



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

DAFNAE

TESI DI LAUREA TRIENNALE IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

**INDIVIDUAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI GENI
CODIFICANTI PER DEACETILASI ISTONICHE IN VITE**

Relatore: Prof.ssa Margherita Lucchin

Correlatore: Dott.ssa Michela Verna

Laureando: Marco Fiamengo

Matricola n. 1008906

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013

INDICE

	pag
1. <u>RIASSUNTO</u>	6
2. <u>ABSTRACT</u>	7
3. <u>INTRODUZIONE</u>	8
3.1 La viticoltura: cenni storici e situazione odierna	8
3.2 Sistematica della vite	10
3.3 Morfologia	11
3.4 Utilizzo del portainnesto nella coltivazione della vite.....	14
3.5 Cause e conseguenze dello stress idrico nelle piante	15
3.6 Cromatina: struttura e ruolo nella regolazione dell'espressione genica	18
3.7 Le deacetilasi istoniche	21
4. <u>OBIETTIVO DELLA TESI</u>	25
5. <u>MATERIALI E METODI</u>	27
5.1 Legenda	27
5.2 Tamponi, soluzioni e terreni colturali	28
5.3 Materiale vegetale per le analisi di risposta allo stress idrico con approccio <i>genome-wide</i>	29
5.4 Caratterizzazione delle sequenze codificanti i geni HDA6901, HDA6902 e HDA6906 nei portainnesti M4 e 101.14	31
5.5 Estrazione dell'RNA	32
5.6 Corsa elettroforetica	33
5.7 Quantificazione al NANODROP	35

5.8 Retrotrascrizione dell'mRNA a cDNA.....	35
5.9 PCR (Polimerase Chain Reaction).....	36
5.9.1 Scelta dei primers	37
5.9.2 Scelta dell'enzima DNA polimerasi	39
5.9.3 Applicazioni della PCR	40
5.10 Exofap	41
5.11 Clonaggio di frammenti di DNA in vettori plasmidici e trasformazione delle cellule competenti	41
5.11.1 Purificazione dell'amplificato	42
5.11.2 Excisione delle bande dal gel	42
5.11.3 Preparazione delle piastre di coltura batterica	44
5.11.4 Trasformazione delle cellule competenti	44
5.12 Estrazione del DNA plasmidico	45
5.13 Analisi <i>in silico</i> delle deacetilasi appartenenti alla famiglia RPD3/HDA1 nei portainnesti M4 e 101.14 di vite.....	46
5.14 Risposta allo stress idrico con approccio <i>genome-wide</i>	50
6. <u>RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	51

6.1 Caratterizzazione delle sequenze codificanti i geni HDA6901, HDA6902 e HDA6906 nei portainnesti M4 e 101.14.....	51
6.2 Analisi <i>in silico</i> delle deacetilasi appartenenti alla famiglia RPD3/HDA1 nei portainnesti M4 e 101.14 di vite.....	54
6.3 Risposta allo stress idrico con approccio <i>genome-wide</i>	58
7. <u>CONCLUSIONI</u>	62
8. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	64

1.RIASSUNTO

Negli ultimi anni è stato constatato che la regolazione epigenetica della trascrizione, che determina la modifica dello stato di condensazione della cromatina a cui è associato il DNA, riveste un ruolo importante durante lo sviluppo della pianta nell'adattabilità alle condizioni ambientali a cui essa è sottoposta. È stato dimostrato che le deacetilasi istoniche sono fattori di rimodellamento della cromatina coinvolti nella risposta agli stress ambientali.

In questo lavoro di tesi le dieci deacetilasi istoniche appartenenti alla famiglia RPD3/HDA1 identificate in *Vitis vinifera* sono state caratterizzate dal punto di vista strutturale e funzionale in due portainnesti, M4, un portainnesto sperimentale resistente allo stress idrico e 101.14, un portainnesto commerciale suscettibile, allo scopo di verificare un loro eventuale coinvolgimento nella tolleranza allo stress idrico. È stata effettuata un'analisi in *silico* dei domini funzionali delle deacetilasi in questione nei due portainnesti, prendendo come riferimento il genoma del genotipo PN40024 di *V. vinifera*, che ha rivelato un buon livello di conservazione delle sequenze aminoacidiche in entrambi i portainnesti. Successivamente sono stati analizzati i dati di espressione ottenuti mediante un approccio di RNAseq in foglia e radice dei due portainnesti in condizioni standard e sottoposti a stress idrico. Nel portainnesto 101.14 solo il gene HDA6904 è risultato sovra espresso in condizioni di stress, limitatamente al tessuto radicale, mentre nel portainnesto M4 si è osservata un' espressione genica più marcata delle deacetilasi HDA6904, HDA6906 e HDA6910 sia nei tessuti fogliari che nella radice, quando sottoposto a stress idrico, a conferma del coinvolgimento di tali geni nella risposta allo stress idrico.

2. ABSTRACT

In recent years it has been found that the epigenetic regulation of transcription, determining the change of the state of chromatin condensation, that is associated with the DNA, plays an important role during the development of the plant in the adaptability to environmental conditions to which the plant is subjected . It has been shown that the histone deacetylases are chromatin remodeling factors involved in the response to environmental stresses. In this thesis the ten histone deacetylases belonging to the family RPD3/HDA1 identified in *Vitis vinifera* have been characterized, in terms of structure and function, in two rootstocks, M4, an experimental rootstock resistant to water stress and 101.14, a commercial susceptible rootstock. The aim was to verify a possible involvement of deacetylase genes in the control of tolerance to water stress. An *in silico* analysis of deacetylasic functional domains was performed on the two rootstocks, taking as reference the genome of *V. vinifera* of genotype PN40024. The analysis revealed a good level of conservation of the aminoacidic sequences in both rootstocks. Then the expression data obtained by an RNAseq approach carried out on leaf and root tissues of the two rootstocks under standard and water stress conditions were analyzed. In the 101.14 genotype the only HDA6904 gene was observed to be overexpressed under stress conditions within root samples, whereas in the M4 rootstock HDA6904, HDA6906 and HDA6910 genes were upregulated both in leaf and root tissues under water stress, proving the importance which they have in the response to water stress.

3. INTRODUZIONE

3.1 La viticoltura: cenni storici e situazione odierna

La storia della viticoltura affonda le proprie radici in epoche antichissime. Da tempi immemori ad oggi la vite viene coltivata per l'uva da tavola, ma principalmente perché dalla fermentazione alcolica dei suoi frutti ad opera dei lieviti si ottiene il vino. Col passare del tempo questa bevanda ha assunto significati e sfumature che vanno ben oltre l'aspetto agroalimentare, acquisendo importanza dal punto di vista sociale, culturale e religioso.

Il genere *Vitis* ha tre grandi centri d'origine: uno nell'America settentrionale e in parte quella centrale, il secondo situato nell'Asia orientale, il terzo euroasiatico, comprendente la specie definita europea, seppur erroneamente, *V. vinifera* (Fregoni 2005). Tale specie, quella maggiormente coltivata e subsontanea in Europa, sembra essere una pianta indigena e a dimostrazione di ciò sono stati ritrovati un po' in tutto il continente, resti fossili riconducibili al genere *Vitis* risalenti al Miocene e Pliocene, ma è solo dall'era quaternaria che si può parlare di reperti di *Vitis vinifera* (Eynard 2005).

Oggi si tende a far risalire l'inizio della viticoltura al Mesolitico (9000 anni a.C.) nella zona della Mezzaluna fertile, area compresa tra l'Egitto ed il Caucaso, patria delle antiche civiltà che precedettero le grandi civiltà sumere, assire, babilonesi, egizie e cartaginesi (Eynard 2005)

Precisi riferimenti concernenti la produzione ed il consumo del vino risalgono al terzo millennio a.C. con la civiltà Sumerica, mentre in Egitto questa bevanda era consumata solamente dai sacerdoti e dagli alti funzionari del re, ad affermare la grande importanza sociale che questa bevanda aveva assunto. Furono i Fenici ad espandere le tecniche vitivinicole in tutto il bacino del Mediterraneo, dai porti europei a quelli nord-africani. Per quanto riguarda l'Italia la diffusione della vite non

fu omogenea: mentre in Sicilia la vitivinicoltura era già praticata 2000 anni a.C., probabilmente grazie all'influenza dei commerci della civiltà minoica ed egeo-micenea, al centro-nord furono gli Etruschi che diedero inizio a questo tipo di coltura. In epoca romana, con l'espansione dell'impero e la diffusione della religione cristiana, la viticoltura conobbe un periodo di grande prosperità, sia per l'espansione che raggiunsero i vigneti, sia per l'alto reddito che assicurava questo tipo di coltura. Numerose sono le opere dei poeti latini, tra cui Catone, Columella, Orazio ed altri, che descrivono le innovative tecniche di coltivazione della vite e l'eccellenza qualitativa raggiunta dai vini romani. Plinio il Vecchio descrive il patrimonio varietale che comprendeva fino ad 80 vitigni, suddivisi in uva da tavola e da vino. Con la disgregazione dell'Impero Romano ed il periodo di forte instabilità che portò al graduale abbandono delle campagne, la viticoltura subì un grande calo, finché, nel basso medioevo, veniva praticata solo presso monasteri ed abbazie, poiché i monaci utilizzavano il vino per la celebrazione della Messa eucaristica. Tuttavia col passare del tempo la vite ed il vino divengono simbolo di ricchezza e prestigio presso la nobiltà, grazie alla quale ci fu una ripresa delle tecniche vitivinicole. La scoperta del nuovo mondo segna un altro periodo di forte espansione della vite verso le terre d'oltreoceano, ma allo stesso tempo porta all'incontro con parassiti fin'ora sconosciuti in Europa. L'800 è un secolo di grandi cambiamenti per la viticoltura. Dalla metà di questo secolo una grave crisi si abbatte sulla viticoltura europea a causa di tre piaghe provenienti dall'America: nel 1845 in Inghilterra compare l'oidio (*Oidium tuckeri* o mal bianco della vite), un fungo importato assieme alle viti americane che attacca l'apparato fogliare della pianta. Nel 1868 si scopre nella Francia meridionale la Fillossera della vite (*Phylloxera vastatrix*), un afide che attacca la parte ipogea della pianta portandola alla morte. Infine nel 1878 dal nuovo mondo giunge la Peronospora (*Plasmopara viticola*), un oomicete che attacca le parti verdi della pianta. Queste grandi epidemie hanno portato alla luce la necessità di

rivoluzionare le tecniche viticole, che fino a quel momento erano ancora legate alle antiche tradizioni, troppo antiquate ed inadeguate alle nuove situazioni. Grazie al continuo progredire della conoscenza scientifica e all'affinamento delle tecniche colturali, oggi la viticoltura è praticata in tutto il mondo, anche in zone che a livello climatico non si addicono propriamente a questo tipo di coltura. Il vecchio continente la fa ancora da padrone in termini di aree vitate e produzione di uva, infatti in Europa è concentrato il 61% delle aree vitate (di cui il 44% nell'UE, dove Italia, Francia e Spagna rivestono un ruolo primario e il 17% nel resto del continente), seguono l'Asia con il 21%, l'America con il 12% e infine l'Oceania (Australia e Nuova Zelanda) con il 2%. (Fregoni 2005). Negli ultimi anni sono entrati nel mercato enologico mondiale di paesi emergenti quali Cina, India Giappone, Corea, Sudafrica, Brasile ecc. che guardano sempre con maggiore interesse il business vitivinicolo, producendo vini di buona qualità a prezzi contenuti. Nella viticoltura mondiale comunque prevale, attualmente, l'indirizzo verso la qualità rispetto alla quantità produttiva, considerando anche il maggiore interesse nel mercato per prodotti provenienti da vitigni autoctoni.

3.2 Sistematica della vite:

Quando si parla di vite si intende la vite europea o nostrana, definita così perché è l'unica specie che vive spontaneamente in Europa e nel bacino del Mediterraneo. Secondo la classificazione botanica si tratta della specie *Vitis vinifera* L. appartenente all'ordine delle *Rhamnales*, famiglia delle *Vitaceae* o *Ampelidaceae*, sottofamiglia delle *Ampelideae* (o *Vitoideae*), genere *Vitis*. Questo genere è stato a sua volta suddiviso in due sottogeneri, ossia *Muscadinia* ed *Euvtis* (Planchon 1887), basandosi sul fatto che l'interfertilità tra i membri di sottogeneri diversi è assai scarsa, dato che i membri del sottogenere *Muscadinia* hanno un numero

cromosomico $n=20$, mentre in quelli appartenenti al sottogenere *Euvitis* $n=18$ (Eynard 2005). Al primo gruppo appartengono solo tre specie di origine americana (*V. munsoniana*, *V. rotundifolia*, *V. popenoei*) distinguibili perché presentano tralci sprovvisti di lenticelle, viticci semplici ed in corrispondenza dei nodi non vi è diaframma. Il secondo comprende 62 specie di origine americana ed eurasiatica tutte interfertili tra loro, raggruppate in base all'origine geografica e alla morfologia in *Lambruscae*, *Lambruscoideae americanae*, *Aestivales*, *Cinerascentes*, *Rupestres*, *Ripariae*, *Lambruscoideae asiaticae* e *Viniferae*. La specie *Vitis vinifera* comprende due sottospecie: *V. vinifera silvestris* D.C., o vite selvatica, e *V. vinifera sativa* D.C. che comprende tutte le varietà coltivate, denominate vitigni. A loro volta le viti coltivate possono essere suddivise in viti orientali (viti caspiche e antasiatiche) e viti mediterranee (viti pontiche ed occidentali).

3.3 Morfologia:

La vite è una pianta legnosa, arbustiva di tipo rampicante, il cui portamento è generalmente definito dal tipo di allevamento.

Per quanto riguarda le radici bisogna distinguere quelle che derivano dal seme, di natura fittonante, da quelle prendono origine dai tralci, di natura avventizia. La pratica viticola prevede l'utilizzo di portainnesti moltiplicati per via vegetativa, per cui le radici sono tutte di origine avventizia. Queste si originano dai nodi, raramente dagli internodi, dei tralci e la loro direzione, pur variando da specie a specie e in base al tipo di terreno, è prevalentemente orizzontale. La maggior parte delle radici si sviluppa in uno strato di terreno compreso fra i 25-30cm e i 60-80cm. (Eynard 2005). Un carattere fenotipico di un certo interesse che varia a seconda della specie è l'angolo geotropico radicale, ossia l'angolo formato dalle radici rispetto alla verticale. Questa caratteristica, presa in considerazione al momento della scelta dei

parentali per formare il piede, incide sulla resistenza della pianta alla carenza idrica negli strati superficiali.

Il fusto della vite coltivata generalmente non raggiunge grandi dimensioni e la sua lunghezza e forma variano in base al tipo di allevamento. La parte basale, di pochi decimetri di lunghezza, detta ceppo (o tronco) si divide in due o più branche. Questi elementi costituiscono il legno vecchio, ricoperto dalla corteccia chiamata ritidoma, che si sfalda longitudinalmente. Le branche portano rami di uno o due anni detti tralci, di natura erbacea e dal colore verde o rossastro in alcune specie americane, divisi in segmenti di varia lunghezza detti internodi (o meristalli) separati dai nodi. Sui nodi si inseriscono le foglie, alla base delle quali si trovano le gemme, ma solo dal secondo o terzo nodo, dal lato opposto rispetto alla foglia, troviamo grappoli e cirri (o viticci). Da gemme sviluppatesi nella stessa stagione, definite gemme pronte, si possono formare germogli definiti femminelle (o rami anticipati), generalmente non fertili. Le gemme ibernanti invece, ossia quelle che si sviluppano la stagione successiva, danno origine a nuovi tralci. Sul finire della stagione estiva i tralci erbacei vanno incontro a lignificazione, un fenomeno definito maturazione o agostamento, incamerando sostanze di riserva al loro interno e rafforzando la parete esterna. Questo processo è finalizzato alla resistenza al clima invernale.

Le foglie della vite sono semplici, costituite da un lembo (o lamina) palminervio, sostenuto da un picciolo, definite alterne distiche in quanto disposte in due serie longitudinali diametralmente opposte. La forma e la tonalità della foglia sono un importante carattere tassonomico, anche se nella vite è presente una forte eterofillia, ossia la presenza di foglie di forma diversa sullo stesso tralcio. Il lembo è tipicamente pentagonale, suddiviso in 3 o 5 lobi (raramente 7 o 9) separati da seni più o meno profondi, ma si distinguono anche forme di tipo orbicolare (o tondeggiate), cuneiforme, cordiforme (a forma di cuore) e reniforme. Generalmente l'epidermide superiore è cutinizzata e priva di stomi, mentre la

pagina inferiore risulta essere ricca di aperture stomatiche e generalmente tomentosa, in alcuni casi addirittura cotonosa. Questa risulta essere una caratteristica importante ai fini del controllo della traspirazione, per evitare una eccessiva dispersione di acqua.

I fiori sono raggruppati in un'infiorescenza detta racemo o grappolo composto, il cui asse principale, il rachide, si ramifica in racimoli e pedicelli, che portano i singoli fiori. Nelle varietà coltivate i fiori sono tipicamente ermafroditi, portati da un pedicello che si allarga fino al talamo florale. Su di esso troviamo, dall'esterno all'interno, un calice, di solito costituito da 5 sepali, la corolla, costituita da 5 petali tipicamente verdi, l'androceo, costituito da 5 stami alternati a 5 nettarii ed al centro il gineceo, caratterizzato da un ovario bicarpellare contenente normalmente 4 ovuli. Inoltre è riscontrabile, anche in alcune varietà di vite europee, la presenza di fiori unisessuali maschili, diffusi soprattutto nelle viti americane, e femminili, che devono essere fecondati con polline di viti differenti.

Il frutto, comunemente chiamato uva, è costituito da una infruttescenza derivata dalla fecondazione dell'infiorescenza precedentemente descritta, dove il raspo, ossia il complesso di ramificazioni, sostiene l'insieme dei singoli frutti definiti acini. A livello botanico l'acino è una bacca, costituito da una buccia (o epicarpo) ricoperta da uno strato ceroso, nella quale sono contenute sostanze coloranti ed aromatiche e sulla quale attecchiscono i lieviti fondamentali per la vinificazione. Più internamente troviamo il mesocarpo, costituito da più di venti strati di cellule altamente ricche di un succo particolarmente ricco di zuccheri ed acidi, il mosto. Infine nella porzione più interna, delimitato da uno strato di cellule, troviamo l'endocarpo, contenente i due semi chiamati vinaccioli. (Eynard 2005)

3.4 Utilizzo del portainnesto nella coltivazione della vite:

La necessità di utilizzare un portainnesto nella coltivazione della vite risale alla seconda metà dell'800, quando la fillossera, un afide proveniente dal nord America, mise in crisi l'intera viticoltura europea. L'apparato radicale della vite europea infatti risulta essere fortemente vulnerabile alle punture di questo insetto, mentre le specie selvatiche di vite americana mostrano resistenza agli attacchi dell'afide. Dapprima si cercò la soluzione a tale problema mediante l'utilizzo degli IPD (ibridi produttori diretti), vitigni ottenuti dall'ibridazione di specie europee ed americane, in modo tale da ottenere una varietà resistente alla fillossera e in grado di fornire un prodotto utilizzabile. Tuttavia la coltivazione degli IPD non ha risolto il problema, in quanto questi spesso non offrono una totale resistenza alla fillossera e ad altri patogeni come oidio e peronospora. Il prodotto ottenuto da questi oltretutto presenta una qualità fortemente inferiore rispetto a quello delle varietà europee ed è caratterizzato da una scarsa conservabilità ed un profilo aromatico nettamente inferiore. Pertanto la soluzione vincente fu quella di innestare vitigni europei su portainnesti di specie americane, in modo da assicurare la resistenza dell'apparato radicale alla fillossera ma anche un prodotto di buona qualità che rispecchiasse l'eccellenza della produzione europea. Una delle problematiche maggiori fu quella di ottenere portainnesti resistenti alle malattie e allo stesso tempo adattabili alle nuove condizioni ambientali dei terreni vitati del vecchio continente. Ancor'oggi lo scopo principale dell'utilizzo dei portainnesti è la resistenza alla fillossera e ad altri agenti patogeni. Tra i portainnesti più utilizzati ci sono ibridi semplici o complessi di viti americane, provenienti da incroci di tre specie in particolare: *Vitis riparia* e *V. rupestris*, particolarmente resistenti alla fillossera e *V. berlandieri*, selezionata per la resistenza alla clorosi, una fitopatia tipica della coltivazione su terreni ricchi di calcare attivo come sono quelli europei. I criteri di selezione del portainnesto devono tenere in considerazione in primo luogo la compatibilità dei due bionti da

unire, che devono presentare caratteristiche biologiche e fisiologiche simili, al fine di ottimizzare il rapporto di quantità e qualità di uva prodotta ed assicurare un buon livello produttivo al coltivatore. Un'altra caratteristica essenziale da considerare è l'adattabilità del portainnesto al tipo di suolo, alle condizioni ambientali e alla resistenza agli stress di tipo abiotico. A questo proposito il tipo di apparato radicale, la selettività nell'assorbimento dei nutrienti, la tolleranza alla siccità, alla salinità, all'elevata umidità e alla clorosi divengono caratteri fondamentali per la scelta del portainnesto più adeguato. L'apparato ipogeo deve infatti essere in grado di garantire un afflusso adeguato di acqua e nutrienti alla chioma, soprattutto in condizioni stressanti per la pianta, al fine di mantenere un buon equilibrio fisiologico della parte elaborante frutto e permetterne il corretto sviluppo. Data l'importanza che riveste il portainnesto per la coltivazione della vite, il miglioramento genetico e la selezione di portainnesti, che conferiscano resistenza ai principali agenti biotici e che inoltre presentino una buona adattabilità a condizioni abiotiche stressanti, possono rivelarsi fondamentali al fine di mantenere un buon livello produttivo anche nelle condizioni non ideali per la coltivazione della vite.

3.5 Cause e conseguenze dello stress idrico nelle piante:

Sebbene fino ad ora siano stati ammessi alla coltivazione una novantina di portainnesti, la viticoltura moderna ne utilizza solamente 5 o 6, selezionati per la resistenza verso la fillossera ed i nematodi, la facilità di moltiplicazione e soprattutto per la rusticità, che conferisce loro una maggiore tolleranza agli stress abiotici, in primis la tolleranza allo stress idrico e al calcare attivo (Scienza A, 2013). Questi due fenomeni sono strettamente correlati perché in entrambi i casi la pianta è sottoposta a condizioni stressanti a causa della difficoltà nell'assorbimento dell'acqua, in seguito al notevole abbassamento del potenziale idrico del suolo. Il

potenziale idrico è un parametro utilizzato per prevedere i movimenti dell'acqua attraverso membrane semipermeabili, poiché essa si sposta da zone in cui il potenziale è maggiore a zone dove esso è minore. Se la disponibilità d'acqua nel suolo diminuisce, la concentrazione di molecole solubili e ioni aumenta, determinando un forte abbassamento del potenziale idrico. Ne consegue una perdita di acqua da parte delle cellule radicali, che presentano un potenziale idrico maggiore rispetto a quello esterno, fino a quando il protoplasto si distacca dalla parete cellulare. In ambienti ad elevata salinità la pianta deve inoltre far fronte a concentrazioni tossiche di ioni, che tendenzialmente sarebbero assorbiti per l'adattamento osmotico, ma ad elevate concentrazioni citosoliche essi si rivelano agenti alteranti del metabolismo cellulare (Buchanan, 2003). Bisogna inoltre considerare che uno stress idrico è spesso associato ad altri tipi di stress che conseguono ad esso. Ad esempio, può verificarsi uno stress da calore, in quanto la bassa disponibilità d'acqua determina la chiusura degli stomi, bloccando la traspirazione e quindi anche la dissipazione del calore. Lo stress idrico può anche aumentare la concentrazione di ROS (specie reattive dell'ossigeno), che possono danneggiare diverse componenti cellulari, o addirittura aumentare la vulnerabilità nei confronti di alcuni patogeni (Buchanan, 2003). Le conseguenze di tutto ciò si traducono in effetti secondari comuni dovuti ad uno stress idrico o salino, che sono una minor espansione cellulare e fogliare, la riduzione delle attività cellulari e metaboliche, la chiusura degli stomi, l'inibizione fotosintetica, l'abscissione fogliare e la citorrissi (Taiz, 2010). Queste condizioni incidono sfavorevolmente sulla crescita, sullo sviluppo e sulla produttività della pianta, poiché essa deve rispondere alterando il suo equilibrio fisiologico e, quindi, modificando l'espressione genica ed il metabolismo cellulare. Le risposte della pianta variano in base al tipo di stress a cui essa è sottoposta, allo stadio di sviluppo ed al genotipo, ossia la combinazione genica di ciascun individuo. I meccanismi di tolleranza agli stress possono essere

divisi in due categorie: meccanismi di allontanamento, che prevengono lo stress grazie a tratti costitutivi geneticamente determinati, ad esempio l'angolo geotropico radicale del portainnesto, e meccanismi di adattamento, basati su modificazioni dell'omeostasi della pianta (Buchanan, 2003). Quando la pianta percepisce una situazione di stress a livello cellulare, attiva una serie di messaggi chimici che, attraverso vie di trasduzione ed amplificazione del segnale, estendono il messaggio a tutta la pianta, in modo da sincronizzare l'attività di risposta in ogni sua parte. Lo studio e la comprensione delle basi molecolari dei meccanismi di resistenza può consentire di individuare marcatori molecolari utili alla selezione precoce di nuovi portainnesti che presentino caratteri di resistenza agli stress. Ci sono evidenti prove che indicano che la risposta primaria della pianta sia la produzione di fitormoni, specialmente acido abscissico (ABA), etilene ed acido jasmonico (JA). In particolare modo l'ABA viene considerato l'ormone dello stress idrico poichè in condizioni di siccità la sua concentrazione aumenta fino a 50 volte (Taiz, 2010): esso viene prodotto a livello radicale e giunge per via xilematica alla chioma, dove è in grado di determinare la chiusura stomatica, per limitare il fenomeno della traspirazione che comporterebbe un'ulteriore perdita d'acqua. È stato inoltre dimostrato che questo ormone ha effetti sulla regolazione trascrizionale di geni coinvolti nei processi di acclimatamento e tolleranza allo stress, anche se non è ancora chiaro in che modo questo avvenga. L'ABA attiva tutta una serie di geni, coinvolti nella risposta allo stress, che codificano per "*stress protein*", come le deidrine o le acquaporine, proteine canale di membrana che migliorano le relazioni idriche della pianta. Oltre alla produzione di ABA quindi, la pianta sottoposta a stress idrico o salino modula la trascrizione di altri geni che possono venir trascritti o inibiti a seconda della situazione. Ad esempio, per adeguarsi alla differenza di potenziale idrico, la pianta produce una serie di soluti, composti organici a basso peso molecolare altamente solubili che non interferiscono con il metabolismo cellulare, come glicina-betaina,

prolina, monomeri di zuccheri che vengono depolimerizzati quali glucosio e fruttosio, sorbitolo, mannitolo ecc. Questi, data la loro solubilità, contribuiscono alla diminuzione del potenziale idrico cellulare favorendo l'afflusso di acqua all'interno della cellula radicale (Buchanan, 2003). Fino ad ora i meccanismi di modificazione dell'espressione genica maggiormente studiati sono quelli che agiscono a livello trascrizionale, post-trascrizionale, traduzionale o post-traduzionale. Negli ultimi anni si è riconosciuto un ruolo significativo alla regolazione dell'espressione genica di tipo epigenetico, un tipo di regolazione che non concerne con la modificazione di alcuna sequenza nucleotidica del DNA ma bensì prevede cambiamenti dello stato della cromatina che lo circonda, che possono essere ereditabili ma anche facilmente reversibili (Buchanan 2003)

3.6 Cromatina: struttura e ruolo nella regolazione dell'espressione genica

Le caratteristiche che rappresentano un individuo e lo rendono unico rispetto agli altri sono scritte nel suo genotipo, ossia l'insieme di tutti i geni presenti nel suo DNA che rimane uguale per tutta la sua vita. Il DNA negli eucarioti si organizza in diversi cromosomi e l'insieme dei cromosomi e delle informazioni in essi contenute è detto genoma. Il DNA all'interno del nucleo delle cellule si trova associato a numerose proteine, gli istoni, in una struttura altamente organizzata definita cromatina. Il livello di cromatina meglio identificabile è il nucleosoma, definito livello di condensazione di prim'ordine (Buchanan, 2003). Ogni nucleosoma è costituito da un ottamero globulare di istoni, piccole proteine ricche di residui aminoacidici di lisina ed arginina carichi positivamente, sui quali la doppia elica di DNA, carica negativamente, si avvolge compiendo un giro e $\frac{2}{3}$, per un totale di 147 paia di basi (Lauria and Rossi, 2011). L'ottamero è costituito da una coppia per ciascun tipo di istone ossia H2A, H2B, H3 ed H4. È presente anche un istone di tipo H1, definito

“linker”, legato esternamente ad ogni nucleosoma, al fine di stabilizzare la struttura dello stesso e della cromatina. Tra un nucleosoma ed il successivo è presente una porzione di DNA che funge da spaziatore, lunga dalle 20 alle 200bp. Questo primo livello di condensazione, definito a “filo di perle”, costituisce la cosiddetta fibra di 10 nm. Da qui la cromatina subisce ripiegamenti e compattamenti secondo livelli di condensazione sempre maggiori, fino a formare la struttura caratteristica osservabile durante la divisione cellulare: il cromosoma metafase. (Fig.1)

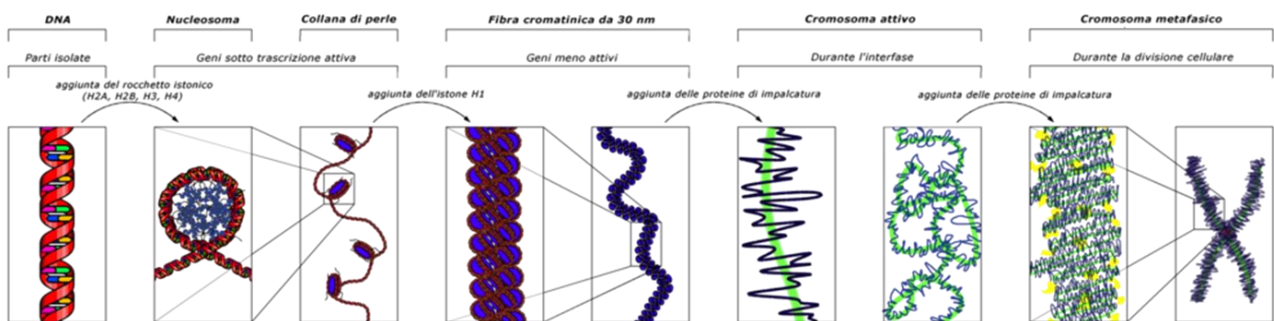


Fig.1: i vari gradi di impacchettamento della cromatina, dalla doppia elica del DNA al cromosoma metafase, il massimo grado di condensazione.

La cromatina, oltre a risolvere i problemi legati alla necessità di compattamento delle molecole di DNA, risulta essere un importante meccanismo per la regolazione dell'espressione genica. È noto infatti che i nucleosomi inibiscono la trascrizione *in vitro*, che la delezione di istoni porta ad un generale aumento della trascrizione *in vivo* e che complessi di rimodellamento della cromatina ed enzimi che modificano post-traduzionalmente gli istoni agiscono come co-attivatori o co-repressori della trascrizione dei geni. La cromatina risulta pertanto essere una barriera fisica che impedisce la trascrizione e fattori in grado di modificarne la struttura e la composizione riescono ad attivare o silenziare quei geni (Lauria and Rossi, 2011). Nonostante la forte compattazione, la cromatina deve quindi assicurare la possibilità di trascrizione dei geni: il loro stato di attivazione è correlato non solo a specifici

fattori di attivazione trascrizionale, ma anche alla struttura della cromatina in cui essi si trovano. Tale tipo di regolazione viene definito epigenetico in quanto non è correlato con la sequenza del DNA. Gli istoni giocano un ruolo fondamentale in questo tipo di regolazione, in quanto contribuiscono a modificare il livello di condensazione della cromatina, influenzando l'accesso dei fattori di trascrizione e della RNA polimerasi II (RNAPol II). Tali modificazioni possono essere stabili ed ereditabili, come la metilazione delle citosine a livello del DNA, oppure più dinamiche e variabili, come quelle che coinvolgono i primi 40 aminoacidi circa della "coda" N-terminale di ciascun istone, costituita dalla prima parte della catena aminoacidica che sporge verso l'esterno del nucleosoma (Taiz, 2010). La combinazione delle varianti istoniche e delle modifiche post-trascrizionali vanno a costituire il cosiddetto "codice istonico", che gioca un ruolo chiave nella struttura della cromatina e così determina lo stato trascrizionale ed il livello di espressione dei geni. L'acetilazione delle lisine (K), la fosforilazione, l'ubiquitinazione e la trimetilazione della lisina K4 sull'istone H3 sono modifiche che determinano l'attivazione trascrizionale dei geni presenti in quella porzione di cromatina, viceversa la deacetilazione, la dimetilazione delle lisine K9 e K27 sull'istone H3, la biotinilazione, e la metilazione delle citosine a livello del DNA determinano un maggior compattamento della struttura cromatinica e l'inibizione trascrizionale (Chinnusamy et al. 2009). Questo tipo di regolazione è di notevole interesse in quanto si ritiene che le condizioni ambientali, in particolar modo quelle stressanti, possono indurre modificazioni conformazionali della cromatina. I geni di resistenza di un individuo, presenti nel suo genotipo, fondamentali nel determinarne la risposta adattativa alle condizioni avverse, ma la velocità e l'intensità con cui essi vengono espressi spesso sono influenzate dallo stato della cromatina che li circonda, dettato da modifiche di natura epigenetica. Alla i fattori di rimodellamento della cromatina, come varianti istoniche e modificazioni istoniche post-traduzionali, che

possono modulare l'attivazione o il silenziamento genico, giocano un ruolo di fondamentale importanza nella capacità di tolleranza agli stress nelle piante.

3.7 Le deacetilasi istoniche

Negli eucarioti l'acetilazione e deacetilazione delle code N-terminali istoniche sono direttamente correlate, rispettivamente, con l'attivazione e l'inibizione trascrizionale, in quanto gli enzimi acetiltransferasi (HATs) trasferiscono un gruppo acetile sui residui aminici delle lisine (K), annullando la loro carica positiva e di conseguenza diminuendo l'affinità per il DNA. I gruppi acetilici creano inoltre un ingombro sterico tale da destabilizzare la struttura del nucleosoma. Questo si traduce in una riduzione della compattezza strutturale della cromatina che diviene più lassa, permettendo l'accesso alla doppia elica ai fattori di trascrizione ed alla RNAPol II. I principali bersagli dell'acetilazione sono i residui di lisina K9, K14, K18 e K23 sull'istone H3 ed i residui K8, K12, K16 e K20 sull'istone H4, ma in realtà ogni nucleosoma ha più di 20 target di acetilazione (Hollender et al. 2008). Le deacetilasi istoniche (HDACs) invece rimuovono i gruppi acetilici, ripristinando il livello di compattezza iniziale. Entrambi gli enzimi consistono in complessi multi proteici e sono codificati da famiglie geniche, oltretutto il loro alto grado di conservazione in lieviti, animali e piante testimonia la loro importanza nei meccanismi di regolazione trascrizionale (Aquea et al. 2010). Questi due processi avvengono in flusso continuo all'interno della cellula: la durata media di un gruppo acetile varia nell'ordine dei minuti od ore. Questo sistema di rimodellamento della cromatina e controllo della trascrizione genica è particolarmente importante nelle piante che si contraddistinguono dagli altri essere viventi per la grande flessibilità del comportamento cellulare, una caratteristica che richiede una forte modificazione dei profili di espressione genica. Oltre a giocare un ruolo fondamentale nei processi di sviluppo e differenziamento della pianta, questi enzimi sono spesso coinvolti nella regolazione genica in risposta a condizioni di stress, durante i quali la pianta,

essendo un organismo sessile, deve modificare il proprio trascrittoma. Risulta evidente che le HDACs sono una classe importante di regolatori globali della trascrizione e rivestono un ruolo chiave nello sviluppo, difesa e adattamento della pianta (Hollender et al. 2008). Lo dimostra il fatto che l'espressione di molte deacetilasi istoniche sia influenzata da sostanze ormonali vegetali quali JA ed acido salicilico (SA), che generalmente mediano le risposte di difesa della pianta, e ABA, l'ormone vegetale che segnala lo stress idrico e modula il bilancio osmotico della pianta (Fu W. et al. 2007). In accordo con Aquea et al.(2010) le HDACs possono essere raggruppate in tre famiglie: la prima è omologa all'enzima Sir2 di lievito, la seconda, l'HD2, è presente solo nelle piante, la terza, la più conservata e studiata negli organismi eucarioti, è definita RPD3/HDA1. Quest'ultima, sulla base di studi filogenetici, può essere suddivisa in classe I (RPD3-like), classe II (HDA1-like) e classe IV (comprendente geni ortologhi dell'HDA2 di *Arabidopsis thaliana*) (Aquea et al. 2010). In *Vitis vinifera* sono stati identificati 13 geni codificanti HDACs, di cui uno appartenente alla famiglia HD2, due appartenenti alla famiglia Sir2 e le restanti appartenenti alla famiglia RPD3/HDA1 e suddivise nelle classi precedentemente illustrate. Un'analisi di mappaggio ha rivelato che esse sono distribuite nei cromosomi di vite ad eccezione dei cromosomi 1, 2, 10, 13 e 16, mentre il 17 è quello che presenta il maggior numero di deacetilasi istoniche (Aquea et al. 2010). L'albero filogenetico elaborato da Aquea et al.(2010), che mette in relazione le deacetilasi istoniche appartenenti alla famiglia RPD3/HDA1 di *A. thaliana*, riso, pioppo e *V. vinifera*, sulla base della conservazione delle loro sequenze proteiche, è riportato in fig.2. In virtù della distanza filogenetica tra i vari enzimi, sono state individuate le correlazioni che intercorrono tra le deacetilasi di *A. thaliana*, specie modello per le dicotiledoni e quelle di vite. Nella tab.1 sono riportate le dieci HDACs di *V. vinifera* ortologhe alle rispettive HDACs di *A. thaliana*, appartenenti alla famiglia RPD3/HDA1.

HDACs <i>V. vinifera</i>	classe	ID gene	HDACs <i>A. thaliana</i>
HDA6901	I	VIT_14s0006g01820	HDA19
HDA6902	I	VIT_03s0038g04240	HDA19
HDA6903	II	VIT_17s0000g04120	HDA15
HDA6904	II	VIT_06s0080g00210	HDA8
HDA6906	I	VIT_17s0000g09070	HDA6
HDA6907	I	VIT_15s0021g00610	HDA9 (10-17)
HDA6908	II	VIT_17s0000g07280	HDA5
HDA6909	I	VIT_06s0061g01510	HDA9 (10-17)
HDA6910	IV	VIT_04s0008g00910	HDA2
HDA6911	II	VIT_04s0044g01510	HDA14
	II	VIT_04s0044g01510	HDA14

Tab.1

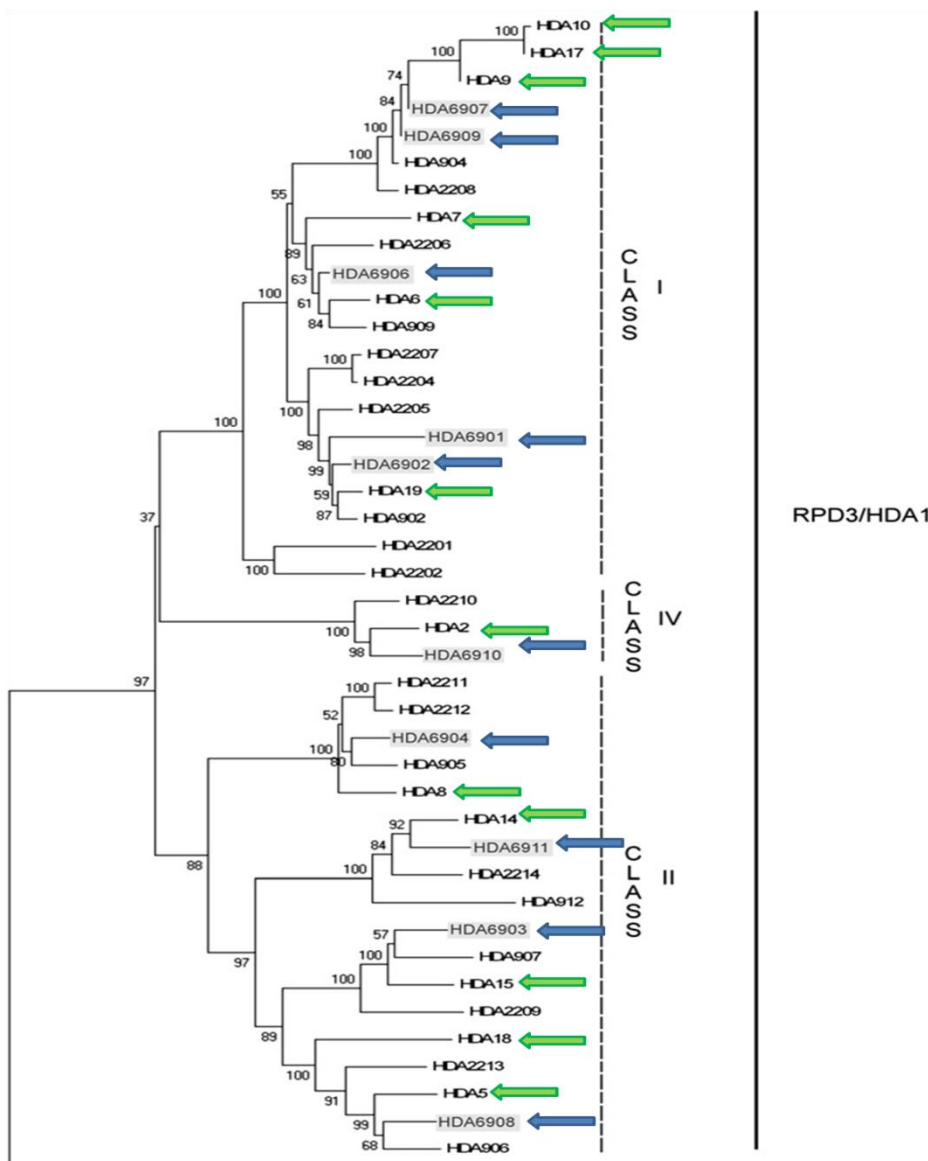


Fig.2: albero filogenetico rappresentante la relazione filogenetica delle deacetilasi istoniche in *Arabidopsis thaliana*, evidenziate con frecce verdi, *V. vinifera*, evidenziate con frecce blu, riso e pioppo (Aquea et al. 2010)

Nell'ambito di questo lavoro di tesi, l'attenzione è stata focalizzata sui geni HDA6 e l'HDA19 di *A. thaliana*, entrambi appartenenti alla classe I della famiglia delle deacetilasi RPD3/HDA1, poiché esse sono state ben caratterizzate in *Arabidopsis* e sembrano coprire un ruolo importante nella regolazione epigenetica, in quanto vengono attivate da segnali ormonali e di stress e inoltre sono implicate nei processi di germinazione, sviluppo fiorale e senescenza fogliare (Chinnusamy et al. 2009). Data la similarità di questi due enzimi, sia dal punto di vista strutturale che funzionale, in *A. thaliana* essi sembrano prendere parte agli stessi processi talvolta in maniera ridondante, ad esempio nella regolazione genica mediata dall'ABA durante lo stress idrico e salino (Chen L.T. et al. 2010). Nel dettaglio, *AtHDA19*, espressa a livello del nucleo, è coinvolta nella regolazione genica durante la risposta agli stress biotici ed abiotici, mentre *AtHDA6*, espressa a livello del nucleolo, sembra essere coinvolta nel silenziamento di transgeni e trasposoni, mantenendo il corretto modello di metilazione del DNA (Hollender et al. 2008). Per quanto concerne *Vitis vinifera*, i geni ortologi di *AtHDA19*, HDA6901 e HDA6902, risultano essere posizionati rispettivamente nei cromosomi numero 14 e 3, mentre l'ortologo di *AtHDA6*, HDA6906, risulta essere collocato nel cromosoma 17 (Aquea et al. 2010). I trascritti di questi tre geni in vite sono stati rinvenuti nei tessuti di foglia, fiore, frutto e radice e questo suggerisce la loro implicazione nei principali processi vitali della pianta (Aquea et al. 2010). La struttura delle deacetilasi di *V. vinifera*, contenente i domini conservati delle famiglie a cui essi appartengono, fa pensare che esse possano svolgere una funzione simile a quella dei rispettivi geni ortologi descritti in altre specie (Aquea et al. 2010), pertanto un'analisi più completa dei geni codificanti per questi enzimi può mettere in luce la loro funzione in relazione alla risposta agli stress abiotici.

4. OBIETTIVO DELLA TESI

Oggi la vitivinicoltura rappresenta un'attività economica di grandissimo rilievo che si sta diffondendo in tutto il mondo. I cambiamenti climatici, che stanno portando a periodi siccitosi sempre più lunghi, l'espansione di questa coltura verso territori molto diversi da quelli di origine, ai quali le piante non sono adattate e la necessità di ridurre gli input energetici, stanno mettendo in luce la necessità di selezionare nuovi genotipi che si adattino meglio alle nuove condizioni ambientali. Poiché la coltivazione della vite si basa sull'utilizzo del portainnesto, che deve essere resistente alle malattie e assicurare un afflusso di nutrienti alla chioma in ogni condizione, il processo di selezione si sta focalizzando maggiormente sulla identificazione di portainnesti resistenti alle nuove condizioni colturali e tolleranti a diversi fattori di stress. Questo lavoro di tesi si inserisce nell'ambito del progetto AGER-SERRES, che si occupa della selezione di portainnesti di vite resistenti agli stress abiotici, *in primis* la scarsa disponibilità idrica e l'elevata concentrazione salina, una condizione tipica dei terreni europei rispetto a quelli americani da dove provengono i portainnesti selezionati, e lo sviluppo e valutazione di marcatori fisiologici e molecolari che possano essere utili nella individuazione precoce (MAS) di genotipi resistenti. Sono stati presi in esame due portainnesti di vite: M4 (*Vitis vinifera* × *V. berlandieri*) × *V. berlandieri*, un genotipo sperimentale che presenta un vigore medio o elevato, ottima resistenza alla siccità ed elevata resistenza alla salinità, e 101.14 (*V. riparia* × *V. rupestris*), un portainnesto commerciale largamente utilizzato nelle normali pratiche agronomiche e particolarmente sensibile agli stress. Il fatto di comparare due genotipi con caratteristiche così marcatamente diverse, consente di evidenziare i meccanismi alla base della diversa tolleranza agli stress, concentrando l'attenzione sulla regolazione epigenetica della risposta e, in particolare, sui geni che codificano per le deacetilasi istoniche. In un primo

momento si è cercato di identificare nei portainnesti i geni ortologhi di *A. thaliana* HDA19 e HDA6, ritenuti importanti per la risposta agli stress . A tale scopo sono state utilizzate tecniche di biologia molecolare quali PCR, clonaggio e sequenziamento, al fine di verificare il livello di conservazione di tali geni e la loro attività in vite, soprattutto durante la risposta allo stress da carenza idrica. Grazie alla successiva disponibilità delle sequenze genomiche dei due portainnesti, sviluppate nell'ambito del progetto SERRES, si è deciso di effettuare un'analisi più completa ed esaustiva della famiglia RPD3/HDA1 di deacetilasi istoniche in vite. Basandosi sulle sequenze proteiche riportate nell'articolo di Aquea et al. (2010), è stata compiuta un'analisi bioinformatica delle 10 deacetilasi istoniche della famiglia RPD3/HDA1 presenti in *Vitis vinifera*, al fine di caratterizzarne le sequenze nucleotidiche, aminoacidiche ed i domini funzionali per mettere in luce eventuali differenze strutturali che possano giustificare un'attività nella risposta allo stress idrico. Una volta ottenute informazioni concernenti la struttura di tali geni e dei rispettivi enzimi, sono stati analizzati i dati trascrittomici ottenuti mediante un approccio di RNAseq, una tecnica che permette di analizzare l'intero trascrittoma, effettuata sui due portainnesti valutati sottoposti a stress idrico, per verificare i livelli di espressione delle deacetilasi in questione. Si è cercato quindi di ottenere un quadro completo della famiglia RPD3/HDA1 di deacetilasi istoniche nei genotipi M4 e 101.14 di vite, dal punto di vista strutturale e funzionale, al fine di individuare l'eventuale presenza deacetilasi attive nella risposta allo stress idrico.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Legenda

cDNA= DNA complementare all' mRNA

ddH₂O= acqua bidistillata

DNasi= desossiribonucleasi

dNTPs= 3'-deossinucleosidi trifosfato

EDTA=etilendiamminotetracetato

EtOH=etanolo

g=grammo

gg= giorni

h=ora (hh= ore)

Kb= kilobasi

mL= millilitro

ng= nanogrammo

Pb= paia di basi

PCR= reazione a catena della polimerasi

PN= Pinot noir

RPM= giri al minuto

SNPs= Single Nucleotide Polymorphisms

TAE= tris-acido acetico-EDTA

TRIS= tris-idrossimetil-amminometano

X-Gal= 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside

μL= microlitro

5.2 Tamponi, soluzioni e mezzi colturali

Tampone Tae 50×

COMPONENTE	QUANTITÀ
Tris base	242 g
Acido acetico glaciale	57,1 mL
0,5 M EDTA pH8	100 mL
H ₂ O	portare V a 1L

Tampone TAE 1×

COMPONENTE	VOLUME 1 L
buffer TAE 50×	20 mL
H ₂ O	980 mL

Terreno di coltura Luria-Bertani (LB)

COMPONENTE	QUANTITÀ
Tryptone	10g
Yeast extract	5g
NaCl	10g
ddH ₂ O	Portare a V 1 L
Agar (solo per il terreno solido)	15g

Terreno di coltura SOC

COMPONENTE	Concentrazione finale
Tryptone	2%
Yeast extract	0,5%
NaCl	10mM
KCl	2,5mM
MgCl	10mM
MgSO ₄	10mM
glucosio	20mM

5.3 Materiale vegetale per le analisi di risposta allo stress idrico con approccio *genome-wide*

Nell'ambito del progetto AGER-SERRES è stata compiuta un'analisi trascrizionale dei portainnesti M4 e 101.14 di vite in condizioni normali e di stress idrico mediante un approccio di RNAseq, al fine di individuare geni che possano svolgere un ruolo importante nella resistenza a questo tipo di stress nel portainnesto sperimentale M4 rispetto al portainnesto 101.14. Il protocollo sperimentale per valutare il comportamento dei due portainnesti in condizioni controllate di carenza idrica è illustrato nella Fig. 3:

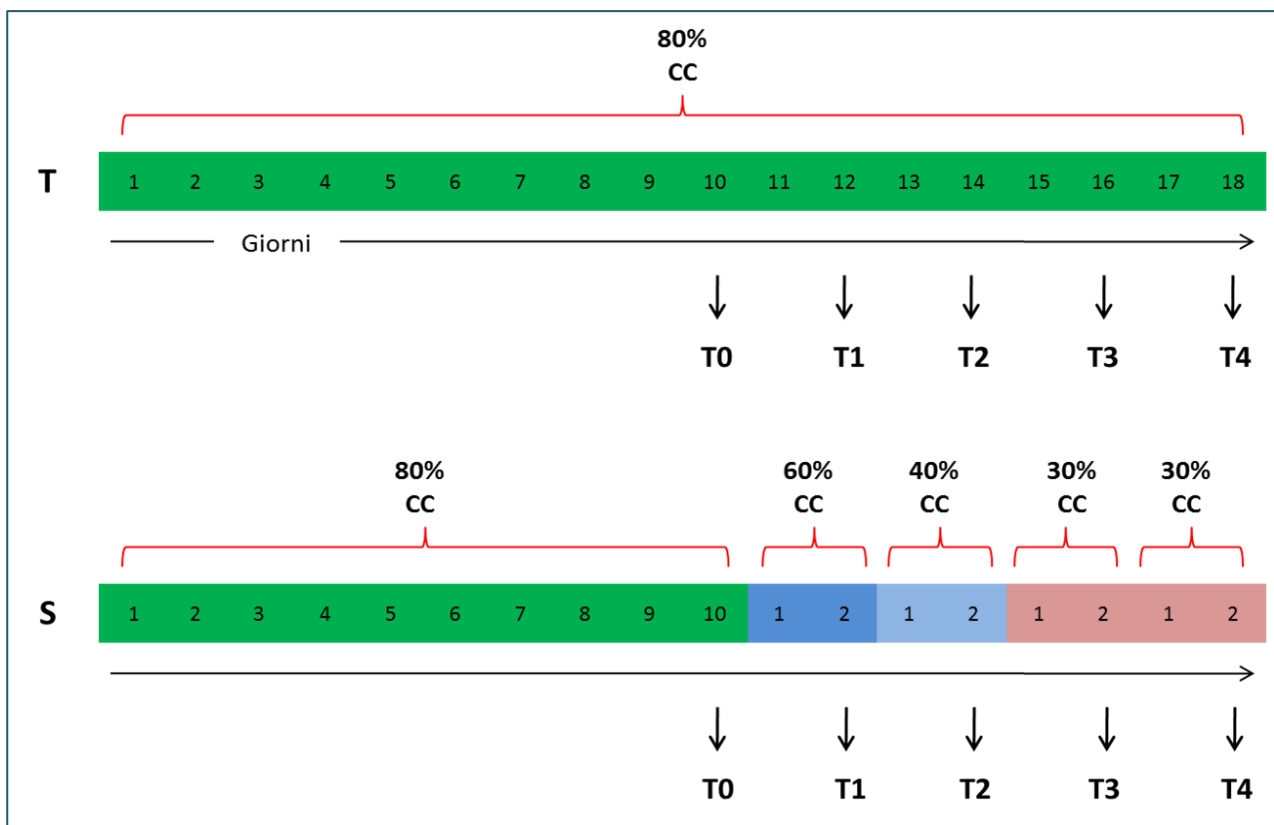


Fig.3

Per ogni genotipo sono stati mantenuti dei campioni di controllo in condizioni standard (T), mantenuti all' 80% della capacità di campo in modo da rapportare i dati ottenuti da essi con quelli ottenuti dai campioni sottoposti a stress (S).

La sigla "CC" indica la capacità di campo, ossia una costante idrologica del terreno che definisce il massimo delle riserve idriche nel terreno utilizzabili dalla pianta in termini di umidità percentuale. Il metodo per rilevare l'umidità del terreno consiste nel sottoporre un campione di terreno a pesatura a temperatura ambiente, dopodiché sottoporlo ad essiccazione in stufa ad un temperatura maggiore di 100°C, pesandolo ad intervalli di tempo prestabiliti. Il campione viene considerato essiccato quando due pesate consecutive a seguito dell'essiccazione presentano lo stesso valore. Il valore di umidità è dato dalla seguente formula:

$$U(\%) = \frac{\text{pesoumido} - \text{pesosecco}}{\text{pesosecco}} \cdot 100$$

Dove il peso umido è quello del campione a temperatura ambiente, il peso secco è quello relativo al campione essiccato, rilevato nelle ultime due pesate.

T0, T1, T2, T3, T4, rappresentano i time points in cui sono stati prelevati i tessuti da analizzare. Il fatto di prelevare i campioni a più riprese permette di conoscere le tempistiche con cui determinati geni possono venire attivati o silenziati.

Ogni campione di foglie e radici era costituito da un pool di cinque piante. Tutti i campioni sono stati analizzati in due repliche biologiche.

5.4 Caratterizzazione delle sequenze codificanti i geni HDA6901, HDA6902 e HDA6906 nei portainnesti M4 e 101.14

Durante la prima fase di questo lavoro di tesi, l'attenzione si è focalizzata principalmente sui geni HDA6 ed HDA19 di *A. thaliana*, in quanto essi, in base alla letteratura, svolgono un ruolo importante nella regolazione epigenetica di risposta agli stress e nello sviluppo della pianta. Inizialmente, non disponendo delle sequenze genomiche dei due portainnesti M4 e 101.14 di vite, si è cercato di verificare il grado di conservazione di questi enzimi nei portainnesti analizzati, caratterizzando le sequenze nucleotidiche che li compongono mediante tecniche di biologia molecolare. È stata condotta un'analisi *in silico* al fine di ottenere le sequenze esoniche dei tre geni presi in analisi in *V. vinifera*, che ci sono servite come punto di partenza per caratterizzare tali sequenze nei portainnesti M4 e 101.14. Sono stati utilizzati gli identificativi proteici relativi alle tre deacetilasi considerate riportati nell'articolo di Aquea et al.(2010), relative al genotipo Cabernet- Sauvignon (C-S) di *Vitis vinifera*, che sono stati inseriti nella sezione "protein" del database dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), al fine di ottenere la sequenza aminoacidica completa di ogni enzima. Il file Fasta di ogni sequenza è stato inserito nel programma Blastp con riferimento al database V1, all'interno della sezione BLAST del sito <http://genomes.cribi.unipd.it/grape/>, dove è depositato il genoma della vite, il genotipo PN40024, altamente omozigote, con lo scopo di ottenere l'identificativo genico della sequenza proteica inserita. Tale identificativo è stato poi utilizzato per ricercare la sequenza nucleotidica dei tre geni all'interno del genoma di PN40024, nella sezione Genome Browser del medesimo sito. Questo processo ha consentito di ottenere le sequenze nucleotidiche dei geni analizzati, con annotate le sequenze esoniche ed introniche. Utilizzando il software Geneious, è stato possibile eliminare le sequenze introniche di ogni gene e mantenere quelle esoniche, che sono state

utilizzate per il disegno di primers specifici, fondamentali per la caratterizzazione dei singoli geni analizzati.

5.5 Estrazione dell' RNA:

Questa tecnica permette di estrarre l'RNA, l'acido nucleico a singolo filamento derivante dal processo di trascrizione genica. È stato estratto l'RNA totale da tessuti di foglia e radice dei portainnesti M4 e 101.14 coltivati in serra.

I tessuti di ogni campione sono stati omogeneizzati separatamente con mortaio e pestello sterili mediante l'utilizzo di azoto liquido. Questa è una fase cruciale al fine dell'estrazione dell'RNA perché questo, data la sua instabilità e vulnerabilità verso le RNAsi, deve essere preservato integro, pertanto è fondamentale che il campione non si scongeli durante l'operazione. Anche gli strumenti utilizzati (mortaio, pestello, spatoline) sono stati precedentemente sterilizzati in stufa a 180 °C per almeno 6 ore al fine di abbattere il rischio della presenza di RNAsi e di eventuali residui di DNA e RNA ambientali che potrebbero contaminare il campione. I campioni sono stati aliquotati in quantità di circa 0.03g in eppendorf da 2mL raffreddate preventivamente in azoto liquido onde evitare lo scongelamento dei tessuti. Per l'estrazione dell' RNA è stato utilizzato lo *SPECTRUM PLANT TOTAL RNA KIT (Sigma-Aldrich)* ed è stato seguito il protocollo più idoneo per l'estrazione di RNA da materiale vegetale ricco di acqua e metaboliti secondari e ad esso sono state apportate alcune modifiche per renderlo più performante per l'utilizzo in vite. Il protocollo si sviluppa nei seguenti step:

- a. preparare una soluzione di lisi con Lysis buffer + 10µL di β -mercaptoetanololo per ogni mL di lysis buffer
- b. porre 500 µL di soluzione di lisi in ogni grindato e vortexare per 30", incubare 3'- 5' a 56 °C utilizzando un bagnetto termostato e centrifugare 3' alla massima potenza

- c. inserire la filtration column in una eppendorf da 2mL, inserirvi il surnatante (cercando di non prelevare anche il pellettato) e centrifugare 1' al massima potenza
- d. eliminare la filtration column ed aggiungere 750 μ L di binding solution nel chiarificato, pipettando 5 volte per miscelare la soluzione
- e. inserire la binding colmun in una nuova eppendorf da 2 mL, inserirvi 700 μ L di soluzione, centrifugare 1' alla massima potenza ed eliminare il liquido per versamento. Ripetere tale ciclo anche per il restante quantitativo di soluzione.
- f. 1° lavaggio: Aggiungere 300 μ L di wash solution1 nella colonnina e centrifugare 1' alla massima potenza
- g. Aggiungere ad ogni digestione 10 μ L di DNAsi + 70 μ L di DNAsi buffer e incubare 15' a temperatura ambiente per degradare il DNA
- h. 2° lavaggio: Aggiungere 500 μ L di wash solution 2 e centrifugare 1' alla massima potenza
- i. 3° lavaggio: Aggiungere 500 μ L di wash solution2 e centrifugare 30" alla massima potenza
- j. Centrifugare a secco 1' alla massima potenza per rimuovere totalmente l'etanolo.
- k. Eluizione: inserire la colonnina in una nuova eppendorf, aggiungere 30 μ L di eluition buffer (direttamente al centro della membrana), incubare 1' a T ambiente, centrifugare 1' alla massima potenza
- l. Seconda eluizione uguale alla precedente
- m. Conservare a -4°C per un uso immediato o a -80°C per preservare l'RNA per più tempo

5.6 Corsa elettroforetica:

La corsa elettroforetica è una tecnica che permette di separare le molecole (in questo caso gli acidi nucleici), sfruttando la loro carica elettrica, in base al loro peso

molecolare, al fine di stimarne la quantità e qualità. In particolar modo si sfrutta la carica negativa che caratterizza gli acidi nucleici che, se sottoposti ad un campo elettrico, migrano verso il polo positivo. La velocità di migrazione è inversamente proporzionale alle dimensioni delle molecole, quindi molecole con peso minore migrano più velocemente. Lo strumento con il quale si esegue questa tecnica è costituito da una vaschetta di plastica, collegata ad un generatore di corrente, nella quale si origina un campo elettrico mediante due elettrodi con polarità opposta. All'interno della vaschetta vengono posti il gel di agarosio ed il tampone di corsa. Quando l'agarosio polimerizza va a formare dei micropori attraverso i quali passano gli acidi nucleici. Si utilizzano gel con concentrazione di agarosio diversa in base alle molecole che si analizzano poichè a diversa concentrazione corrisponde una diversa capacità di separazione delle molecole da parte del gel. Quindi si prepara una soluzione contenente il tampone TAE 1x, agarosio nella concentrazione voluta e un agente intercalante degli acidi nucleici (si è utilizzato il *sybrsafe Invitrogen* 10'000x alla concentrazione finale 1x) e che permette la loro visualizzazione grazie alla sua capacità di emettere fluorescenza una volta irradiato con raggi UV. La concentrazione dei gel che sono stati utilizzati varia dallo 0,8 al 2% in base alla lunghezza dei frammenti da separare. Una volta caricati i pozzetti si carica anche un marker di peso molecolare e concentrazione noti, necessario al fine di stimare la lunghezza in paia di basi dei campioni e quantificare gli stessi (si è utilizzato *1kb plus DNA ladder Invitrogen*). Infine si collega lo strumento agli elettrodi e si imposta il voltaggio, che incide sulla velocità di migrazione dei campioni e il tempo di corsa. Questa tecnica è stata utilizzata per verificare la riuscita dell'estrazione dell'RNA, delle reazioni di amplificazione mediante PCR e dell'estrazione del DNA plasmidico ottenuto con il clonaggio.

5.7 Quantificazione al NANODROP:

Il NANODROP è uno spettrofotometro di nuova generazione prodotto da *Thermo scientific* ed è utilizzato per quantificare campioni di diversa natura immersi in micro volumi di soluzione (1 μ L). Esso rapporta i valori di assorbanza rilevati per i diversi campioni in relazione al valore di assorbanza del “bianco”, ossia la soluzione in cui è immerso il campione. Dopo aver inserito la tipologia di molecola da analizzare, lo strumento rileva la concentrazione della stessa espressa in ng/ μ L, i picchi di assorbimento a 260nm per gli acidi nucleici, a 230 nm per i polisaccaridi e a 280 nm per le proteine. Il rapporto 260/230 indica la contaminazione da polisaccaridi e polifenoli, mentre quello 260/280 stima la contaminazione da proteine. Per avere un purificato di buona qualità il primo rapporto deve risultare maggiore di 1, mentre il secondo deve essere compreso tra 1,8 e 2.

5.8 Retrotrascrizione dell'mRNA a cDNA:

Questa tecnica è un'applicazione della normale PCR (vedi paragrafo 5.9) e viene eseguita in quanto l'RNA è una molecola poco stabile, poiché risulta essere soggetto ad una degradazione più rapida rispetto alle altre molecole, pertanto si procede con la sua retro-trascrizione a DNA complementare (cDNA). È stata eseguita la retrotrascrizione dell'RNA totale estratto dai tessuti di foglia e radice dei portainnesti M4 e 101.14, e il cDNA da essa derivante è stato utilizzato come template di partenza per le successive analisi.

In primo luogo l'RNA deve essere quantificato poiché la quantità di RNA richiesto è pari ad 1 μ g. L'enzima di retrotrascrizione necessita di un innesco per la polimerizzazione, e questo è rappresentato da un primer *oligo dT* che si appaia alla coda di poli-A presente al 3' in ogni mRNA eucariotico. Per la reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato il *TRANSCRIPTION FIRST STRAND cDNA SYNTHESIS*

KIT (Roche). Si prepara una soluzione di 13 μ L contenente 2 μ L di primer *oligo dT*, un volume di campione contenente 1 μ g di RNA e il restante volume di H₂O. Si mescola tale soluzione brevemente e la si pone nel termociclatore per 10' a 65°C per favorire l'appaiamento dei primer alla coda poli-A, dopodiché viene raffreddata ed in essa si inseriscono: 4 μ L di 5 \times Rt buffer, 0,5 μ L di protector RNAsi inibitor, 2 μ L di dNTPs, 0,5 μ L di enzima RT. Da qui, avvalendosi sempre del termociclatore, si sottopone la soluzione ad una temperatura di 55°C per 30' per permettere all'enzima retrotrascrittasi di sintetizzare il filamento di cDNA, dopodiché esso viene inattivato a 85°C per 5'. Infine si raffredda la soluzione in ghiaccio.

5.9 PCR (Polimerase Chain Reaction)

La PCR è una tecnica che sfrutta l'azione dell'enzima DNA polimerasi per amplificare determinate sequenze di DNA inserite tra due sequenze note. Proprio su tali sequenze vengono costruiti dei primers (un forward e un reverse) con l'estremità 3'-OH libera che fungono da innesco per l'enzima. Ogni reazione di PCR consta di una prima fase di denaturazione del template, in cui esso viene sottoposto a 94°C per 5-10' affinché avvenga la separazione dei filamenti della doppia elica. A seguito della fase di denaturazione si passa alla fase ciclica (ripetuta generalmente dalle 25 alle 35 volte) costituita da 3 fasi:

1. DENATURAZIONE : il DNA stampo si denatura alla temperatura di 94°C per 30-60"
2. APPAIAMENTO: gli inneschi si appaiano in maniera specifica alle sequenze a loro complementari. La temperatura di questa fase è dettata dalla temperatura di melting dei primers, derivata dalla loro lunghezza e dal loro contenuto in GC

3. ESTENSIONE: la Taq polimerasi sintetizza i nuovi filamenti sfruttando i primers come inneschi. Le Taq polimerasi che sono state utilizzate agiscono alla temperatura di 72°C ed il tempo della fase di estensione varia in base alla lunghezza del frammento da amplificare rispetto alla processività dell'enzima stesso.

Infine il campione viene sottoposto ad una temperatura di 72°C per 10' per permettere all'enzima di terminare eventuali amplificati iniziati ma non portati a termine, e poi mantenuto 4°C. Tutti questi passaggi vengono eseguiti grazie ad uno strumento chiamato termociclatore, il quale viene impostato sul programma della reazione da eseguire.

5.9.1 Scelta dei primers

Il disegno dei primers è di fondamentale importanza in quanto questi devono avere temperature di melting il più simile possibile ed avere caratteristiche tali da assicurare la specificità di appaiamento alle sequenze volute senza appaiarsi tra loro. Per il disegno dei primers è stato utilizzato il "primer 3 Plus software", un programma informatico grazie al quale si ottengono le sequenze degli inneschi in base a specifici requisiti. I primers sono stati costruiti sulle sequenze esoniche dei geni HDA6901, HDA6902 ed HDA6906 del genotipo PN40024 di *V. vinifera*, ricavati mediante l'analisi *in silico* precedentemente descritta nel paragrafo 5.4. Per quanto riguarda i geni HDA6901 e HDA6902, essi sono entrambi ortologhi all' *AtHDA19* (Aquea et al. 2010), per cui risultano avere sequenze molto simili. Supponendo che regioni conservate o più polimorfiche rilevate in PN40024 possano essere tali anche nei due genotipi analizzati, sono state sfruttate delle regioni con numerosi SNPs per costruire dei primers specifici al fine di discriminare i due geni. Inoltre è stata costruita una coppia di primers, comuni ad entrambi i cromosomi poiché

complementari a regioni più conservate, da sostituire ai primers forward o reverse specifici in caso di un mancato funzionamento degli stessi (Fig.4). Per quanto riguarda l'HDA6906, posizionata sul cromosoma 17, sono state costruite due coppie di primers, una più interna e l'altra più esterna (Fig.5). Un parametro importante da tenere in considerazione è la lunghezza dell'amplificato da ottenere, che permette di intuire, mediante un corsa elettroforetica, se quello amplificato è effettivamente il frammento voluto.

Nella tabella 2 sono riportate le informazioni relative ai primers utilizzati:

primer	sequenza	Tm (°C)	Lunghezza frammento
HDA6901_ch14_Fw1509	GCTGATGGGGTGAAGAGAAA	60,2	1509 bp
HDA6901_ch14_Fw1358	GCCCACTATGGATTGCTTCA	61	1358 bp
HDA6901_ch14_RevFull	CATGACTTCGGGAACGTCG	62,6	
HDA6902_ch3_Fw1160	TGACACATGCTCTCCTAGCC	59	1160 bp
HDA6902_ch3_Fw1143	GCCCACTATGGATTGCTTCA	61	1143 bp
HDA6902_ch3_RevFull	TGGCTTTGGGTACATCTGGA	61,44	
HDA6901-2_Fwcommon	TGGCAATCTTGGAGCTTCTT	59,96	890
HDA6901-2_Revcommon	CTATTGGCATAGGGCACACA		
HDA6906_ch17_Fw1076	GGCGCATAACTTGGTTGTTC	60,51	1076 bp
HDA6906_ch17_Rev1076	TGATTTTTCCAGTGACACCC	58,39	
HDA6906_ch17_Fw895	GCTGGTCCAGATGATATCCG	60,45	895 bp
HDA6906_ch17_Rev895	TCCAAATGCGAGGTTTAGGT	60,07	

Tab.2

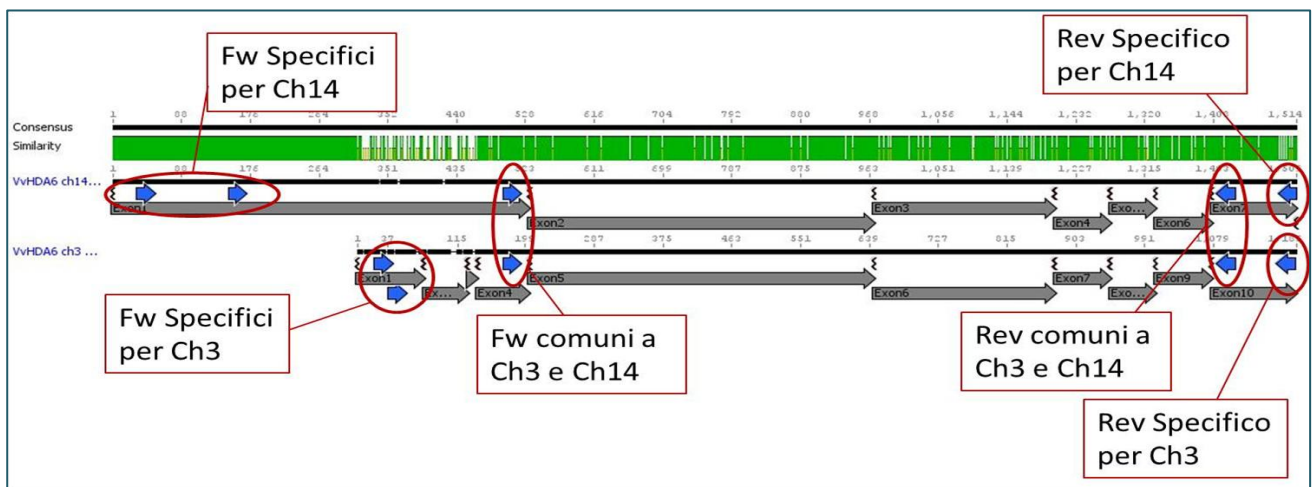


Fig.4

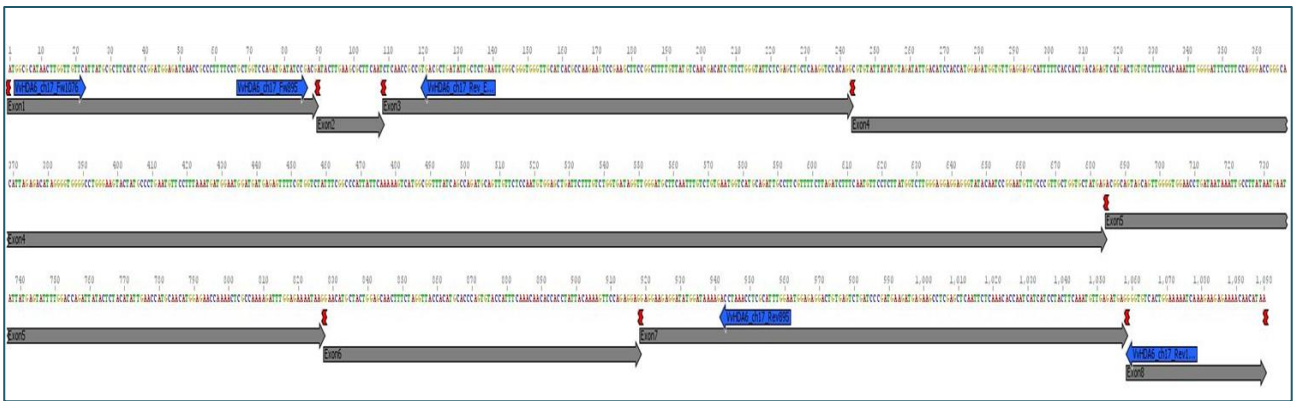


Fig.5

5.9.2 Scelta dell'enzima DNA polimerasi

In commercio esistono diversi tipi di DNA polimerasi, ognuna con proprie caratteristiche di processività, temperatura ideale e soprattutto di fedeltà di amplificazione. Bisogna tener conto delle caratteristiche dell'enzima che si vuole utilizzare al fine di programmare il termociclature nelle condizioni e tempistiche ideali per l'enzima stesso. Per le prove di funzionamento dei primers è stato utilizzato il Mango mix 2× (*Bioline*), una miscela di reazione contenente la Taq polimerasi e il relativo buffer, i dNTPs ed un colorante che permette il caricamento diretto su gel.

Una reazione da 15µL prevede l'utilizzo dei seguenti quantitativi di reagenti:

COMPONENTE	VOLUME
Mango mix2×	7,5 µL
Primer forward 10mM	1 µL
Primer reverse 10mM	1 µL
ddH ₂ O	4,5 µL
cDNA	1 µL

Una volta constatato il corretto appaiamento degli inneschi, è stata utilizzata la polimerasi High Fidelity (*Bioline*), un enzima che possiede attività di proof-reading (correzione bozze) 3'-5' in grado di compiere la correzione di eventuali errori

durante la sintesi, allo scopo di ottenere la sequenza più accurata possibile. Al fine di diminuire la formazione di prodotti aspecifici, si è utilizzato l'additivo "BioStab PCR optimizer" (Sigma-Aldrich).

Una reazione da 25µL prevede l'utilizzo dei seguenti quantitativi di reagenti:

COMPONENTE	VOLUME
5× high fidelity reaction buffer	5 µL
10 mM dNTPs mix	2,5 µL
Primer forward 10mM	1 µL
Primer reverse 10mM	1 µL
Polimerasi high fidelity	0,5 µL
BioStab	5 µL
H ₂ O	9 µL
cDNA	1 µL

5.9.3 Applicazioni della PCR:

- 1. PCR nested:** La differenza principale rispetto alla PCR standard è il template da cui ha inizio la reazione di amplificazione, che risulta essere già un prodotto di PCR. Esso viene diluito e sottoposto ad una nuova reazione di amplificazione utilizzando primer che si appaiano più internamente, con lo scopo di ottenere amplificati a concentrazione maggiore rispetto ad amplificati insufficienti ottenuti con una PCR standard ed avere una maggiore sicurezza che il frammento amplificato sia quello voluto.
- 2. RT-PCR:** vedi paragrafo 5.8
- 3. PCR-colony:** questa tecnica è stata utilizzata durante la procedura di clonaggio, per amplificare gli inserti all'interno del vettore dei batteri trasformati. Nelle soluzioni di amplificazione si inserisce una piccola parte della colonia trasformata, in maniera tale da immettere nella soluzione le cellule che contengono il vettore con l'inserto che verrà amplificato. Si utilizzano specifici

primers che si appaiano direttamente sul vettore, in punti esterni al sito di inserzione del frammento.

5.10 Exofap (M·Medical)

È una tecnica che permette di purificare i prodotti di PCR dai dimeri di primer, dai dNTPs rimanenti nella reazione e dall'enzima Dna polimerasi, con lo scopo di ottenere un amplificato idoneo al sequenziamento, pertanto viene eseguito a seguito di una PCR high fidelity che ci assicura una bassa presenza di errori durante l'amplificazione. Di fondamentale importanza è che non ci siano bande di prodotti aspecifici perché comunque essi costituiscono un prodotto di PCR completo e non verrebbero eliminati con il trattamento. Dopo aver constatato la buona riuscita dell'amplificazione ed appurato l'assenza di bande aspecifiche, il DNA amplificato viene quantificato grazie ad un software che rapporta il segnale emesso dalla banda di amplificato con quello emesso dal marker a concentrazione nota. La reazione ExoFap avviene in un volume di 7,5 µL in cui si inseriscono:

COMPONENTE	VOLUME
Exo I (esonucleasi 1)	0,5 µL
Fap (fast fosfatasi alcalina)	2 µL
Prodotto di PCR	5 µL

5.11 Clonaggio di frammenti di DNA in vettori plasmidici e trasformazione delle cellule competenti:

Il clonaggio permette di ottenere un grande numero di copie di un determinato frammento di DNA, amplificandolo con una Taq polimerasi con attività esonucleasica 3'-5' che assicura un'alta fedeltà della sequenza. Si inserisce quindi il frammento amplificato all'interno di un vettore, nel nostro caso un plasmide, che

verrà inserito a sua volta in cellule competenti di *E. coli* che, replicandosi, aumenteranno le copie del plasmide e di conseguenza anche quelle dell'inserito. Questa tecnica si svolge nelle seguenti fasi:

5. 11.1 Purificazione dell'amplificato

Bisogna verificare la buona riuscita dell'amplificazione mediante una corsa elettroforetica. Se il gel non presenta bande aspecifiche, il prodotto di amplificazione deve essere purificato al fine di eliminare tutti i residui della reazione diversi dall'amplificato stesso. È stato utilizzato il *MIN ELUTE PCR PUFIRIFICATION KIT PROTOCOL (Qiagen)*, che prevede di:

- a. Aggiungere 5 volumi di buffer PB su 1 volume di prodotto PCR
- b. Inserire la colonnina di eluizione in una eppendorf da 2mL, centrifugare 1' alla massima potenza e scartare il liquido
- c. Aggiungere 750 μ L di buffer PE contenente etanolo, centrifugare 1' alla massima potenza e scartare il liquido
- d. Per rimuovere totalmente l'etanolo effettuare un'ulteriore centrifuga a vuoto e asciugare all'aria qualche minuto
- e. Inserire la colonnina in una nuova eppendorf, aggiungere 10 μ L di buffer EB o ddH₂O al centro della membrana per eluire il DNA, incubare 1' a temperatura ambiente e centrifugare 1' alla massima potenza.
- f. Per il clonaggio è preferibile utilizzare immediatamente il campione purificato e non dopo averlo conservato al fine di migliorare l'efficienza della ligazione

5.11.2 Excisione delle bande da gel

Questa tecnica viene messa in atto per utilizzare il DNA contenuto nella banda di un gel di elettroforesi per un clonaggio o per il sequenziamento, quando il gel presenta delle bande aspecifiche. Si procede prima con l'asportazione della banda voluta dal

gel, cercando di prelevare un minor volume di gel possibile, dopodichè le bande estratte vengono poste in eppendorf da 2 mL e si può procedere con la purificazione delle prodotto di amplificazione.

È stato utilizzato il *PURE LINK QUIK GEL EXTRACTION KIT (Invitrogen)*, al quale sono state apportate specifiche modifiche per migliorarne l'efficacia. Il protocollo si articola nei seguenti passaggi:

- a. Inserire 400 mg di gel in una eppendorf da 1,5 mL
- b. Per gel a concentrazione di agarosio < 2% aggiungere 3 volumi di gel solubilization buffer (L3) per 1 volume di gel, mentre per gel > 2% inserirne 6 volumi
- c. Mettere il campione a 50°C per 10' utilizzando un bagnetto termostato e invertire le eppendorf ogni 3' al fine di assicurare la totale dissoluzione del gel
- d. Una volta che il gel è sciolto, incubare ulteriormente 3' a 50°C
- e. Inserire 1 volume di isopropanolo all'interno della soluzione e agitare bene
- f. Pipettare il gel disciolto all'interno della colonnina di estrazione, contenente una matrice silicea in grado legare il DNA, inserita in un "wash tube" (una colonnina per una quantità massima di 400 mg di gel)
- g. Centrifugare a $12'000 \times g$ per 1', eliminare il surnatante e reinserire la colonnina nel wash tube.
- h. Aggiungere 500µL di wash buffer (W1), centrifugare a $12'000 \times g$ per 1', eliminare il permeato rimanente e reinserire la colonnina nel wash tube.
- i. Eseguire un'ulteriore centrifuga di 1-2' a vuoto per rimuovere totalmente l'etanolo eventualmente rimasto a seguito del lavaggio con W1 ed asciugare all'aria 5' per permettere all'etanolo rimanente di evaporare.
- j. Inserire la colonnina in un nuovo recovery tube, aggiungere 30 µL di elution buffer (E5) al centro della membrana e incubare 5' a temperatura ambiente, dopodichè eseguire una centrifuga di 1' a $12'000 \times g$.

Conservare il purificato a 4°C per un uso immediato o a -20°C per una conservazione più lunga.

5.11.3 Preparazione delle piastre di coltura per i batteri trasformati

Vengono preriscaldate a 37°C per 1h delle piastre Petri con terreno LB agarizzato contenente kanamicina ad una concentrazione di 50µg/µL, che permette la crescita delle cellule batteriche e la selezione delle colonie trasformate. Tale substrato viene cosparso omogeneamente con 30 µL di X-Gal ad una concentrazione di 50µg/µL. L'X-Gal è il substrato metabolizzato dalle cellule aventi il vettore integro. Questo avviene perché il vettore pCR II-TOPO utilizzato, presenta il sito di inserzione all'interno del gene *lacZ*, che codifica per l'enzima β-galattosidasi che rielabora il substrato X-Gal in componenti che presentano una colorazione azzurra. Per cui le colonie derivanti da cellule in cui non è presente l'inserito assumeranno una colorazione azzurra, mentre le colonie derivanti da cellule con l'inserito assumeranno colorazione bianca poiché il gene *lacZ* è stato bloccato.

5.11.4 Trasformazione delle cellule competenti con il kit *pCR II TOPO 4.0 DUAL PROMOTER KIT (Invitrogen)*

In questa fase le cellule batteriche top 10 chemically competent fornite dal kit, vengono trasformate con il plasmide sottoponendole ad uno shock termico che destabilizza la permeabilità della membrana plasmatica permettendo l'entrata del DNA esogeno.

In primo luogo il protocollo prevede di preparare una soluzione di ligazione costituita da:

COMPONENTE	VOLUME
dd H ₂ O sterile	3,5µL
Soluzione salina (1,2M NaCl, 0,06M MgCl ₂)	1 µL
DNA purificato	1 o 3 µL
Topo-TA dual (vettore plasmidico)	0,5 µL

L'attività ligasica è resa possibile dalle topoisomerasi legate covalentemente alle estremità del vettore.

Successivamente si pone tale soluzione per 30' a temperatura ambiente e si pongono 2µL di quest'ultima in 50µL di soluzione contenente cellule trasformanti TOP 10 *E.coli* chemically competent, fornite dal kit. Le cellule con il prodotto di ligazione vengono incubati 30' in ghiaccio, quindi si sottopongono ad uno shock termico a 42°C per 30", al fine di permeabilizzare la membrana cellulare e favorire l'entrata del DNA esogeno. Si pone la soluzione in ghiaccio per ulteriori 2', si aggiungono 250µL di terreno SOC e si incuba a per 1h a 37°C in agitazione a 200 rpm. Infine si cospargono le piastre con 30µL o 250µL di coltura cellulare e si incubano a 37°C overnight. Il giorno seguente si controlla presenza dell'inserito mediante un PCR colony, e le colonie che presentano lo stesso verranno coltivate in 5 mL di terreno LB+kan in agitazione a 200 rpm a 37 °C overnight per permettere la crescita delle cellule.

5.12 Estrazione del DNA plasmidico

Una volta constatata la buona riuscita del clonaggio mediante una PCR colony, il plasmide contenente l'inserito deve essere estratto dalle cellule batteriche

trasformate, al fine di poter attuare un sequenziamento del frammento ed ottenere la sequenza nucleotidica dello stesso.

A tale scopo è stato utilizzato il *PURE LINK QUIK PLASMID DNA MINIPREP KIT (Invitrogen)*, facendo attenzione a non utilizzare solventi inibitori del sequenziamento. Esso prevede di pellettare i 5mL di colonia mediante centrifughe seriali di 1-2' alla massima potenza effettuate in eppendorf da 2 mL, eliminando di volta in volta il surnatante ottenuto. Si procede quindi con il protocollo qui riportato:

1. Risospendere le cellule: aggiungere 250µL di resuspension buffer (R3) ad ogni colonia e risospenderla
2. Lisi cellulare: aggiungere 250µL di lysis buffer, mischiare per inversione fino ad ottenere una soluzione omogenea ed incubare 5' a temperatura ambiente
3. Precipitare: aggiungere 350µL di precipitation buffer (N4), mixare immediatamente per inversione e centrifugare 10' a 12'000 rpm
4. Fissare: posizionare la spin column su un wash tube da 2 mL, inserire il surnatante nella spin column, centrifugare 1' a 12'000 rpm, scartare il liquido e riposizionare la spin column sul wash tube
5. Primo lavaggio: aggiungere 500µL di wash buffer (W10), incubare 1' a temperatura ambiente, centrifugare 1' a 12'000 rpm, scartare il liquido e reinserire la spin column sul wash tube
6. Secondo lavaggio: aggiungere 700µL di wash buffer (W9) e centrifugare 1' a 12'000 rpm ed eliminare il liquido di scarto
7. Eliminare l'etanolo: centrifugare a secco 1' ed asciugare i campioni 5' a temperatura ambiente
8. Eluire: inserire la spin column in un recovery tube da 1,5 mL, aggiungere 75µL di dd H₂O, incubare 5' a temperatura ambiente e centrifugare 2' a 12'000 rpm.

5.13 Analisi *in silico* delle deacetilasi appartenenti alla famiglia RPD3/HDA1 nei portainnesti M4 e 101.14 di vite

Nella prima fase in cui è stata svolta questa tesi non si disponeva della sequenze genomiche dei portainnesti M4 e 101.14, che sono state rese disponibili in un solo in secondo momento, e che sono state utilizzate in quanto sono maggiormente affidabili e complete rispetto alle sequenze ottenute mediante le tecniche molecolari precedentemente descritte. Per il sequenziamento del genoma dei due portainnesti è stata utilizzata la versione 5500XL del sequenziatore SOLiD, una piattaforma di sequenziamento di nuova generazione, e le sequenze ottenute sono state mappate sul genoma di riferimento PN40024. Tali sequenze ci hanno permesso effettuare un'analisi *in silico* finalizzata a caratterizzare le dieci deacetilasi appartenenti alla famiglia RPD3/HDA1 dal punto di vista della sequenza nucleotidica oltre che proteica e dei domini funzionali sui portainnesti M4 e 101.14 di vite. Ci si è basati sull'articolo di Aquea et al. (2010) nel quale è presente un elenco completo degli identificativi proteici delle deacetilasi istoniche in *Vitis vinifera*, riportati nella tabella 3:

Nome del gene	ID proteina	ID gene
HDA6901	CAO17081	VIT_14s0006g01820
HDA6902	CAO47564	VIT_03s0038g04240
HDA6903	CAO68018	VIT_17s0000g04120
HDA6904	CAO48768	VIT_06s0080g00210
HDA6906	CAO64265	VIT_17s0000g09070
HDA6907	CAO70460	VIT_15s0021g00610
HDA6908	CAO64436	VIT_17s0000g07280
HDA6909	CAO16664	VIT_06s0061g01510
HDA6910	CAO43792	VIT_04s0008g00910
HDA6911	CAO68538	VIT_04s0044g01510
HDA6911	CAO68540	VIT_04s0044g01510

Tab. 3 HDACs della famiglia RPD3/HDA1 presenti nell'articolo di Aquea et al. e i rispettivi ID genici

Le sequenze nucleotidiche di queste dieci deacetilasi sul genoma di PN40024 sono state ottenute in modo analogo a quello descritto precedentemente per i geni HDA6901, HDA6902 ed HDA6906 relative a PN40024. Una volta ottenute tutte le sequenze nucleotidiche, utilizzando il software Geneious è stato possibile convertire tali sequenze nucleotidiche nelle rispettive sequenze proteiche, annotare le sequenze di interesse come quelle introniche ed esoniche all'interno dei geni e compiere analisi di comparazione tra sequenze omologhe. All'interno di questo programma sono state importate le sequenze genomiche dei genotipi M4 e 101.14 di vite, ottenute consultando il sito web <http://genomics.cribi.unipd.it/~telatin/files/> e, su ognuna di esse, sono state ricercate tutte le deacetilasi istoniche prese in analisi, utilizzando le informazioni di mappaggio genico ricavate precedentemente dal genoma di PN40024, quindi sono state annotate le sequenze esoniche di ogni gene ed eliminate quelle introniche. In questo modo è stata ottenuta la presunta sequenza nucleotidica codificante ognuna delle dieci deacetilasi nei genotipi PN40024, M4, 101.14. Tali sequenze sono state tradotte nelle rispettive sequenze aminoacidiche, sempre mediante l'utilizzo del software Geneious, al fine di eseguire delle analisi comparative dei domini funzionali che caratterizzano ciascun enzima. I domini funzionali enzimatici sono le porzioni della proteina più conservate che contengono il sito catalitico dell'enzima e ne determinano l'attività. Un'analisi di questo tipo può mettere in luce differenze che intercorrono tra enzimi omologhi appartenenti a genotipi diversi e che possono spiegare la loro diversa funzionalità. È stato utilizzato il database disponibile al sito <http://pfam.sanger.ac.uk/search>, all'interno del quale sono state inserite le sequenze aminoacidiche delle 10 deacetilasi in questione relative ai genotipi M4, 101.14, PN40024 e quelle di C-S riportate nell'articolo di Aquea et al. (2010). Il database consente di rilevare la posizione del dominio deacetilasico all'interno della sequenza aminoacidica e ne analizza il grado di conservazione. Utilizzando le coordinate ottenute dal database,

sono stati annotati i domini deacetilasi delle relative sequenze proteiche mediante l'utilizzo di Geneious, per effettuare un'analisi comparativa dei domini funzionali di enzimi omologhi nei quattro genotipi analizzati.

A titolo di esempio è riportato il processo descritto precedentemente per caratterizzare la sequenza nucleotidica ed il dominio funzionale del gene HDA6902:

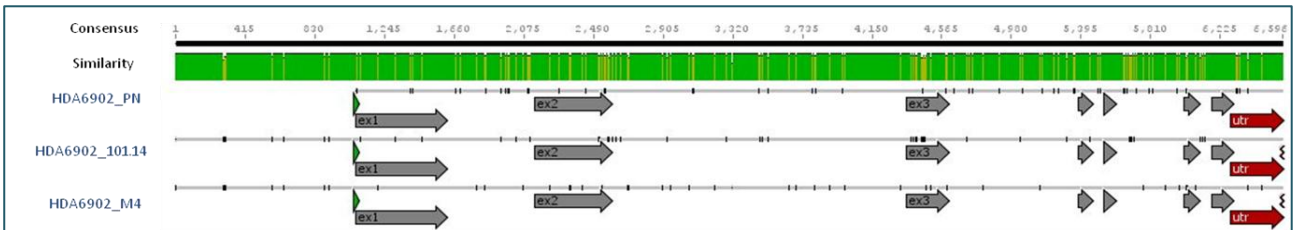


Fig.6: allineamento delle sequenze di DNA genomico del gene HDA6902 nei genotipi di PN40024, 101.14 e M4, in cui sono stati annotati gli esoni sulla predizione del genoma di PN40024 mediante l'utilizzo del software Geneious.

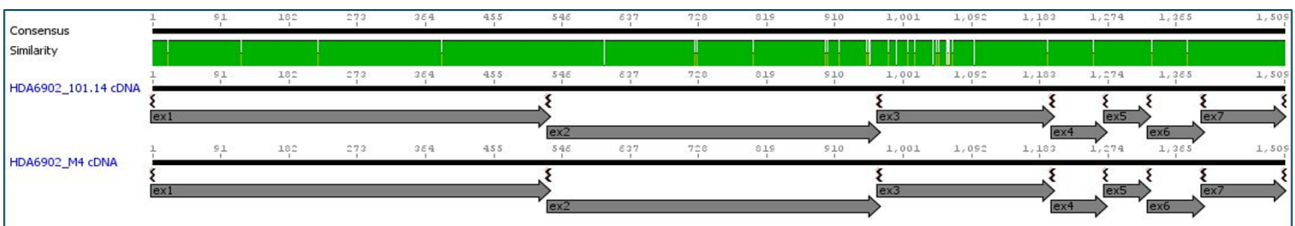


Fig.7: allineamento delle sequenze di cDNA del gene HDA6902 dei genotipi 101.14 e M4

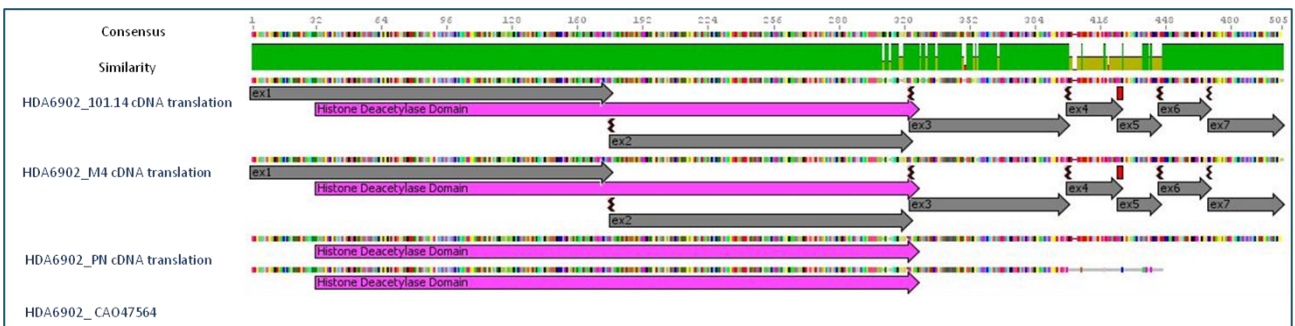


Fig.8: allineamento dei domini funzionali dell'enzima HDA6902 identificati mediante l'utilizzo del database Pfam nei genotipi 101.14, M4, PN40024 e C-S

5.14 Risposta allo stress idrico con approccio *genome-wide*

Una volta caratterizzate le 10 deacetilasi istoniche dal punto di vista strutturale, si è passati ad una caratterizzazione di tipo funzionale attraverso un approccio di RNAseq. Nell'ambito del progetto SERRES è stata eseguita un'analisi trascrizionale sui due portainnesti M4, tollerante allo stress idrico, e 101.14, suscettibile. Il trascrittoma dei due genotipi è stato analizzato separatamente per tessuto fogliare e radicale in condizioni standard e di stress idrico, prendendo in considerazione momenti successivi dall'imposizione dello stress. Il trascrittoma infatti non risulta essere stabile, ma varia in base ai meccanismi attivati dalla pianta come risposta a determinati stimoli endogeni o esogeni. Per l'analisi di RNAseq, è stata utilizzata una piattaforma di sequenziamento di nuova generazione che permette di ottenere informazioni di tipo qualitativo, catalogando tutti i trascritti all'interno del campione, e quantitativo, monitorando il cambiamento dei livelli di espressione di ogni trascritto. Dopo l'estrazione dell'RNA totale dai campioni sperimentali, presso il CRIBI dell'università di Padova sono state preparate le librerie, ottenute mediante la frammentazione dell'RNA con RNase III e la successiva ligazione di adattatori. Per il sequenziamento è stata utilizzata la versione 5500XL del sequenziatore SOLiD, che presenta una tecnologia innovativa di sequenziamento, che la casa produttrice assicura raggiungere una fedeltà di lettura fino al 99,99%. Nell'ambito della grande mole di dati prodotti dalle analisi di RNAseq, ai fini di questa tesi l'attenzione è stata focalizzata sull'espressione delle deacetilasi istoniche appartenenti alla famiglia RPD3/HDA1, per cercare di capire quali di questi enzimi possano svolgere un ruolo importante nella risposta allo stress idrico.

6. RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1 Caratterizzazione delle sequenze codificanti le HDA6901, HDA6902 e HDA6906 nei portainnesti M4 e 101.14

Nella prima fase del lavoro si è proceduto alla caratterizzazione delle sequenze dei geni HDA6901, HDA6902 ed HDA6906 nei portainnesti M4 e 101.14 mediante tecniche di biologia molecolare, con lo scopo di verificarne la conservazione e poter compiere successive analisi di espressione nei due portainnesti in condizioni standard e di stress idrico. Come già accennato in precedenza, sulla base delle analisi filogenetiche eseguite da Aquea et al. (2010), i geni HDA6901 e HDA6902 di vite risultano essere entrambi ortologi all'*AtHDA19*. Le analisi *in silico* effettuate sul genoma del genotipo PN40024 di *V. vinifera*, con le quali sono state ottenute le sequenze esoniche dei geni in esame, hanno messo in evidenza un' elevata similarità tra i due geni e questo ha reso difficile la loro caratterizzazione. Su tali sequenze sono stati costruiti dei primers specifici per l'amplificazione di ciascun gene. L'amplificazione è stata effettuata su cDNA, ottenuto mediante la retrotrascrizione dell'RNA totale estratto da campioni di tessuto fogliare e radicale dei due portainnesti. L'amplificazione mediante PCR ha dato risultati positivi, in quanto si è riusciti ad amplificare in maniera specifica ciascun gene in ogni tessuto, dimostrando che questi geni risultano essere espressi sia a livello radicale che fogliare, in accordo con quanto descritto da Aquea et al. (2010). Successivamente si è cercato di ottenere le sequenze esoniche dei tre geni mediante la tecnica di clonaggio. Una volta estratto il frammento di interesse dalle colonie batteriche, si è proceduto con il suo sequenziamento, che ha dato un esito positivo solamente per i geni HDA6901 e HDA6906, mentre il sequenziamento di HDA6902 non ha avuto successo. Nella tabella 4 sono riportati i geni per i quali il sequenziamento ha dato esito positivo, il

tessuto e il genotipo ad essi relativi, ed il numero di colonie batteriche utilizzate per ogni reazione:

HDACs	genotipo	tessuto	n. colonie
HDA6901	M4	foglia	2
HDA6901	M4	radice	2
HDA6901	101.14	foglia	2
HDA6901	101.14	radice	2
HDA6906	M4	foglia	4
HDA6906	M4	radice	1
HDA6906	101.14	foglia	3
HDA6906	101.14	radice	5

Tab.4

Ogni colonia è stata sequenziata mediante l'utilizzo di entrambi i primers forward e reverse affinché la reazione di sequenziamento riuscisse a coprire tutto il frammento. La necessità di affinare il protocollo di clonaggio per ottenere la sequenza del gene HDA6902 è stata però superata dalla disponibilità dei genomi di M4 e 101.14.

Mentre nel nostro laboratorio si procedeva con le analisi di clonaggio, presso il CRIBI dell'università di Padova, è stato completato il sequenziamento dei genomi di M4 e 101.14, disponibili al sito <http://genomics.cribi.unipd.it/~telatin/files/>, sui quali sono state allineate le sequenze ottenute, mediante l'utilizzo del software Geneious, al fine di verificare l'effettiva riuscita del protocollo di clonaggio. Gli allineamenti hanno confermato che i frammenti amplificati corrispondono ai geni voluti e sono state ottenute sequenze di buona qualità per i geni HDA6901 e HDA6906. A titolo di esempio, nelle fig. 9 e 10 sono riportati gli allineamenti della sequenza del gene clonato HDA6906 sul genoma del relativo portainnesto. Si è pertanto deciso di utilizzare direttamente le sequenze genomiche dei geni di interesse per un'analisi dettagliata delle dieci deacetilasi appartenenti alla famiglia RPD3/HDA1.



Fig.9: allineamento della sequenza del gene HDA6906 di M4 sul relativo genotipo, ottenuta mediante clonaggio in *E. coli*



Fig.10: allineamento della sequenza del gene HDA6906 di 101.14 sul relativo genotipo, ottenuta mediante clonaggio in *E. coli*

6.2 Analisi *in silico* delle deacetilasi appartenenti alla famiglia RPD3/HDA1 nei portainnesti M4 e 101.14 di vite

Una volta rese disponibili le sequenze genomiche dei portainnesti M4 e 101.14 si è proceduto alla comparazione dei domini funzionali delle deacetilasi istoniche nei due genotipi, per verificare il grado di conservazione di tali domini all'interno degli enzimi analizzati ed individuare eventuali differenze che possano spiegare una diversa risposta agli stress abiotici considerati. Per compiere questa analisi è stato utilizzato il database Pfam, nel quale sono depositate numerose famiglie proteiche ottenute grazie ad allineamenti multipli di sequenze effettuati sulla base del modello probabilistico HMM (Hidden Markov model), che individua le porzioni più conservate tra le sequenze prese in analisi, propone la struttura di un dominio funzionale conservato sulla base delle stesse e mette in evidenza i residui altamente conservati, che possono essere correlati al sito catalitico dell'enzima. Una volta inserita la sequenza all'interno della sezione search del database Pfam, viene rilevata la posizione del dominio funzionale all'interno della sequenza aminoacidica inserita ed il grado di conservazione di ogni residuo in relazione al dominio funzionale proposto, in questo caso quello deacetilasico. La famiglia delle deacetilasi istoniche all'interno del database rientra nel livello di qualità Pfam-A, ossia il livello in cui sono presenti le famiglie proteiche meglio caratterizzate ed identificate, offrendo quindi un elevato grado di affidabilità dei risultati ottenuti. La caratterizzazione dei domini funzionali enzimatici si è svolta in due fasi:

In un primo momento sono state inserite nel sito tutte le sequenze proteiche delle deacetilasi istoniche prese in considerazione appartenenti ai genotipi PN40024, M4, 101.14 e C-S, per verificarne il grado di conservazione e la funzionalità e per ottenere informazioni concernenti la posizione del dominio deacetilasico e dei possibili siti catalitici all'interno dell'intera sequenza proteica. Da questa prima analisi si è potuto constatare che tutte le deacetilasi istoniche da noi analizzate

presentano un dominio funzionale strettamente correlato a quello proposto dal database. Le sequenze possono apparire incongruenti, in quanto non combaciano perfettamente con la sequenza consenso HMM, ma nella maggior parte dei casi si tratta di sostituzioni altamente conservate, che quindi non incidono sulla struttura e funzionalità dell'enzima. Un altro aspetto rilevante da tenere in considerazione è che gli aminoacidi ritenuti sede del sito catalitico collimano tutti con le sequenze delle deacetilasi da noi analizzate, ad eccezione del residuo numero 310 dell'HDA6902 di M4 e 101.14, dove un residuo aminoacidico di glicina ha sostituito un acido aspartico, che invece risulta conservato nei genotipi di PN40024 e C-S. L'elevato grado di conservazione delle sequenze rispetto al dominio deacetilasico proposto dal database fa ritenere che tutti gli enzimi siano funzionali.

Successivamente le posizioni catalitiche individuate con questa prima analisi sono state utilizzate per annotare il dominio funzionale nelle sequenze proteiche di ogni enzima da mediante il programma Geneious, al fine di evidenziare le differenze strutturali a livello di sequenza aminoacidica che intercorrono tra enzimi omologhi di genotipi diversi. Come esempio, in fig.11 è riportato l'allineamento dei domini funzionali identificati mediante l'utilizzo del database Pfam nei genotipi 101.14, M4, PN40024 e C-S:

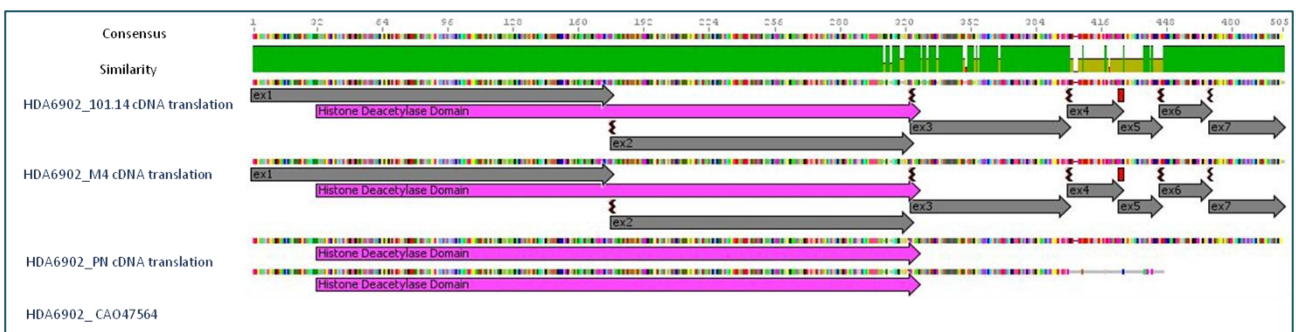


Fig.11

L'analisi *in silico* ha messo in luce che le sequenze delle dieci deacetilasi studiate appartenenti ai genotipi di PN40024 e C-S sono pressoché identiche, ad eccezione

degli enzimi HDA6901, HDA6906, HDA6910 ed HDA6911 in cui le sequenze di C-S risultano essere incomplete e le differenze che intercorrono con PN40024 sono localizzate proprio su queste sezioni. Ci si è quindi focalizzati sulle differenze che intercorrono tra i genotipi dei portainnesti M4 e 101.14, al fine di individuare eventuali differenze consistenti nelle sequenze dei domini funzionali dei due genotipi. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 5, dove sono mostrate le sostituzioni aminoacidiche in M4 e 101.14 rispetto a PN40024 e a C-S, nonché le loro posizioni all'interno del dominio enzimatico. Dalla tabella si può evincere che in alcuni casi sono presenti delle sostituzioni aminoacidiche comuni nei due portainnesti, in altri casi ci sono deacetilasi istoniche che hanno subito maggiori sostituzioni nell'uno o nell'altro genotipo. Alcuni enzimi risultano avere un maggior numero di sostituzioni rispetto ad altri, come ad esempio l'HDA6904, mentre altri sono maggiormente conservati. Tale analisi ha messo in evidenza che i domini funzionali all'interno delle deacetilasi nei portainnesti studiati sono ben conservati e che possono quindi adempiere alla loro funzione.

gene	genotipo	posizione	AA PN	AA	genotipo	posizione	AA PN	AA
HDA6901	M4	88	S	Y	101.14	88	S	Y
HDA6902	M4	310	G	D	101.14	310	G	D
		313	I	L		313	I	L
						318	R	C
						319	C	L
HDA6903	M4	339	Y	C	-			
HDA6904	M4	57	I	T	101.14	63	A	T
		63	A	T		69	K	N
		72	C	R		79	P	S
		86	L	F		108		
		96	K	M		115	G	D
		97	M	K		131	N	H
		108				140	L	V
		114	P	S		160	T	R
		115	G	D		161	A	T
		131	N	H		170	V	F
		140	L	V		173	I	T
		173	I	T		174	S	L
		174	S	L		176	H	R
		188	Q	W		177	M	K
		197	V	E		188	Q	W
		216	R	Q		197	V	E
		280	H	R		280	H	R
HDA6906	M4	262	A	E	101.14	262	A	E
HDA6907	M4	67	D	E	101.14	26	M	L
		142	E	V		67	D	E
						84	S	L
HDA6908	M4	219	E	D	101.14	219	E	D
		223	A	Y		223	A	Y
		258	I	L		304	S	A
		304	S	A				
HDA6909	M4	284	I	F	101.14	29	H	D
						215	E	D
HDA6910	M4	73	R	Q	101.14	73	R	Q
		111	T	S		215	L	M
		134	Q	R		282	N	D
		195	L	M				
		215	L	M				
		221	R	G				
HDA6911	M4	268	P	L	101.14	121	E	V
						164	D	G
						216	P	V
						255	D	V
						295	G	C

Tab.5: la voce "posizione" indica la posizione del residuo aminoacidico relativo all'interno del dominio funzionale. Sotto la voce "AA PN" sono riportati gli aminoacidi relativi al genotipo di PN40024. Sotto la voce "AA" sono riportati gli aminoacidi rinvenuti nei due portainnesti che hanno sostituito i rispettivi aminoacidi in PN40024.

6.3 Risposta allo stress idrico con approccio *genome-wide*

Dall'analisi trascrizionale effettuata sui portainnesti M4 e 101.14 in condizioni standard e di stress idrico, sono stati ricavati i dati di espressione delle deacetilasi istoniche appartenenti alla famiglia RPD3/HDA1. Sono stati analizzati separatamente tessuti di origine fogliare e radicale di entrambi i portainnesti per verificare se sussistono differenze di espressione genica a livello tessuto specifico.

Le tabelle n. 6 e 7 riportano i risultati relativi al portainnesto 101.14, le tabelle 8 e 9 quelli relativi a M4. Nelle tabelle ogni valore di espressione è rapportato ad un valore di significatività del dato (FDR = False Discovery Rate), che indica la probabilità che il dato considerato sia statisticamente affidabile, sulla base di diversi parametri selezionati per la elaborazione dei dati sperimentali. Sono stati presi in considerazione solo dati aventi un valore di significatività < 0,05. Nelle tabelle sono evidenziati in colore rosso i dati considerati significativi e i relativi valori FDR.

101.14 foglia	T1 WS	T2WS	T3WS	T4WS	FDR T1	FDR T2	FDR T3	FDR T4
HDA6902	-0,026	0,460	0,070	-0,016	1,000	0,615	1,000	1,000
HDA6910	0,400	-0,078	-0,020	0,131	1,000	1,000	1,000	1,000
HDA6911	0,236	0,098	-0,232	0,046	1,000	1,000	1,000	1,000
HDA6904	0,330	0,138	0,572	0,450	1,000	1,000	0,559	0,890
HDA6909	0,263	0,145	-0,319	-0,008	1,000	1,000	0,970	1,000
HDA6901	0,194	-0,236	0,050	-0,109	1,000	1,000	1,000	1,000
HDA6907	0,234	-0,060	0,137	0,141	1,000	1,000	1,000	1,000
HDA6903	0,028	0,192	0,160	0,091	1,000	1,000	1,000	1,000
HDA6906	-0,426	-0,071	0,640	0,526	1,000	1,000	0,402	0,696
HDA6908	0,331	0,294	0,123	0,049	1,000	0,921	1,000	1,000

Tab.6: dati di espressione delle deacetilasi istoniche nel tessuto fogliare del portainnesto 101.14 nei 4 time points considerati, rispetto al controllo T0.

101.14 rad	T1 WS	T2 WS	T3 WS	T4 WS	FDR T1	FDR T2	FDR T3	FDR T4
HDA6902	0,141	0,257	0,031	-0,049	1,000	0,561	1,000	1,000
HDA6910	0,271	0,129	0,068	0,403	1,000	0,977	1,000	0,413
HDA6911	-0,232	-0,082	-0,035	0,589	1,000	1,000	1,000	0,381
HDA6904	0,508	0,318	0,707	1,004	0,515	0,689	0,110	0,006
HDA6909	-0,138	-0,218	-0,422	-0,462	1,000	0,731	0,220	0,199
HDA6901	0,051	-0,107	-0,188	-0,020	1,000	1,000	0,644	1,000
HDA6907	0,041	0,238	0,143	0,256	1,000	0,834	0,942	0,715
HDA6903	0,104	-0,016	0,069	0,059	1,000	1,000	1,000	1,000
HDA6906	-0,071	-0,028	-0,098	0,156	1,000	1,000	0,978	0,889
HDA6908	0,140	0,077	-0,198	-0,165	1,000	1,000	0,700	0,804

Tab.7: dati di espressione delle deacetilasi istoniche nel tessuto radicale del portinnesto 101.14 nei 4 time points considerati, rispetto al controllo T0.

M4 foglia	T1 WS	T2 WS	T3 WS	T4 WS	FDR T1	FDR T2	FDR T3	FDR T4
HDA6902	0,027	-0,006	-0,087	0,050	1,000	0,918	0,758	0,859
HDA6910	-0,052	-0,984	-0,620	1,139	1,000	0,003	0,031	0,000
HDA6911	-0,094	-0,081	-0,308	0,023	1,000	0,901	0,218	0,947
HDA6904	-0,001	0,286	0,424	0,396	1,000	0,308	0,156	0,189
HDA6909	0,256	-0,175	-0,555	-0,095	1,000	0,566	0,078	0,762
HDA6901	0,061	0,030	-0,142	-0,035	1,000	0,822	0,635	0,894
HDA6907	-0,011	0,126	0,077	0,359	1,000	0,699	0,820	0,280
HDA6903	-0,064	0,041	0,005	0,120	1,000	0,973	0,977	0,660
HDA6906	-0,099	0,188	0,584	0,361	1,000	0,480	0,044	0,219
HDA6908	-0,057	0,250	0,374	0,282	1,000	0,252	0,157	0,271

Tab.8: dati di espressione delle deacetilasi istoniche nel tessuto fogliare del portinnesto M4 nei 4 time points considerati, rispetto al controllo T0.

M4 radice	T1 WS	T2 WS	T3 WS	T4 WS	FDR T1	FDR T2	FDR T3	FDR T4
HDA6902	-0,043	0,103	0,032	-0,049	1,000	1,000	1,000	1,000
HDA6910	-0,125	0,182	0,294	0,334	1,000	1,000	0,604	0,605
HDA6911	0,445	-0,928	0,005	0,423	1,000	0,195	1,000	0,787
HDA6904	-0,408	-0,085	1,307	1,375	1,000	1,000	0,001	0,001
HDA6909	-0,140	-0,009	0,058	0,005	1,000	1,000	1,000	1,000
HDA6901	-0,075	0,082	-0,302	0,082	1,000	1,000	0,470	1,000
HDA6907	0,157	0,111	0,222	0,285	1,000	1,000	0,775	0,724
HDA6903	0,114	-0,075	0,250	-0,121	1,000	1,000	0,559	1,000
HDA6906	-0,022	-0,311	0,146	0,162	1,000	0,642	0,945	0,935
HDA6908	0,182	0,070	0,078	-0,089	1,000	1,000	1,000	1,000

Tab.9: dati di espressione delle deacetilasi istoniche nel tessuto radicale del portinnesto M4 nei 4 time points considerati, rispetto al controllo T0.

Ogni dato di espressione riportato nelle tabelle è dato dalla seguente equazione:

$$\ln \frac{\textit{stressato}}{\textit{controllo}}$$

Dove $\frac{\textit{stressato}}{\textit{controllo}}$ indica il rapporto del livello di espressione del gene in questione nel campione sottoposto a stress idrico rispetto a quello del campione di controllo. Per ottenere l'effettivo rapporto di espressione tra i due campioni bisogna calcolare la funzione esponenziale del valore riportato in tabella, secondo la formula:

$$e^{\ln \frac{\textit{stressato}}{\textit{controllo}}}$$

Tali dati di espressione rapportati al controllo sono riportati in tabella 10, limitatamente ai risultati significativi:

genotipo	Tessuto	gene	T	significatività	Rapporto $\frac{\textit{stressato}}{\textit{controllo}}$
101.14	radice	HDA6904	4	0,006	2,729
M4	foglia	HDA6906	3	0,044	1,793
M4	foglia	HDA6910	2	0,003	0,374
M4	foglia	HDA6910	3	0,031	0,538
M4	foglia	HDA6910	4	0,000	3,124
M4	radice	HDA6904	3	0,001	3,695
M4	radice	HDA6904	4	0,001	3,955

Tab.10

A titolo di esempio, il valore 2,729 del gene HDA6904 stimato per il tessuto radicale del genotipo 101.14 al time point 4, indica che il valore di espressione di tale gene è 2,729 volte maggiore nel campione sottoposto a stress idrico rispetto a quello di controllo. Questi dati di espressione dimostrano che sussistono dei cambiamenti di espressione delle deacetilasi istoniche durante lo stress idrico e che quindi esse risultano essere coinvolte nel processo adattativo allo stress. In particolar modo si può notare come queste differenze riguardino soprattutto il portainnesto sperimentale M4, ritenuto più resistente allo stress idrico rispetto al 101.14. Il gene HDA6906 ha mostrato un incremento del valore di 1,793 volte maggiore nel tessuto

fogliare del portainnesto M4 sottoposto a stress idrico al time point 4. È stata rilevata una differenza consistente di espressione anche per il gene HDA6904 nei tessuti radicali di M4, ai time points 3 e 4, e di 101.14, al time point 3. Anche in questo caso sussiste una maggiore consistenza nell'espressione dell'enzima in questione in M4. Un dato interessante è quello relativo all'analisi di espressione del gene HDA6910, che, solamente nei tessuti di foglia di M4 sottoposti a stress idrico, risulta essere sottoespresso ai time points 2 e 3 e sovraespresso al time point 4, quando le condizioni di crescita risultano essere più stressanti e proibitive. Esso risulta essere il gene ortologo di *A. thaliana* codificante HDA2, appartenente alla classe IV della famiglia RPD3/HDA1 delle deacetilasi istoniche. È stato dimostrato che trattamenti con NaCl ne stimolano l'espressione (Alisung M.V. et al. 2009), suggerendo un suo coinvolgimento nella risposta a stress salino. In *V. vinifera* HDA6910 risulta essere un gene differenzialmente espresso, in quanto non ne è stata constatata l'espressione a livello radicale, pertanto si presume che esso non prenda parte a processi essenziali per lo sviluppo e la crescita della pianta ma che sia coinvolto in altre funzioni durante il suo sviluppo (Aquea et al. 2010). Tuttavia la scarsa quantità di informazioni riguardanti questo gene reperibili dalla letteratura consultata, dimostra che esso deve ancora essere caratterizzato dal punto di vista strutturale e funzionale.

7. CONCLUSIONI

Per lo studio delle basi molecolari della risposta a condizioni di stress idrico nei portainnesti di vite, sono stati presi in considerazione i genotipi M4 e 101.14, che presentano caratteristiche di resistenza agli stress abiotici assai diverse. La risposta dei due genotipi, attraverso l'identificazione di geni differenzialmente espressi, consente di mettere in evidenza i differenti meccanismi adattativi sviluppati dagli stessi. In questa tesi l'attenzione è stata focalizzata sulle dieci deacetilasi istoniche della famiglia RPD3/HDA1, che agiscono sulla regolazione trascrizionale di tipo epigenetico e possono svolgere un ruolo nel determinare le diverse caratteristiche di adattamento a condizioni stressanti. Si è cercato di compiere un'analisi il più completa possibile che ha riguardato la struttura degli enzimi in questione, attraverso l'analisi dei loro domini funzionali ed il livello di espressione dei rispettivi geni, ottenendo informazioni concernenti sia la quantità di trascritto prodotto, sia la cinetica temporale di espressione a seguito dell'imposizione dello stress idrico. I risultati ottenuti dall'allineamento delle sequenze relative ai domini funzionali degli enzimi hanno mostrato che le sequenze di tutte le dieci deacetilasi studiate risultano essere ben conservate in entrambi i genotipi e non sono state rilevate differenze macroscopiche quali delezioni di esoni che possano comportare un'alterazione della funzionalità della proteina. Solamente nel gene HDA6902 è stata riscontrata una variazione rispetto al genoma di riferimento PN40024 di *V. vinifera*, di un aminoacido ritenuto altamente conservato secondo il database Pfam, ma tale sostituzione coinvolge entrambi i portainnesti ed è presumibilmente da attribuire alla loro origine da ibridazione interspecifica. Per quanto riguarda i dati di espressione essi hanno rivelato che le deacetilasi istoniche analizzate risultano essere geni differenzialmente espressi tra materiale sottoposto a stress e controllo all'interno di ciascun portainnesto. È stata rilevata una variazione della espressione genica di alcune deacetilasi nei tessuti di foglia e radice del portainnesto

sperimentale M4 sottoposto a condizioni di stress idrico, mentre nel portainnesto commerciale 101.14, notoriamente suscettibile a tale stress, è stato rilevato un aumento dell'espressione del solo gene HDA6904 limitatamente al tessuto radicale. I risultati ottenuti suggeriscono un probabile coinvolgimento di tali geni nella regolazione epigenetica della trascrizione nella risposta agli stress abiotici: un incremento del livello di trascrizione di geni per le deacetilasi istoniche consente infatti la deacetilazione della cromatina ed una conseguente inibizione di geni coinvolti nei meccanismi adattativi. I meccanismi di azione di tali enzimi dovranno essere approfonditi per individuare le regioni target delle modificazioni epigenetiche di cui essi sono responsabili. Nello sviluppo della ricerca è infatti programmata un'analisi ChIPseq, volta ad individuare le regioni cromosomiche coinvolte nella deacetilazione e, in particolare, la modifica H3K9ac, nota in letteratura per essere associata a zone trascrizionalmente attive.

8. BIBLIOGRAFIA

Alinsug MV, Yu C-W, Wu K (2009) Phylogenetic analysis, subcellular localization, and expression patterns of RPD3/HDA1 family histone deacetylases in plants. *BMC Plant Biology* 9:37.

Aquea F, Timmermann T, Arce-Johnson P (2010): Analysis of histone acetyltransferase and deacetylase families of *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry* 48 194e199.

Buchanan B.B, Grissem W, Jones R.L: *Biochimica e biologia molecolare delle piante* (2003), Zanichelli editore S.p.a., Bologna.

Chen L-T, and Wu K (2010): Role of histone deacetylases HDA6 and HDA19 in ABA and abiotic stress response. *Plant Signaling & Behavior* 5:10, 1318-1320 *Plant Signaling & Behavior* 5:10, 1318-1320.

Chinnusamy V, Zhu J-K (2009): Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12:133–139

Eynard I, Dalmaso G: *Viticultura moderna - 9° edizione* (2005), Ulrico Hoepli editore S.p.a., Milano.

Fregoni M: Viticoltura di qualità (2005), editore PhytolineS.r.l., Affi (VR).

Fu W, Wu K, Duan J (2007): Sequence and expression analysis of histone deacetylases in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356 843–850.

Hollender C, Zhongchi L (2008): Histone Deacetylase Genes in *Arabidopsis* Development. *Journal of Integrative Plant Biology* 50 (7): 875–885.

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

Mirouze , Paszkowski J (2011): Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14:1–8.

Scienza A (2013): nuovi portainnesti della vite, L'INFORMATORE AGRARIO N. 14/2013.

Taiz L, Zeiger E: Fisiologia vegetale, 4° ed. italiana (2010), Piccin nuova libreria S.p.a., Padova.

Siti web consultati:

<http://www.agraria.org/coltivazioniarboree/vite.htm>

<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/primer3plus.cgi>

<http://genomes.cribi.unipd.it/grape/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://pfam.sanger.ac.uk/search>

<http://it.wikipedia.org/wiki/Italia>