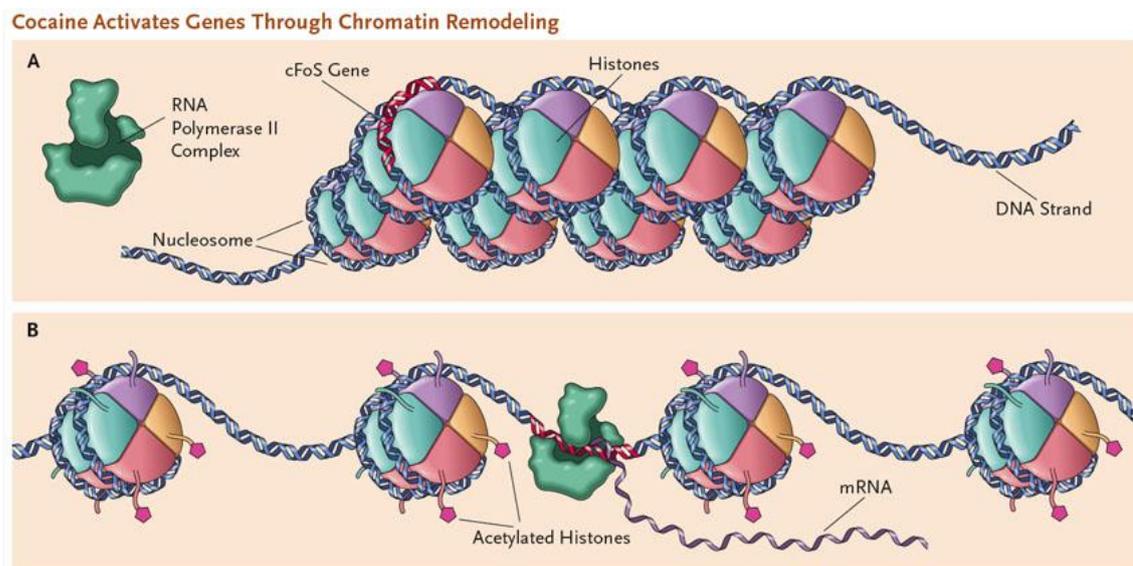


Fig. 1.3 Rappresentazione dell'eterocromatina (figura in alto) e dell'eucromatina (figura in basso), come si può notare il complesso polimerasi è in attiva trascrizione nell'eucromatina con facile accessibilità, mentre nell'eterocromatina non riesce a legarsi ad alcun filamento a causa dell'alta compattazione del dna.

A seconda del ciclo vitale della cellula, l'eucromatina può essere rimodellata e resa più compatta e viceversa, tale fenomeno è detto "rimodellamento della cromatina". Tali processi

possono interferire con la trascrizione, renderla cioè più o meno accessibile al complesso della polimerasi. Inoltre, tale processo può essere indotto da determinati fattori biotici/abiotici. Enzimi chiamati *chromatin remodeling ATPase* sono i responsabili del rimodellamento della cromatina, utilizzano l'ATP per catalizzare le modifiche a carico della stessa (Mingh Chen et al., 2010).

Le modifiche epigenetiche possono dare origine a dei veri e propri "marchi epigenetici". Sono marchi epigenetici ad esempio: le modifiche post-traduzionali a carico degli istoni e la metilazione del DNA. Questi 'marchi' sono alla base dei meccanismi di controllo nella regolazione dell'epoca di fioritura, il controllo della trasposizione dei trasposoni, l'imprinting e le paramutazioni

Nel contesto epigenetico non si parla di alleli ma di epialleli, cioè di geni che occupano specifici locus in un determinato contesto cromatinico, se e solo se tale contesto rimane invariato nella mitosi e nella meiosi. Sono strutture ereditabili. Altrimenti si avrà un resetting a livello della divisione mitotica/meiotica che porterà alla perdita delle modifiche epigenetiche di quel locus.

Lo studio di un preciso stato della cromatina viene effettuato tramite la tecnica *ChIP (Chromatin Immunoprecipitation)* (Haring et al. 2007). È una tecnica sperimentale impiegata nell'analisi delle interazioni tra DNA e proteine e quindi usata per lo studio delle alterazioni epigenetiche degli istoni. Alla base di questa tecnica vi è la possibilità di precipitare la cromatina utilizzando anticorpi che riconoscono gli istoni modificati.

1.2.1 LA STRUTTURA DELLA CROMATINA

Per poter descrivere in modo accurato e preciso le varie modifiche istoniche, è necessario conoscere la cromatina in tutti i suoi componenti. La sua organizzazione è essenziale per la cellula, in quanto rende una specifica sequenza di DNA accessibile o meno alla trascrizione, e quindi al complesso della polimerasi. Negli eucarioti è strutturalmente definita come l'insieme di DNA e proteine; quest'ultime hanno l'accessibilità diretta sul DNA, in quanto sono legate ad esso tramite precise interazioni.

Nello specifico, la cromatina è formata da diversi livelli di organizzazione.

Il primo livello di organizzazione è rappresentato dai nucleosomi (10nm). I nucleosomi contengono circa 200bp di DNA associate ad un ottamero istonico formato da due copie di proteine basiche, dette istoni. In particolare nel nucleosoma gli istoni vengono definiti istoni del core e sono H2A, H2B, H3 e H4. La loro associazione è schematizzata nella figura 1.4.

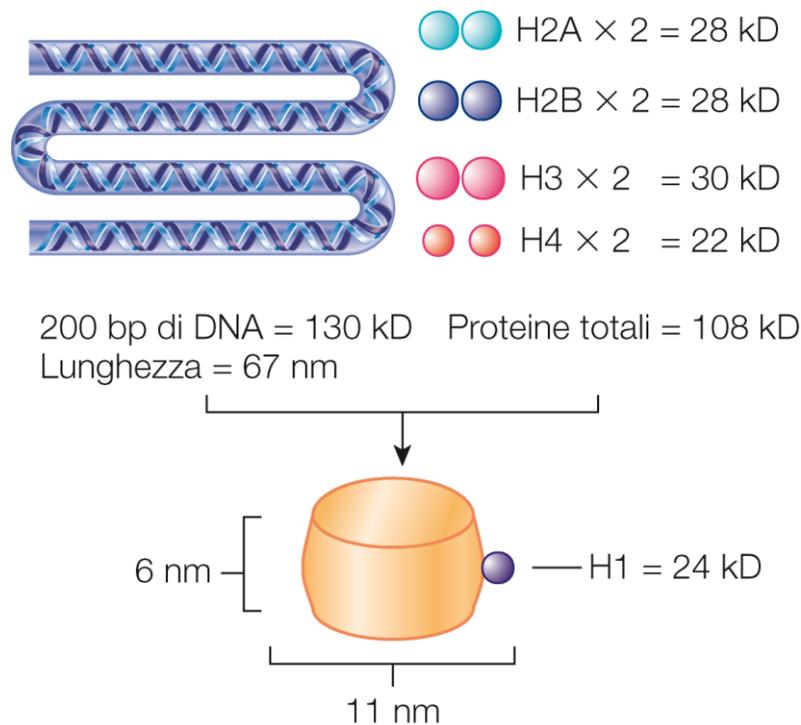


Fig. 1.4 Rappresentazione grafica del nucleosoma e degli istoni del core.

Il nucleosoma è costituito approssimativamente da eguali masse di DNA e istoni (compreso H1).

La massa prevista per il nucleosoma è di 262 kD (Il gene X, Zanichelli).

Una notevole importanza assumono le code istoniche, regioni flessibili ammino- o carbossi-terminali dei core istonici, che si estendono oltre la superficie del nucleosoma; suscettibili a modifiche covalenti. Le proteine istoniche sono altamente conservate e fortemente basiche, ciò è dovuto alla presenza dei residui amminoacidici di *Arg* e *Lys*.

Usando una nucleasi micrococcica è possibile ridurre la lunghezza del DNA a 146bp attorno al nucleosoma (la lunghezza minima affinché la struttura sia stabile); il DNA compie 1 giro e 2/3 attorno al nucleosoma.

Una stringa continua di nucleosomi formano la cosiddetta “fibra da 10nm” o “collana di perle”. Tuttavia per avere un ulteriore impacchettamento del dna, interviene l’istone H1, il quale si lega al DNA del core e con 20bp di uno dei due DNA linker (tratto di DNA non nucleosomico). In tal modo si aumenta la quantità di DNA avvolto al core istonico favorendo una struttura a zig-zag della cromatina.

Un ulteriore livello di organizzazione è dato dalla “fibra da 30 nm”. L’istone H1, le code degli istoni e l’aumento della forza ionica promuovono questo impacchettamento, in cui si trovano 6 nucleosomi/giro. Vi sono due possibili modelli: a solenoide o a zig-zag.

L’organizzazione della fibra di 30 nm è suddivisa in domini ad ansa (300nm), ancorati ad una impalcatura di proteine non-istoniche. (Nella fig. 1.5 vengono rappresentati in successione i livelli di organizzazione appena descritti).

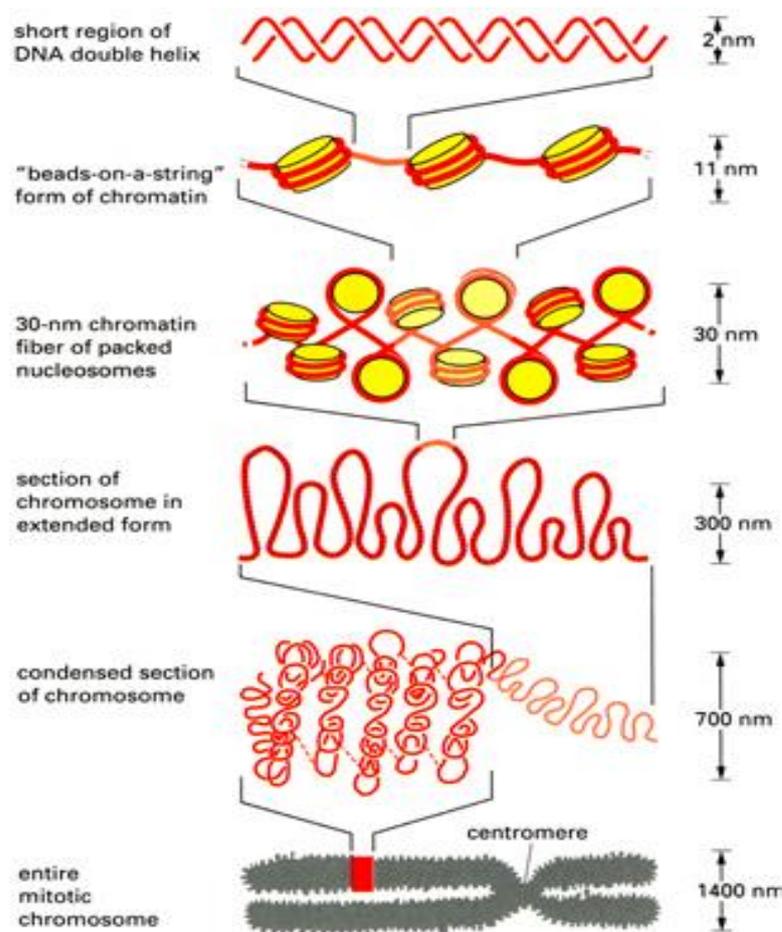


Fig. 1.5 La successione dei livelli di organizzazione nella cromatina.

Il livello ad ansa è chiamato euromatina, cioè lo stato di condensazione in cui si ha attiva trascrizione o presenta geni normalmente espressi. L'eterocromatina è un ulteriore stato di condensazione che si ritrova nei centromeri e alle estremità telomeriche, zone del cromosoma in cui si hanno livelli molto elevati di compattazione.

Il livello con il più alto tasso di compattazione lo si ha nel cromosoma metafisico, quello cioè allacciato al fuso mitotico durante la metafase della mitosi.

1.2.2 LE MODIFICHE ISTONICHE E LA METILAZIONE DEL DNA

Le più importanti modifiche epigenetiche hanno come bersaglio le code istoniche. Attraverso modifiche covalenti, quali acetilazione, metilazione, ubiquitinazione e fosforilazione, è possibile cambiare la conformazione ai nucleosomi, in modo da rendere più o meno accessibile il DNA.

La modificazione degli istoni è associata a cambiamenti strutturali che avvengono nella cromatina al momento della replicazione e della trascrizione; avviene a livello di specifici istoni in specifiche posizioni (residui).

L'acetilazione degli istoni generalmente è associata all'attivazione trascrizionale; dopo aver aggiunto un gruppo acetile a specifici residui di *Lys* di particolari istoni, queste perdono l'interazione con il DNA del nucleosoma. Viene persa la carica positiva e di conseguenza le code perdono affinità con il DNA, e la cromatina risulta meno compatta. Viceversa la deacetilazione delle code si traduce con l'aumento dell'affinità di quest'ultime con il DNA, portando la cromatina ad un livello di compattazione maggiore.

L'acetilazione degli istoni è un processo reversibile e lo stato di acetilazione all'interno della cellula è in flusso costante che riflette l'equilibrio tra l'attività degli enzimi acetilasi e delle deacetilasi istoniche. Possono agire sia a monte dei fattori di trascrizione (modifiche post-trascrizionali) che in seguito alla trascrizione (modifiche post-traduzionali).

La vita media di un gruppo acetile è compresa tra pochi minuti e poche ore, questo meccanismo di rimodellamento della cromatina è particolarmente adatto alla regolazione genica nelle piante nelle quali il destino cellulare è flessibile e i profili di espressione debbono essere modificati di conseguenza.

Nelle cellule vegetali vi sono due famiglie enzimatiche che effettuano tali modifiche:

- HATs, famiglia di acetilasi;
- HDAC, famiglia di deacetilasi.

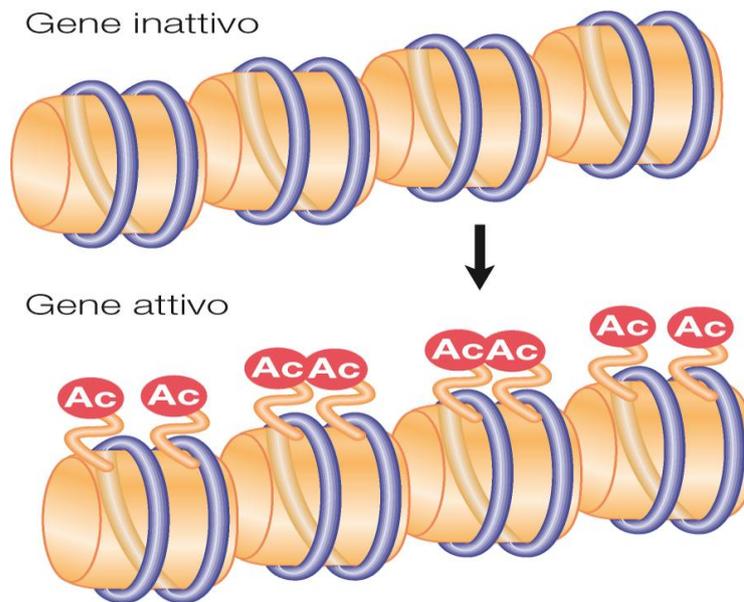


Fig. 1.6 l'acetilazione associata all'attivazione genica avviene modificando direttamente siti specifici di istoni che sono già assemblati a nucleosomi (Gene X, Zanichelli).

Se si altera il grado di acetilazione/deacetilazione si ha una variazione del grado di compattazione della cromatina e delle altre modifiche istoniche. Le modifiche delle code istoniche hanno quindi un'azione correlata, in quanto se si modificano i loro patterns generali a sua volta si hanno delle alterazioni a carico di altre modifiche. Questo concetto sta alla base del "codice istonico" (Turner, 1990), il quale afferma che sopra il codice genetico esista un codice epigenetico, dato da tutte le modifiche delle code istoniche.

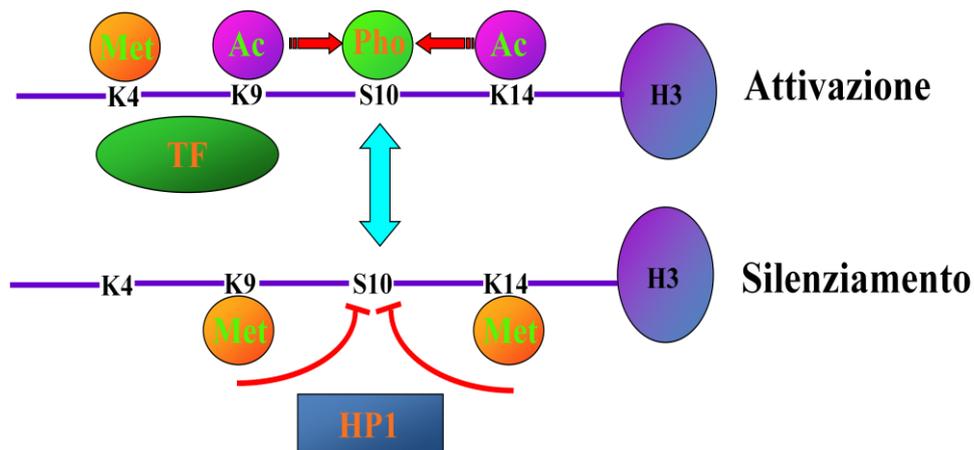


Fig. 1.7 Gli enzimi che modificano gli istoni "scrivono" il codice: specifiche combinazioni di modifiche istoniche.

Come si nota dalla fig. 1.7, le modifiche post-traduzionali a carico di residui aminoacidici delle proteine istoniche giocano un ruolo chiave nella regolazione e nella transizione

eterocromatina-eucromatina; come si può vedere sono ad esempio la metilazione della lisina in posizione 4 dell'istone H3 (H3K4me3), l'acetilazione dell'istone H3, e fosforilazione della serina in posizione 10 dell'istone H3 (H3S10ph), l'acetilazione della lisina in posizione 9 dell'istone H3 (H3K9ac) e la metilazione della lisina 27 dell'istone H3 (H3K27me3).

Un'altra modifica che può influenzare un determinato *status* cromatinico è la metilazione, in quanto agisce direttamente sul DNA aggiungendo un gruppo metile (-CH₃) al 5' delle citosine, formando una 5-metilcitosina.

Le sequenze di DNA fortemente metilate costituiscono generalmente zone di eterocromatina, mentre le sequenze non metilate sono associate all'eucromatina ed a intensa attività trascrizionale; queste modifiche possono essere ereditate anche dopo mitosi e meiosi.

Normalmente la metilazione è simmetrica e riguarda entrambe le semi-eliche; tuttavia si osserva anche metilazione asimmetrica operata da enzimi in grado di metilare "de novo", spesso associata ad eventi di silenziamento genico.

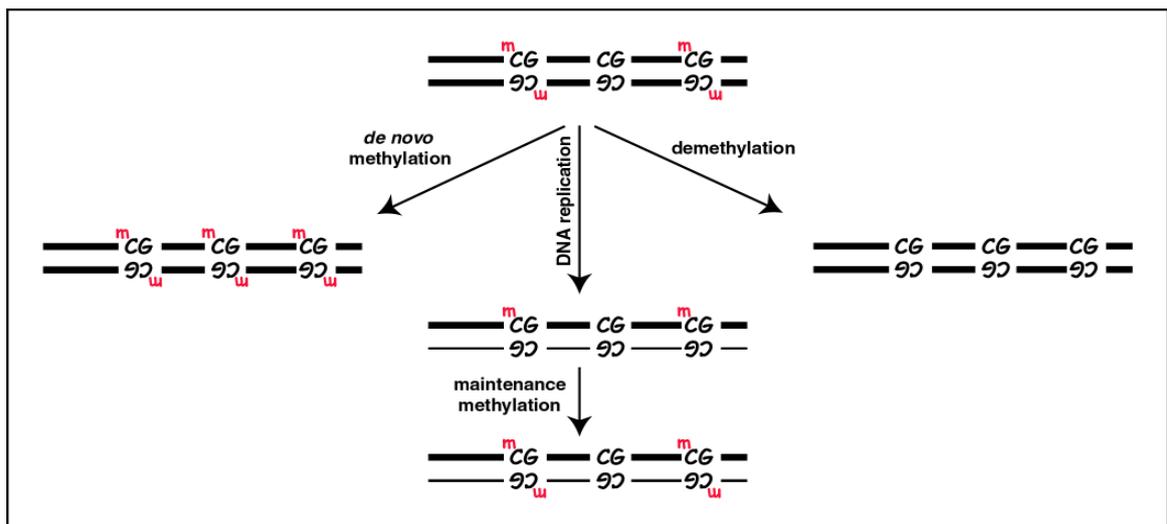


Fig. 1.8 Rappresentazione metilazione de novo, del mantenimento della metilazione e della demetilazione (ad opera di enzimi che rimuovono la citosina metilata aggiungendo citosina demetilata). Un filamento non può mai essere metilato se l'altro non è metilato.

Le piante sono gli organismi con il genoma maggiormente metilato (circa 30%).

Una caratteristica peculiare delle piante è quella di possedere significativi livelli di metilazione ai siti CG, CNG e CHH, ad opera di enzimi metiltransferasi.

Arabidopsis ha almeno 10 geni che codificano per le DNA metiltransferasi; sono responsabili del mantenimento dei patterns di metilazione, tuttavia non metilano il DNA de novo.

In Arabidopsis le metiltransferasi possono essere racchiuse in:

- CMT3 cromometilasi, agiscono sulla cromatina e metilano le sequenze CNG; possono metilare de novo;

- MET1 metiltransferasi, metilano le sequenze CG, mantengono i patterns di metilazione durante le generazioni;
- DRM1, DRM2 domini riarrangiati metiltransferasi, metilano le sequenze CHH; hanno la capacità di metilare de novo. È stato dimostrato che la regione promotore del gene DRM2 è principalmente metilato al residuo citosina interno in siti CCGG mentre la parte 3' estremità prossimale della regione codificante del gene è altamente metilato. Il gene DRM2 è risultato essere anche metilato a livello dei residui di adenina in alcune sequenze GATC (Ashapkin W et al., 2001).

La metilazione inoltre può avere come conseguenza il silenziamento dei trasposoni non solo nelle zone centromeriche e telomeriche.

Inoltre alcuni fattori di trascrizione non riescono a legare il DNA, se il sito di attacco è metilato; in questo modo si metilano dei promotori criptici per evitare la trascrizione. Studi in *Arabidopsis* e in endosperma di riso hanno dimostrato che ipometilazioni nella regione a monte del sito d'inizio della trascrizione (TSS) sono correlate ad un'espressione sito specifica dei geni dell'endosperma (Lauria and Rossi, 2011).

1.3 GLI ENZIMI RPD3/HDA1

L'istone acetiltransferasi, HDACs, e altri fattori coinvolti nella modulazione della struttura della cromatina sono altamente conservati negli eucarioti, comprese le piante (Loidl, 2004).

Gli enzimi che catalizzano l'acetilazione e la deacetilazione degli istoni contribuiscono alla modulazione della struttura della cromatina, svolgendo così un ruolo importante nella regolazione genica e dell'attività del genoma (Rossi et al., 2007).

Il processo di acetilazione/deacetilazione non è stabile, si può definire reversibile. L'acetilazione può essere cancellata dagli enzimi deacetilasi (*HDA*); rimuovendo l'acetilazione dalle code istoniche, causano il silenziamento di determinate sequenze, rafforzando il legame DNA-istone.

HDAC sono una classe importante di regolatori trascrizionali globali che svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo delle piante, la difesa e l'adattamento (Hollender 2008).

Nei genomi di differenti specie di piante sono state identificate diverse funzioni delle deacetilasi istoniche (HDACs) e sono state classificate in tre distinte famiglie:

- I membri della famiglia *HDA* sono legati a RPD3/HDA1;
- I membri della famiglia di *SRT* sono legati a SIR2 del lievito;
- la famiglia degli enzimi *HD2* pianta-specifici (Pandley et al., 2002), non correlate ad altre classi.

La famiglia RPD3/HDA1 è stata oggetto di studio da Alisung e i suoi collaboratori, per cercare di dare una classificazione alle deacetilasi istoniche che la formano. E' stato creato un albero filogenetico in cui si potessero osservare le relazioni tra le diverse deacetilasi di sei differenti piante: *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Pinus taeda*, *Oryza sativa*, *Zea mays* e *Physcomitrella patens*.

Oltre ad analizzare le deacetilasi istoniche filogeneticamente per determinarne gli orologi (vedi figura 1.9), sono stati eseguiti studi sui siti di localizzazione di ciascun gene, sui segnali esportazione e localizzazione nucleare. Si è visto che gli enzimi della famiglia RPD3/HDA1 sono espressi in tutte le parti della pianta e nei vari stadi di sviluppo.

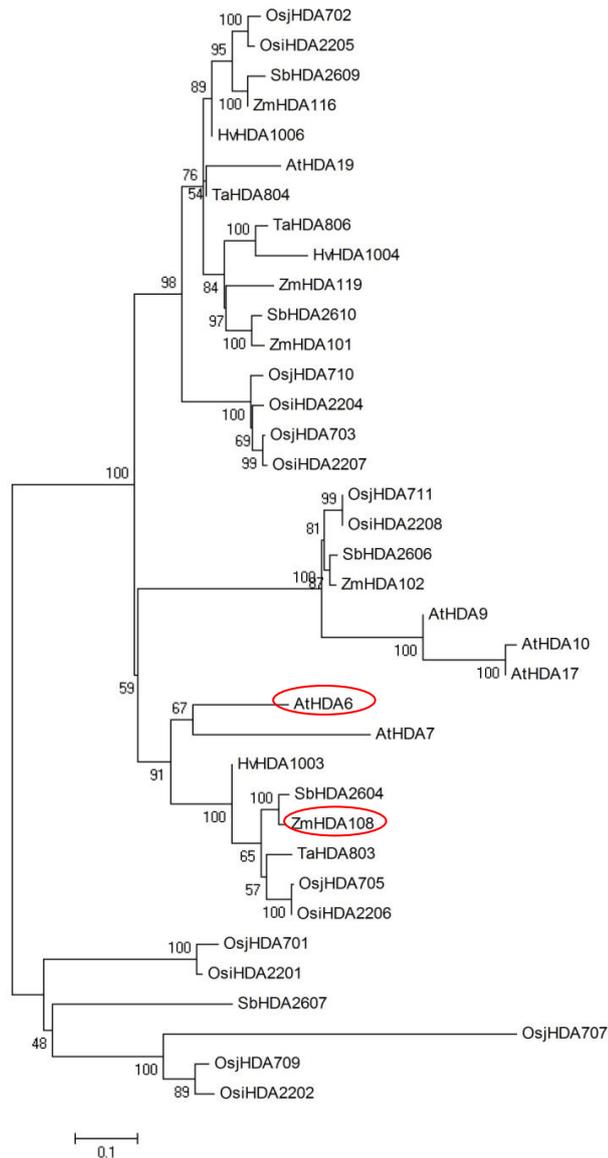


Fig. 1.9 Albero filogenetico degli istoni deacetilasi studiati da Alisung (Alisung et al., 2009).

La figura 1.9 mostra le relazioni tra le deacetilasi istoniche delle diverse tipologie di piante; in particolare sono state evidenziate due deacetilasi di due piante differenti *Arabidopsis Thaliana* e *Zea mays*, in cui *AtHDA106* rappresenta il gene ortologo di *ZmHDA108*.

HDA6 di *Arabidopsis* ha effetti su pathway diversi; è coinvolto nella down regolazione della via del jasmonato, nella senescenza, nella regolazione della fioritura, deacetilando la cromatina a livello del locus *FLC*, ed è responsabile dell'inibizione della trascrizione dei geni coinvolti nell'entrata in fioritura (Wu et al., 2008).

Wu e i suoi collaboratori hanno utilizzato dei geni reporter (GUS e GFP) per studiare l'espressione di *HDA6* e la sua distribuzione cellulare. Dai loro studi è emerso che in *Arabidopsis*, la deacetilasi istonica è espressa a livello di cotiledoni ed ipocotili nelle plantule

giovani, mentre negli individui adulti si concentra nelle foglie mature e nel fusto, oltre che nei fiori, nei semi invece non si ha espressione.

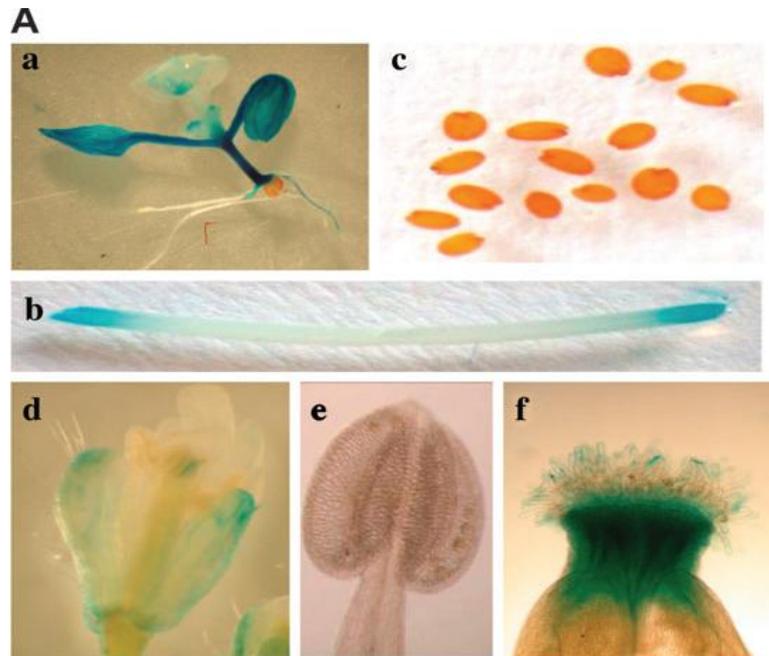


Fig. 1.12 Fotografie di (a) plantule, (b) stelo, (c) semi, (d) fiori, (e) stame, (f) stigma in cui è stato utilizzato il gene reporter GUS (Wu et al., 2008)

Il mutante *hda108*

Il gene *ZmHDA108*, la cui struttura introni-esoni è rappresentata in fig 1.10, codifica una deacetilasi istonica, ovvero un enzima responsabile della rimozione dei gruppi acetile dalle code N-terminali delle proteine istoniche. Questa modifica istonica, assieme ad altre, come la metilazione, la fosforilazione e l'ubiquitinazione giocano un ruolo chiave nel controllo dell'espressione genica. Attraverso il rimodellamento dinamico della cromatina è infatti possibile modulare l'espressione dei geni, contribuendo alla transizione eterocromatina-eucromatina e viceversa.

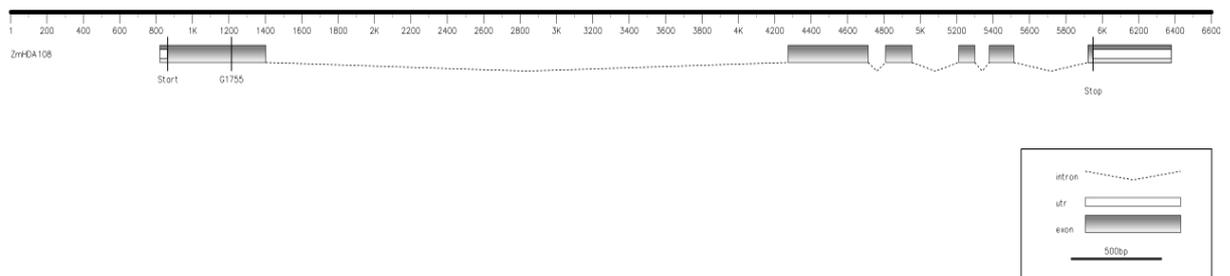


Fig.1.10 Rappresentazione della lunghezza e delle sequenze codificanti di *ZmHDA108*.

La mutagenesi può essere ottenuta in vari modi, tuttavia il mutante *hda108* è stato ottenuto tramite mutagenesi inserzionale mediata da trasposoni (in questo caso il trasposone Mu), sequenze di DNA capaci di inserire se stessi o una copia in una nuova posizione nel genoma. In particolare il trasposone Mu, identificato nel 1978, codifica per l'enzima *trasposasi* che riconosce l'elemento Mu a livello delle due estremità terminali ripetute ed invertite (TIR) di circa 220bp. Tali elementi trasponibili si inseriscono prevalentemente a livello di sequenze codificanti.

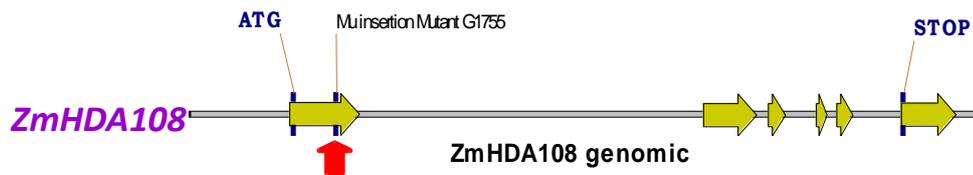


Fig. 1.11 L'inserimento del trasposone Mu (indicato dalla freccia rossa) all'interno di *HDA108*.

Poiché la mutagenesi è un fenomeno che può portare ad un cambiamento nella sequenza nucleotidica del DNA, può essere sfruttata dagli studiosi per creare nuova variabilità, in modo controllato, permettendo così anche di comprendere al meglio le dinamiche dei meccanismi genetici ed epigenetici, alla base dell'attività del genoma.

2 SCOPO DELLA TESI

Questa tesi è inserita in un progetto di ricerca che prevede lo studio di alcuni meccanismi epigenetici in risposta a determinate condizioni ambientali prendendo come riferimento la specie *Zea mays*. In particolare, il mio lavoro ha l'obiettivo di definire l'analisi di espressione del gene *HDA108* in piante WT e piante mutanti per il gene stesso, confrontando i risultati ottenuti con l'analisi di espressione di quattro geni della stessa famiglia (*HDA101*, *HDA119*, *HDA116*, *HDA102*).

Per il gene *hda108* ho seguito sostanzialmente tre popolazioni di linee mutanti definite come BC5S1, BC5 σ 2 e BC5S2. Tali popolazioni sono state ottenute in seguito a cinque cicli di introgressioni tra la linea mutante parentale e la B73. Successivamente è stata eseguita una autofecondazione finale tra individui eterozigoti per ottenere *hda108* BC5S1. Da quest'ultima si è ottenuto la popolazione *hda108* BC5S2, in seguito ad autofecondazione tra piante omozigoti, e una popolazione BC5 σ 2 in seguito all'incrocio tra piante omozigoti ed eterozigoti.

Inizialmente, il mio lavoro si è concentrato sulla genotipizzazione delle varie linee mutanti distinguendo le piante omozigoti, eterozigoti e WT. In seguito sono state raccolte e misurate diverse componenti della pianta (11^A foglia, tassel, ear e area meristemica), in modo da valutare fenotipicamente le differenze tra le diverse linee. Con queste analisi fenotipiche, ci si è accorti che la linea mutante BC5S2 non produceva polline e le ear non erano fertili; non producendo seme ci si è fermati a questo tipo di analisi (vedi fig.4.6).

E' stata svolta l'analisi di espressione, sulle linee BC5S1, quantificando la presenza e la quantità di trascritto del gene *HDA108*. La stessa analisi di espressione è stata svolta su altre quattro deacetilasi istoniche appartenenti alla stessa famiglia di *HDA108*, per capire se vi sono altre deacetilasi che rispondono meglio alla mancanza del gene silenziato a causa della mutazione.

Inoltre, un'analisi di espressione è stata svolta in alcuni putativi geni target per analizzarne l'espressione nel mutante. I geni target analizzati sono stati i seguenti: *ABPH*, *Lg3*, *Rs2*, *Lg1* e *Td1*.

3 MATERIALI E METODI

3.1 ESTRAZIONE, PURIFICAZIONE DNA GENOMICO

Protocollo "maize genomic DNA miniprep": si preleva dalla pianta 1/2/3 dischi fogliari e si mettono in una eppendorf da 1,5 ml, successivamente si mantengono a -80°C.

- Mettere le provette in azoto liquido, con un pestellino spingere delicatamente il materiale sul fondo della eppendorf, versare poco azoto liquido e pestellare energicamente fino a ottenere polvere. In seguito porre le provette in un recipiente con azoto liquido;
- Aggiungere 500µl di Extraction buffer (formato da NaCl 0.2 M, EDTA 25mM, Tris ph 7.5 50mM e SDS 0.5%), vortexare per almeno 2 minuti;
- Incubare a 65°C per 5 minuti, vortexare per almeno 2 minuti e rincubare per 5 minuti;
- Aggiungere 500µl di fenolo/cloroformio, vortexare per almeno 2 minuti e centrifugare per 10 minuti; (passaggio sotto cappa)
- Trasferire 400µl di surnatante in una nuova eppendorf; (passaggio sotto cappa)
- Aggiungere 400µl di isopropanolo e invertire qualche volta;
- Centrifugare 10 minuti, rimuovere il surnatante facendo attenzione a non perdere il pellet;
- Aggiungere 1ml di Et-OH 70%; (con questo passaggio è possibile mettere i campioni a -20°C per un tempo ∞ o continuare il protocollo);
- Vortexare per almeno 1 minuto e centrifugare per 10 minuti;
- Rovesciare con attenzione il surnatante, lasciare evaporare tutto l'Et-OH 70% ed in seguito aggiungere 30-40 µl di H₂O DEPC.

Una volta estratto il DNA genomico da ciascuna pianta si è proceduto con la verifica della sua qualità tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio. Questa fase aveva lo scopo sia di verificare la buona riuscita del protocollo di estrazione che di stimare la concentrazione del DNA estratto.

Successivamente, tramite la reazione di PCR si è proceduto con l'analisi del genotipo di ciascuna pianta presa in esame: con l'utilizzo di specifiche coppie di primers è stato possibile definire quali piante appartenenti alle due popolazioni BC5S1 e BC5S2 fossero WT, eterozigoti oppure omozigoti per la mutazione a carico del gene oggetto di studio.

3.1.1 Corsa elettroforetica su gel di agarosio

L'elettroforesi è una tecnica di biologia molecolare che sfrutta la polarità delle molecole in esame per poterle distinguere in base al peso, e quindi stimarne poi quantità e qualità.

Le molecole sono poste in una soluzione salina e sottoposte ad una corrente elettrica dal voltaggio variabile. In questa situazione le molecole tenderanno a migrare verso l'elettrodo dotato di carica opposta alla propria, il DNA essendo dotato di carica elettrica negativa, al passaggio di corrente migrerà verso il catodo.

Le molecole di dimensioni maggiori tenderanno a migrare più lentamente rispetto a quelle più piccole.

Utilizzando marker a peso molecolare e concentrazione nota (solitamente si utilizza 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.

Preparazione gel di agarosio (per la preparazione di un gel alla concentrazione di 1% di agarosio):

- 0,5g agarosio in polvere
- 50ml TAE 1X (buffer salino)
- 5µl Syber Safe

Il composto scaldato in microonde, viene riversato su appositi contenitori in modo da farlo gelificare (usando dei "pettini" è possibile creare dei piccoli fori dove verrà caricato il DNA).

Dopo circa una mezz'oretta il gel è pronto, e può essere 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 100 V ogni 10 cm di gel.

3.1.2 PCR (Polimerase Chain Reaction, "reazione a catena della polimerasi")

La PCR è una tecnica di biologia molecolare che permette di amplificare un frammento di DNA sfruttando l'attività enzimatica della DNA polimerasi.

I componenti della PCR e le loro funzioni:

Componente	Concentrazione nel Mix	Volume (50 µl)
Buffer 10X (Invitrogen)	1X	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	1,5/2,5 mM	3/5 µL
Primer Fw 10µM	0,4µM	2 µL
Primer Rev 10µM	0,4µM	2 µL
dNTPs mix 10mM	200 µM	1 µL

DNA stampo	50/100ng	Variabile
Taq polimerasi (5U/μl)	2,5 unità	0,5 μL
H2O sterile		A volume

MgCl₂/MgSO₄ : lo ione magnesio è molto importante all'interno della PCR per diversi motivi:

- è un cofattore della DNA polimerasi e ne stimola l'attività;
- influenza positivamente la specificità dei primers;
- forma complessi solubili con i dNTPs facilitandone l'incorporazione.

Un eccesso di questo elemento può dare problemi di resa e specificità; la concentrazione ideale deve quindi essere valutata in funzione dell'enzima, del template e dei primers.

dNTPs: ovvero Desossinucleotidi trifosfati (in forma attiva per l'enzima) verranno incorporati dall'enzima nel filamento di nuova sintesi.

Template-stampo: può essere di diversa natura, DNA singolo o doppio filamento, ibridi di DNA/RNA o colonie batteriche (PCR-colony); un fattore molto importante ai fini della buona riuscita è la pulizia.

Primers: sono inneschi oligonucleotidici fiancheggiati le regioni target (che dovranno cioè essere amplificate) fungendo da attacco per la DNA polimerasi.

Le combinazioni di primer usati per la genotipizzazione del mutante HDA108 durante i cicli di introgressione, sono le seguenti:

Mutanti <i>hda108</i>	AEN11_F03 (53): AGACTACTACTACGGGCAG	TIR (47): CTTCGTCCATAATGGCAATTATCTC
	AEN11_F02 (49): TGCCGATTGCCTAAACCC	AEN11_R02 (52): TGCTCAACAATCACATGAACC

- La coppia 49-52 discrimina wt/mu (altezza banda 780 bp. ca);
- La coppia 53-47 discrimina omo/etero (altezza banda 300 bp. ca).

DNA polimerasi: la DNA polimerasi usata comunemente deriva dal batterio *Thermus aquaticus*. Grazie ad essa, si possono avere una serie di vantaggi per la buona riuscita della PCR: non viene degradata durante la prima fase di denaturazione del DNA, in cui si deve lavorare a temperature di circa 95°C, ha bassa frequenza di mutazione ed ha la capacità di aggiungere un'Adenina al termine della polimerizzazione.

Oltre alla *Taq polimerasi*, esistono in commercio enzimi ancora più sofisticati (*PfuPol*, *PfxPol*, ecc..) dotati di attività di proofreading, cioè la capacità di procedere in senso opposto alla polimerizzazione per sostituire eventuali basi errate, quelle che non sono complementari allo stampo.

Additivi per PCR: hanno la funzione di favorire le reazioni di PCR (destabilizzando i doppi filamenti, facilitando quindi la denaturazione e aumentando la specificità dei legami con i primers) ed incrementare l'attività enzimatica. Durante le PCR eseguite nel nostro laboratorio è stato utilizzato l'additivo *BioStab PCR Optimizer* Sigma®.

Esempi di parametri impostati durante una reazione di PCR:

- | | | |
|--------------------|---|--------------------------------|
| 1) 95°C per 5' | } | Cicli ripetuti per 35-40 volte |
| 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 per ∞ | | |

La PCR è costituita da una successione di 35-40 cicli. Ogni ciclo è determinato dai seguenti 3 steps:

- la doppia elica del DNA viene riscaldata a 94-96°C in modo da separare i filamenti. Questo step è detto denaturazione e serve a rompere i legami H che uniscono le due eliche;
- Dopo la denaturazione del DNA la temperatura diminuisce in modo che si possano attaccare i *primers* al singolo filamento corrispondente. Questo step è detto
- annealing. La temperatura dipende dai primers e solitamente risulta essere 3-5°C sotto la *melting temperature* (45-60°C). Una errata temperatura a questo step fa sì che i *primers* non si leghino o si leghino in modo casuale;
- La DNA-Polimerasi deve sintetizzare il filamento di DNA (allungamento). La temperatura di elongazione è solitamente di 72°C, al fine di massimizzare l'azione della *Taq polimerasi* che determina un allungamento dei *primer* legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA.

In genere non si superano i 50 cicli in quanto ad un certo punto la quota di DNA ottenuto raggiunge un *plateau*; ciò avviene, ad esempio, per carenza degli oligonucleotidi usati come inneschi, per diminuzione dei dNTP o per l'accumulo di prodotti secondari.

3.2 ANALISI DI ESPRESSIONE

3.2.1 RT-PCR o Reverse Transcription PCR

L'enzima trascrittasi inversa (RT) permette di eseguire una PCR partendo da una miscela di RNA messaggeri. Quando si vogliono studiare i geni espressi in una cellula, si estraggono tutti i messaggeri e si utilizza l'enzima RT per ottenere una copia di DNA (cDNA, complementary DNA), il quale può essere usato come stampo, quindi amplificato attraverso una reazione di PCR.

L'enzima retro-trascrittasi necessita di un innesco a cui aggiungere nucleotidi al 3'. Esistono tre categorie di primers possibili:

- *Primer OligodT*, che si lega al polyA presente in tutti i messaggeri maturi, dopo la retrotrascrizione si ottengono i cDNA full length di tutti i messaggeri;
- *Random Primers*, che invece consentono di ottenere diversi frammenti parziali di cDNA a partire da un unico mRNA;
- *Primer reverse* specifico gene specifico, GPS, che dovrebbe consentire la produzione di un unico cDNA, quello di interesse, e non del mix come nei due casi precedenti.

La reazione di retrotrascrizione inizia con la preparazione di un mix di reazione contenente RNA, dNTPs, H₂O e il primer. Il mix è stato incubato a 65°C per 5 minuti allo scopo di denaturare tutte le strutture secondarie dell'RNA. Successivamente per cristallizzare la situazione pongo in ghiaccio per 1 minuto.

COMPONENTE	QUANTITA'
RNA	1µg
dNTPs 10mM	1µl
Primers	500mg
H2O	A volume(13 µl)

Tabella 3.1 Mix di reazione di RT-PCR

Passato il minuto, al campione sono stati aggiunti l'enzima con il suo buffer specifico, il DTT (ditiotreitolo) che ottimizza il lavoro della trascrittasi inversa e un inibitore delle RNAasi (Invitrogen). Il mix così ottenuto è stato incubato per 60 minuti a 50°C. Il campione è stato trasferito a 70°C per 15 min in modo tale da inattivare l'enzima e quindi conservato a -20°C fino al suo utilizzo.

3.2.2 Real time PCR

La real time PCR è un metodo che permette simultaneamente l'amplificazione e la quantificazione del DNA. Ad ogni ciclo di amplificazione il DNA può essere quantificato; i

normali metodi di quantificazione utilizzano fluorofori che si intercalano alla doppia elica del DNA e/o oligonucleotidi modificati detti sonde, che si legano e diventano fluorescenti in presenza di DNA a doppio filamento. Questi marcatori fluorescenti sono la sonda *TaqMan* o il *Sybr Green*.

Per le analisi di espressione dei mutanti *hda* è stato utilizzato il *Sybr Green*. Esso si lega al DNA a doppio filamento, ai dimeri di primers e ai prodotti di amplificazione aspecifici, determinando una forte emissione di fluorescenza proporzionale alla quantità di amplificato; la lettura della fluorescenza avviene in fase di annealing.

La formazione di un prodotto di PCR durante la reazione, porta ad un incremento esponenziale della quantità di prodotti a doppio filamento presenti al momento dei passaggi di riassociazione e di estensione in ogni ciclo. Lo strumento real-time segue la fluorescenza di ciascuna provetta di reazione durante tutti i passaggi dei vari cicli, calcolando la variazione della fluorescenza per ciclo per poi creare una curva di amplificazione sigmoidale.

Nei cicli finali, i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi. Il punto sulla curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente è chiamato il *ciclo soglia* (valore di C_t).

Il diagramma di C_t su DNA stampo è lineare, così un confronto dei valori di C_t fra reazioni multiple permette di calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare.

Il prodotto di PCR può essere quantificato generando una curva standard (quantificazione assoluta) o utilizzando un gene interno di riferimento (quantificazione relativa).

Per la quantificazione relativa è necessario amplificare oltre al gene target anche un gene di riferimento (o "housekeeping"). Otterremo quante volte il nostro gene target è più o meno presente nel campione di partenza rispetto al gene "housekeeping". La scelta del gene "housekeeping" è fondamentale, per esempio nello studio dell'espressione genica è necessario scegliere un gene di riferimento ad espressione costante nel tempo.

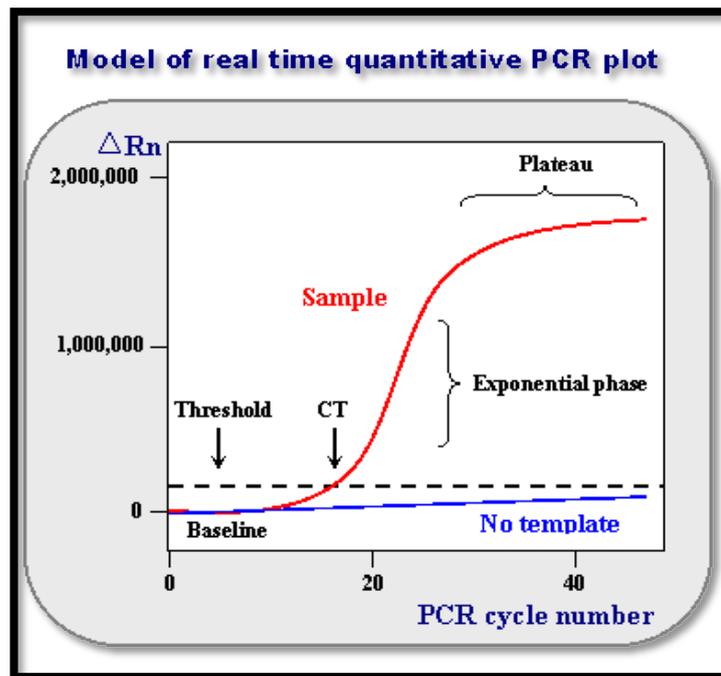


Fig. 3.1 Grafico di una Real Time.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Genotipizzazione e fenotipizzazione

La genotipizzazione delle linee oggetto di studio è stata effettuata con lo scopo di definire se una determinata pianta risulti mutante o meno per il gene *HDA108*, e in caso positivo definire se la mutazione è in condizioni omozigosi o eterozigosi. Questa fase risulta necessaria in quanto le popolazioni di individui a nostra disposizione rappresentavano un *pool* di una popolazione segregante.

Per discriminare tra una pianta mutante e *wild type*, si è effettuata una reazione PCR un primer forward che si lega a monte dell'inserzione del trasposone Mu e un primer reverse disegnato sulle sequenze terminali ripetute ed invertite del trasposone.

Le piante *wild type* non presentano una banda alta come invece avviene per i mutanti, questo perché i primer utilizzati amplificano una regione nel quale è contenuto una parte del trasposone. Se questo è assente, quindi l'individuo è *wild type*, non avremo nessun amplificato.

Una seconda reazione di PCR, e conseguente corsa elettroforetica, è stata essenziale per discriminare tra mutanti omozigoti ed eterozigoti in riferimento sempre alla mutazione a carico del gene oggetto di studio. Per quanto riguarda gli individui omozigoti non abbiamo nessuna amplificazione dalla coppia di primer gene-specifica, a cavallo dell'inserzione. Gli individui omozigoti, perciò, li riconosciamo dall'assenza della banda. Nel caso invece di individui eterozigoti possiamo osservare la presenza della banda all'altezza attesa (risultato analogo osservato in individui WT) in quanto in queste piante solo un allele presenta la mutazione mentre l'altro risulta WT.

In figura 4.1 è rappresentato un esempio di corsa elettroforetica su 24 campioni di *hda108* BC5S1 seminata in autunno 2013. Come vediamo per ogni campione sono state eseguite due PCR, in modo da discriminare le piante mutanti dai WT, e successivamente se omozigoti ed eterozigoti.

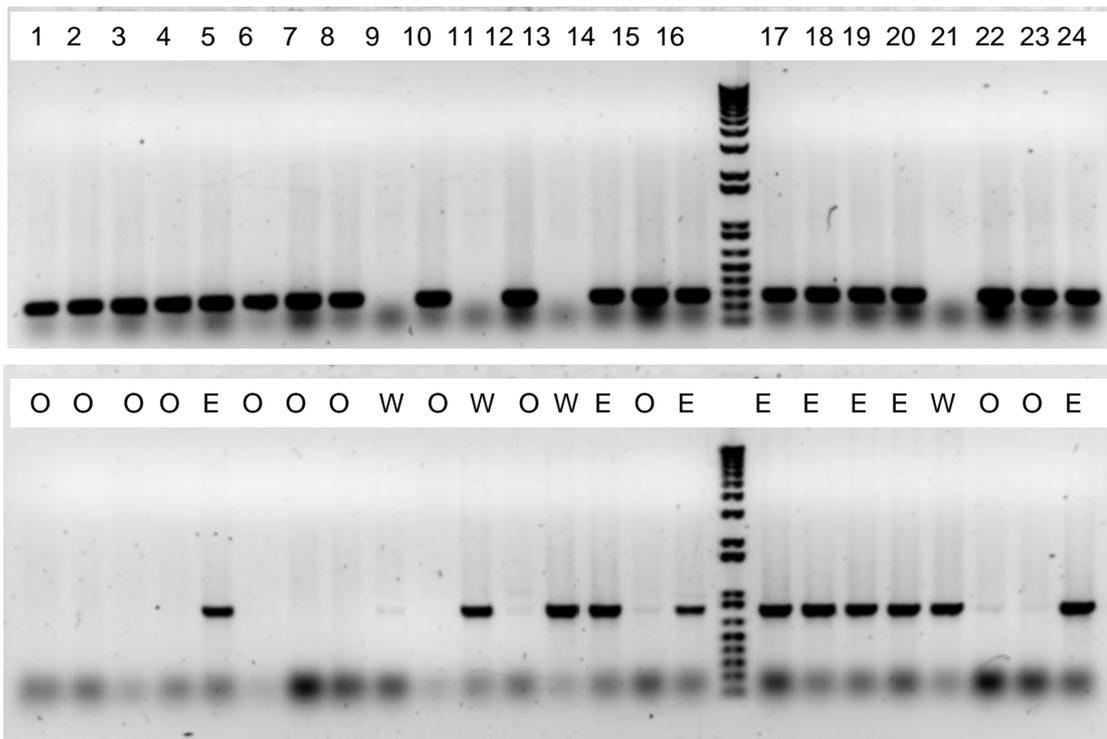


Fig. 4.1 Corsa su gel di 24 campioni di *hda108* BC5S1. O=omozigote; E=eterozigote; W=wild type

Gli altri campioni genotipati di *hda108* BC5S1 e *hda108* BC5σ2 sono rappresentati nelle seguenti tabelle, suddivisi per la data di semina.

HDA108 BC5S1

Data Semina	N° Semi	Pre-Germinati	Genotipate	wt	E	O	Tot
19/04/2013	40	36	36	4	24	8	36
lug-13	40	40	40	12	17	7	36

HDA108 BC5σ2

Data Semina	N° Semi	Germinati	Genotipate	E	O	Tot
19/04/2013	40	22	22	6	16	22
lug-13	15	15	15	7	8	15

Da come si può notare, sia per *hda108* BC5S1 che per *hda108* BC5σ2 non vi sono dei rapporti costanti tra gli individui; per ogni semina si ottengono rapporti differenti. Nel caso di *hda108* BC5σ2, si ha che dalla genotipizzazione di aprile il rapporto tra eterozigoti e omozigoti si avvicina a 1:3, mentre a luglio si ha rispettivamente un rapporto atteso di 1: 1.

Grazie alla genotipizzazione si sono potute distinguere piante *wild type*, omozigoti ed eterozigoti, rilevando così notevoli differenze fenotipiche tra piante *wild type* e omozigoti.

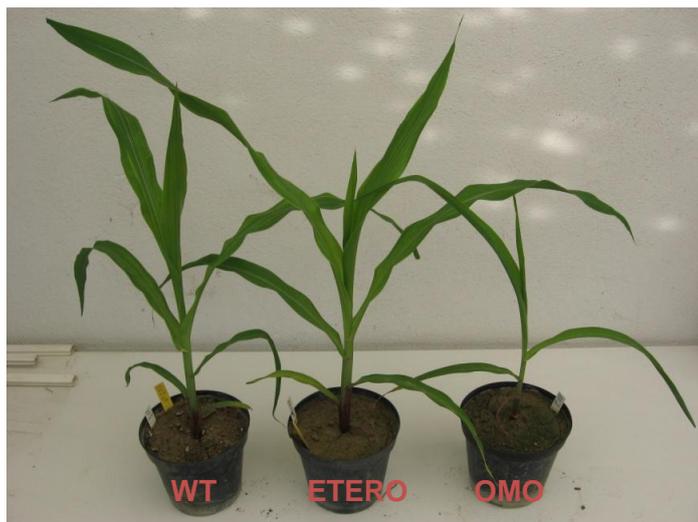


Fig. 4.2 Confronto tra individui WT, eterozigoti ed omozigoti della linea BC5S1, germinate in serra (aprile 2013).

Nella fig. 4.2 si nota una differenza tra omozigote e WT che si traduce in un minor sviluppo della pianta, non solo per quanto riguarda l'altezza e lo spessore dello stelo e della foglia ma anche per il numero di foglie presenti; il WT è circa allo stadio di VII foglia, mentre l'omozigote è circa allo stadio di III foglia.

Nella figura sottostante (Fig. 4.3) sono rappresentate piante di BC5S1 allevate in campo (luglio 2013), nel momento di pieno sviluppo, in cui si stanno formando le infiorescenze femminili (*ear*) e maschili (*tasse*). Innanzitutto il fusto dell'omozigote presenta delle notevoli curvature, le infiorescenze femminili e maschili sono meno sviluppate rispetto allo stadio di sviluppo, le foglie seguono la rotazione del fusto e l'altezza rimane visibilmente ridotta.

L'omozigote presenta dunque notevoli difficoltà di sviluppo in tutta la parte aerea.



Fig. 4.3 Piante BC5S1 rispettivamente WT, eterozigote e omozigote.

Nella figura 4.4 la differenza tra eterozigote e omozigote della popolazione BC5 σ 2 si nota inizialmente nell'altezza dell'una rispetto all'altra e i difetti dell'omozigote sono molto simili a quelli trovati nella BC5S1, quindi alterazione dello sviluppo dello stelo e fillotassi anomala. Tuttavia si ha una deformazione del fusto, in cui sembra ci sia una biforcazione, che non era presente nell'omozigote della BC5S1; nella parte terminale della pianta, le foglie si ripiegano su sé stesse in modo irregolare.



Fig. 4.4 Piante eterozigoti e omozigoti di BC5 σ 2 nella foto di sinistra; la foto di destra è un ingrandimento sui difetti dell'omozigote.

Nella figura 4.5 si osservano malformazioni fogliari a livello di guaina: la superficie non è liscia ma presenta bolle e rugosità in prossimità della guaina fogliare. Da questo ingrandimento si nota una irregolare differenziazione tra lamina fogliare e ligula.



Fig. 4.5 Deformazioni a livello fogliare e di guaina nell'omozigote BC5 σ 2.

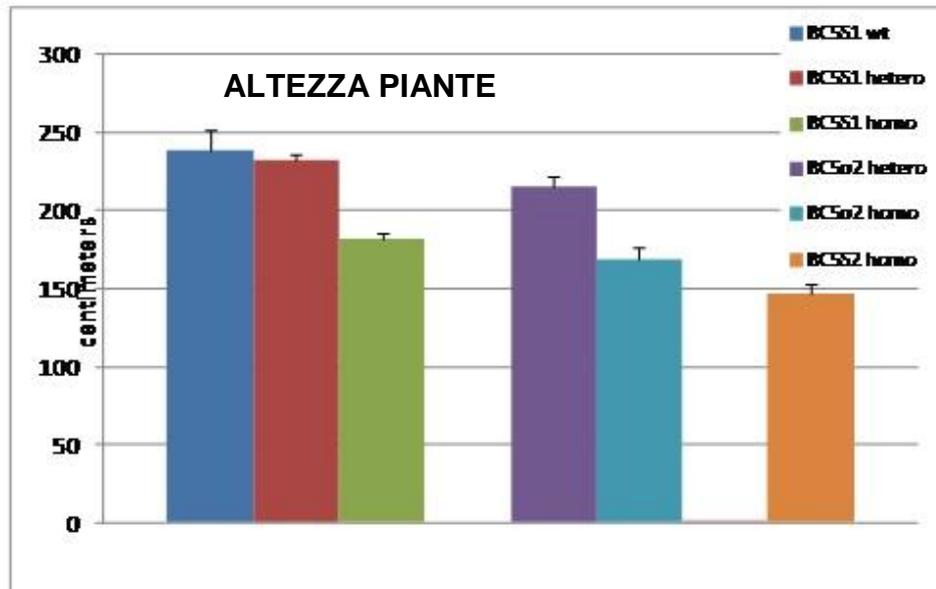
In figura 4.6 è rappresentata una pianta BC5S2 omozigote, le deformazioni risultano molto più evidenti rispetto alle piante omozigoti delle altre due linee; il fusto presenta una curvatura evidente ed è molto sottile, le foglie hanno direzioni irregolari e si accartocciano su sé stesse, e come si vede dall'ingrandimento una parte di esse presenta striature biancastre nella lamina fogliare, molto probabilmente causate dall'albinismo.



Fig. 4.6 Pianta omozigote BC5S2; nella foto a destra un dettaglio della foglia.

Dalla tabella 4.1 risulta evidente che le altezze delle piante omozigoti, indipendentemente dalla linea del mutante, sono ridotte rispetto ai WT; lo si può osservare anche nelle figure 4.3

e 4.4. Tuttavia se si prende in esame la linea BC5S1 risulta evidente gli omozigoti, ma anche gli eterozigoti, hanno altezze maggiori rispetto alla BC5σ2 e BC5S2.



Tab. 4.1 La tabella mostra le differenze delle altezze tra le piante.

Per quanto riguarda le infiorescenze femminili (vedi fig.4.7) delle linee BC5S1 e BC5σ2, si notano delle evidenti malformazioni fenotipiche nell'omozigote, quali allungamenti a livello dell'asse con *pseudo* infiorescenze. Rispetto al WT si hanno dimensioni nettamente inferiori, ma a differenza di questo l'asse risulta essere molto più allungata.

Nella BC5σ2 sono presenti degli abbozzi di infiorescenze lungo tutto l'asse, inoltre presenta curvature nette e marcate.



Fig. 4.7 Infiorescenze femminili di piante BC5S1, rispettivamente WT, E ed O, e di piante BC5 σ 2 rispettivamente E ed O.

Nel caso della linea BC5S2 (vedi fig. 4.8), non si ha una lunghezza sproporzionata dell'asse, ma si ha una crescita irregolare con piú abbozzi all'estremità; la mancanza di fertilità è giustificata dalla morfologia dell'infiorescenza femminile. Inoltre anche le infiorescenze maschili presentano lunghezze ridotte e non producono polline.

A piena maturità, le piante BC5S2 sono sterili, non producono né polline né infiorescenze femminili fertili.



Fig. 4.8 Infiorescenza femminile BC5S2.

Le infiorescenze maschili delle piante BC5S1, come si vede dalla fig. 4.9, presentano differenze a livello delle ramificazioni secondarie, in quanto nell'omozigote non sono presenti. Inoltre l'altezza diminuisce in quest'ultime, infatti come prova di questo sono state fatte delle misurazioni su tutte le infiorescenze maschili e dalla medie di queste è risultata la seguente tabella 4.2.



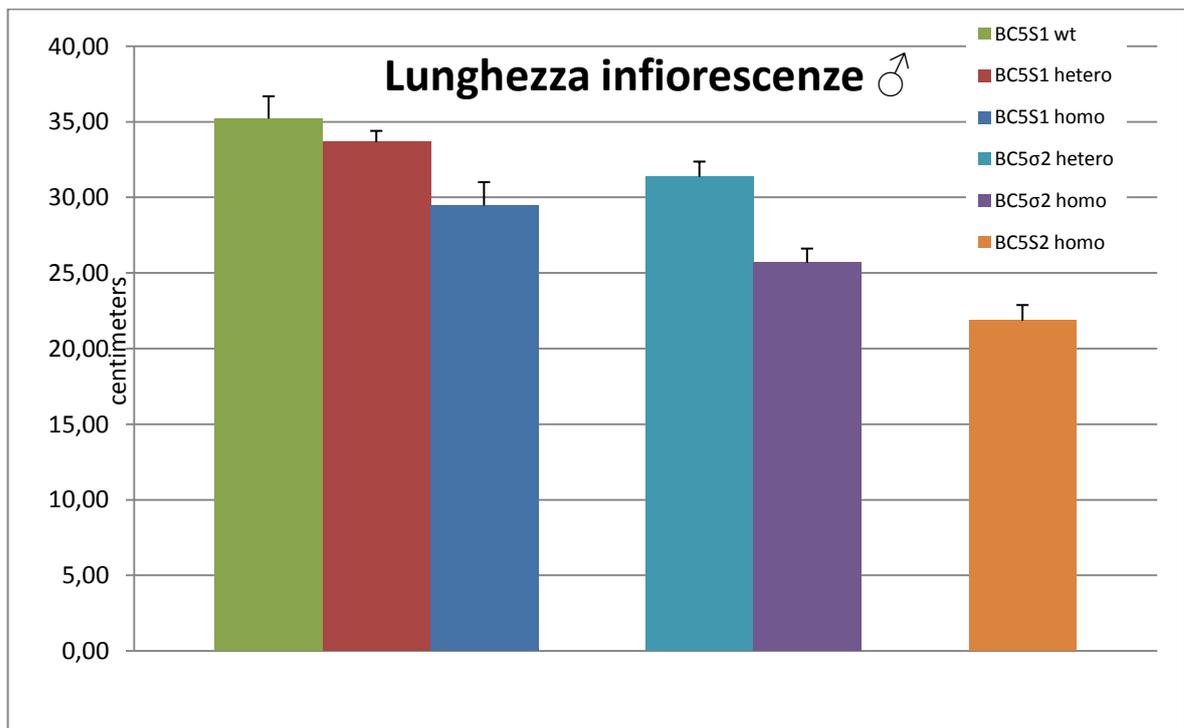
Fig. 4.9 Infiorescenze maschili di piante BC5S1 rispettivamente WT, eterozigote e omozigote.

Nella figura 4.10 sono rappresentate le infiorescenze maschili della linea BC5 σ 2, in cui si nota uno sviluppo minore per l'omozigote, tuttavia a differenza della fig. 4.9, risulta avere due ramificazioni secondarie, che non erano presente nella BC5S1.



Fig. 4.10 Infiorescenze maschili piante BC5 σ 2 rispettivamente eterozigote e omozigote.

Dalla tabella 4.2 si osserva che esse presentano una lunghezza minore rispetto ai WT. Inoltre, come già detto per le altezze, le varie lunghezze diminuiscono gradualmente se si passa dalla BC5S1 alla BC5 σ 2 ed infine alla BC5S2.



Tab. 4.2 La tabella mostra le differenze tra i tassel delle varie linee di piante.

Dal confronto tra i grafici delle altezze delle piante e delle lunghezze delle infiorescenze maschili (vedi tab. 4.1 e 4.2) risulta che le due caratteristiche hanno un'andamento proporzionale non solo all'interno della stessa linea mutante ma anche tra le linee mutanti prese in esame.

4.2 Analisi di espressione

L'analisi di espressione del gene *HDA108*, ottenuta tramite Real time, è stata eseguita inizialmente nei tessuti quali: 11° foglia, area meristemica, infiorescenza maschile e femminile. L'analisi è stata condotta considerando la linea di riferimento B73, piante WT, eterozigoti e omozigoti della linea BC5S1 e piante eterozigoti e omozigoti della linea BC5 σ 2.

Dalla fig. 4.11 si osserva che il gene *HDA108* non è espresso nell'11° foglia, nell'area meristemica e nelle infiorescenze maschili di piante omozigoti; quindi il gene *HDA108* risulta completamente silenziato in questi tessuti.

Tuttavia nelle infiorescenze femminili, l'omozigote della BC5S1 presenta una leggera banda di espressione, ulteriori studi futuri chiariranno la presenza di trascritto nell'omozigote.

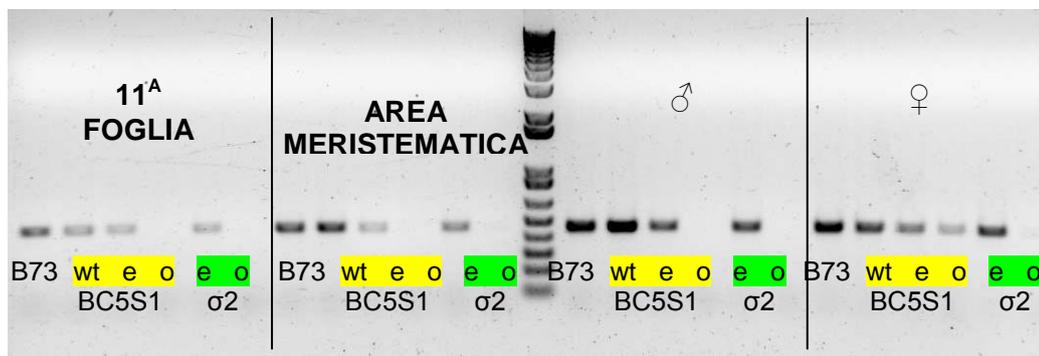
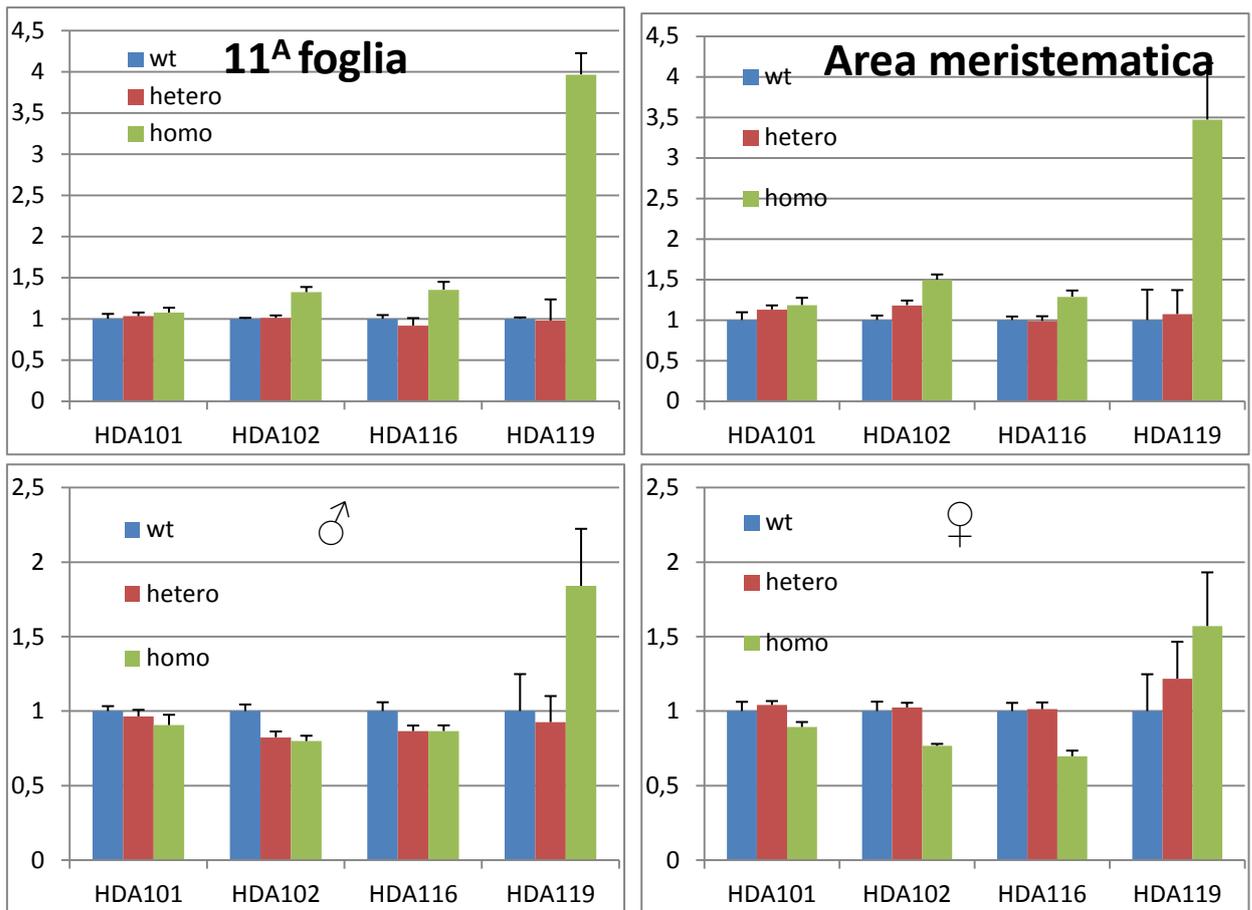


Fig. 4.11 Analisi di espressione del mutante *hda108* di BC5S1 in diversi tessuti.

Sugli stessi tessuti è stata condotta un'analisi di espressione di altri quattro geni appartenenti alla stessa famiglia (vedi fig. 1.9).

I grafici mostrano come i geni analizzati vengono modulati in presenza e assenza del trascritto *HDA108*, nei quattro tessuti analizzati. Si nota che il gene *HDA119* negli individui omozigoti è maggiormente espresso nei quattro tessuti rispetto agli altri geni, si può affermare quindi che risponde maggiormente all'assenza di *HDA108*; analisi future chiariranno il collegamento tra questi due geni.

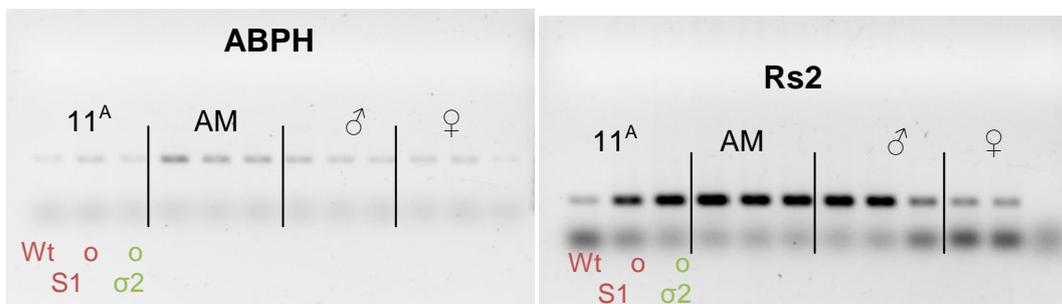
In generale, si può affermare che nei quattro tessuti si ha un comportamento simile tra i geni presi in esami, pur essendo presenti minime variazioni.



Tab. 4.3 I grafici mostrano l'analisi di espressione condotta sull'11° foglia, l'area meristematica, tassel e ear dei geni HDA 101, HDA102, HDA116 e HDA119.

E' stata condotta inoltre un'analisi d'espressione, tramite RT-PCR semiquantitativa, nei medesimi tessuti (11° foglia, area meristematica (AM), infiorescenza maschile e femminile), in piante WT e omozigoti della popolazione S1 e in piante omozigoti della popolazione $\sigma 2$, prendendo in esame cinque geni potenzialmente target del gene *HDA108*.

I potenziali target oggetto di studio sono rispettivamente *abphyl1* (*ABPH*), *rough sheath2* (*Rs2*), *liguleless1* (*Lg1*), *liguleless3* (*Lg3*) e *thick tassel dwarf1* (*Td1*).



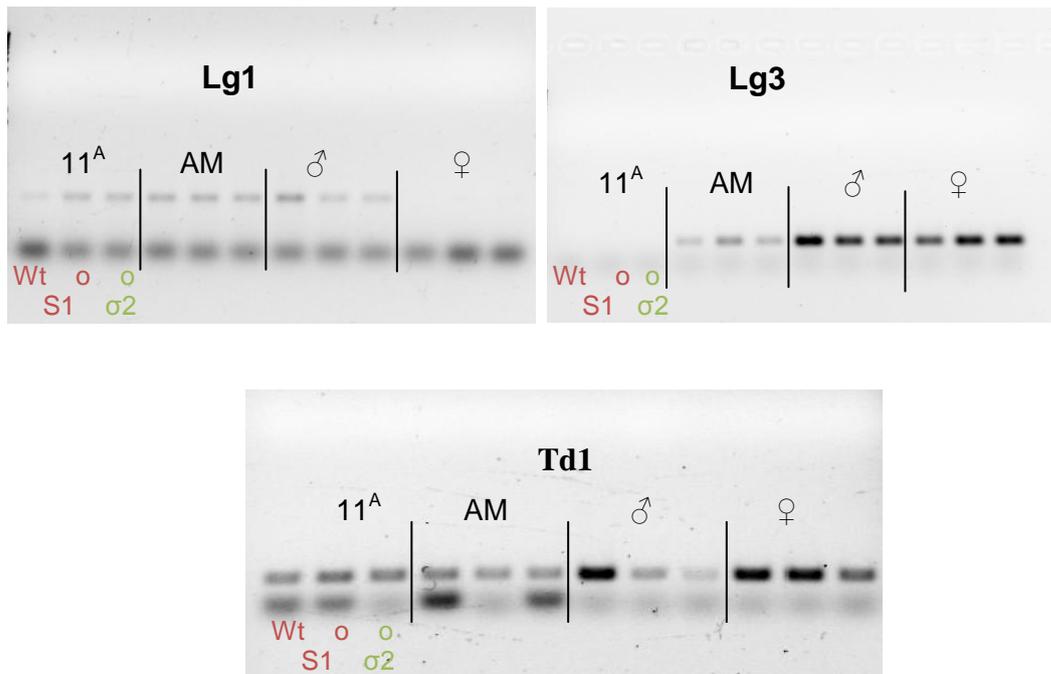


Fig. 4.12 Analisi di espressione di geni target, in diversi tessuti.

Il gene *ABPH* controlla la formazione delle foglie nel meristema e la formazione dei primordi fogliari; pur avendo dei livelli di espressione poco marcati risulta maggiormente espresso nell'area meristemica, rispetto agli altri tessuti.

L'espressione di *ABPH* pur mantenendosi molto limitata, è presente sia nel WT sia nelle linee mutanti.

Il gene *Rs2* è espresso negli organi laterali dei primordi, in cui reprime il gene *nox*.

Nell'11^A foglia si ha un aumento di espressione di questo gene nelle due linee mutanti rispetto al WT. Mentre in entrambe le infiorescenze l'espressione è maggiore nel WT e nella linea BC5S1 rispetto alla BC5σ2.

I geni *Lg1* e *Lg3* sono coinvolti nel pathway che porta alla formazione della ligula, sono presenti nei primordi.

Nei WT e nelle linee mutanti, *Lg1* è lievemente espresso nell'11^A foglia, nell'area meristemica e nelle infiorescenze maschili, mentre nelle infiorescenze femminili non è espresso.

Lg3 è espresso ugualmente in entrambe le infiorescenze, lievemente nell'area meristemica, mentre non è espresso nell'11^A foglia.

Il WT ha un livello di espressione minore nelle infiorescenze femminili rispetto alle piante mutanti, viceversa in quelle maschili.

Il gene Td1, ortologo di CLV1, regola la funzione di mantenimento delle cellule staminali, codifica per un recettore chinasi provvisto di un dominio extracellulare.

E' espresso soprattutto nelle infiorescenze femminili, con intensità minore nell'area meristemica e nell'11° foglia, mentre nelle infiorescenze maschili è espresso maggiormente nel WT.

5 CONCLUSIONE

Con lo scopo di definire e studiare il gene mutante *hda108*. Sono state studiate fenotipicamente le linee BC5S1, BC5σ2 e BC5S2. Sostanzialmente si sono osservati difetti nello sviluppo in piante omozigoti delle linee BC5σ2 e BC5S2 rispetto alle piante WT. Principalmente si è osservata una diminuzione dell'altezza, delle curvature irregolari a livello del fusto, le foglie si presentano rugosità e bolle nella lamina fogliare in prossimità della guaina, inoltre si nota una irregolare differenziazione tra lamina e ligula; le infiorescenze maschili non presentano ramificazioni secondarie e anch'essi hanno una lunghezza inferiore, quelle femminili hanno un'asse allungato e terminano con piccole infiorescenze o addirittura presentano abbozzi lungo l'asse. Da queste analisi fenotipiche inoltre si è osservato che la linea BC5S2 non presenta né polline né presentava infiorescenze femminili fertili, dunque non produce alcun tipo di seme.

Sono state eseguite analisi di espressione sul mutante *hda108* delle linee BC5S1 e BC5σ2 in determinati tessuti (11° foglia, area meristemica, infiorescenza maschile e femminile), con lo scopo di vedere se il gene *HDA108* fosse realmente non espresso. Nelle piante omozigoti il gene è effettivamente silenziato nei tessuti, se non fosse che nelle infiorescenze femminili è stata osservata una leggera attività di espressione, questo tuttavia sarà preso in esame da attività di studio future.

Oltre a questa analisi, sono state svolte altre due analisi di espressione sempre negli stessi tessuti. La prima ha analizzato l'espressione di geni appartenenti alla stessa famiglia di *HDA108*, per valutare il loro comportamento in assenza del gene; dal confronto tra di essi si è visto che il gene *HDA119* meglio risponde all'assenza di *HDA108*: infatti i livelli del trascritto risultano maggiori nelle piante omozigoti rispetto alle piante controllo in tutti e quattro i tessuti.

La seconda analisi è stata svolta su cinque geni target, con lo scopo di visualizzare il comportamento di questi nel mutante *hda108* rispetto alle piante WT; dal confronto si evince che la differenza di espressione con *hda108* non riguarda solo i diversi geni target ma anche i diversi tessuti. ABPH è lievemente espresso in tutti i tessuti, indipendentemente che la pianta sia WT o mutante, mentre per gli altri geni vi sono variazioni di espressione tra WT e linee mutanti nei vari tessuti.

6 BIBLIOGRAFIA

Chen M., Lv S. e Meng Y (2010). Epigenetic performers in plants. *Develop. Growth Differ*, VOL. 52, pp. 555-566.

Courtney Hollender, Zhongchi Liu (2008). Histone Deacetylase Genes in *Arabidopsis* Development. *Journal of integrative plant biology*, VOL. 50, pp 875–885.

Grant-Downton R. T. e Dickinson H.G. (2005). Epigenetics and Implications for Plant biology 1. The epigenetic network in plant. *Annals of Botany*, VOL. 96, pp. 1143-1164.

Haring M., Offermann S., Danker T., Horst I., Christoph Peterhansel, Stam M. (2007). Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods*, VOL. 3.

Lauria M, Rossi V (2011). Epigenetic control of gene regulation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*.

Loidl P., (2004). A plant dialect of the histone language. *Trends Plant Sci*.

Rossi V., Locatelli S., Varotto S., Donn G., Pirona R., Henderson D.A., Hartings H., Motto M. (2007). Maize Histone deacetylase HDA101 is involved in plant development, gene transcription, and sequence-specific modulation of histone modification of gene repeats. *The plant cell*, VOL. 19, pp1145-1162.

Schanable P., Ware D, Fulton R. (2009). The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science*, VOL. 326, pp. 1112-1115.

Wu K, Zhang L, Zhou C, Yu C-W, Chaikam V. (2008) HDA6 is required for jasmonate response, senescence and flowering in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany Advance Access*, da *Journal of experimental Botany*, pp. 1-10.

www.ncbi.org

www.maizegdb.org

www.treccani.it

