



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
Tuscia

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE

Corso di Dottorato di Ricerca in
GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE - XXVII Ciclo

TITOLO TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
IL PRIMING COME MECCANISMO DI DIFESA DI *ORYZA SATIVA* SPP. JAPONICA:
ANALISI GENETICHE ED EPIGENETICHE
BIO/10

Tesi di dottorato di:

Dott. Benedetta Sahatini

Benedetta Sahatini

Coordinatore del corso

Prof. Giorgio Prantera

Firma *Giorgio Prantera*

Tutori

Prof. Carla Caruso

Firma *Carla Caruso*

Dott. Laura Bertini

Firma *Laura Bertini*

Data della discussione

8 maggio 2015

*“È sapiente solo chi sa di non sapere,
non chi s'illude di sapere e ignora così
perfino la sua stessa ignoranza.”*

Socrate.

INDICE

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Elicitori: PAMP, MAMP E DAMP	pag.1
1.2 Meccanismi di difesa delle piante	pag.3
1.3 Fitormoni vegetali	pag.6
1.4 Regolazione trascrizionale	pag.9
1.5 Principali famiglie di fattori di trascrizione vegetali	pag.11
1.6 Regolazione epigenetica	pag.19
1.7 La metilazione del DNA	pag.23
1.8 Il riso	pag.26
1.8.1 Descrizione della pianta del riso	pag.26
1.8.2 Brevi cenni storici	pag.27
1.9 Immunita' innata in <i>Oryza sativa</i>	pag.27
1.9.1 Meccanismo dell'immunita' innata mediato da Xa-21	pag.27
1.9.2 Immunita' innata mediata da CEBIP	pag.29
1.9.3 Immunita' innata mediata da OsFLS2	pag.30
1.9.4 Immunita' innata mediata da LPS	pag.30
1.9.5 Immunita' indotta dagli effettori	pag.30
1.10 Trasduzione del segnale nell'immunita' innata del riso	pag.31
1.10.1 Trasduzione del segnale mediato dalle MAPK	pag.31
1.10.2 Fattori di trascrizione coinvolti nella trasduzione del segnale in riso	pag.32
1.11 Il priming	pag.33
1.11.1 Eredità' del priming	pag.37
1.11.2 Priming nei semi	pag.38
1.12 Tecniche per indurre il priming nei semi	pag.39
1.13 Studi di proteomica in riso	pag.41
1.14 L'epigenetica del riso	pag.42
1.15 Isole CpG	pag.51
1.16 Scopo della tesi	pag.52

CAPITOLO 2

2.1 Materiali	pag.53
2.1.1 Strumentazione	pag.54
2.2 Metodi	pag.56
2.2.1 Sterilizzazione e germinazione dei semi di riso	pag.56
2.2.2 Piastramento semi	pag.56
2.2.3 Trasferimento dei coleoptili su agar	pag.56
2.2.4 Trasferimento dei coleoptili in soluzione idroponica	pag.57
2.2.5 Trattamento induzione priming con acido salicilico	pag.58
2.2.6 Preparazione spore di <i>Fusarium culmorum</i>	pag.58
2.2.7 Infezione coleoptili di 7 giorni	pag.59
2.2.8 Trattamento di induzione del priming usando metil jasmonato	pag.59
2.2.9 Ferita delle piante	pag.59
2.2.10 Estrazione dell'RNA	pag.59
2.2.11 Analisi dell'RNA mediante gel di agarosio 1%	pag.61
2.2.12 Sintesi del cDNA	pag.61
2.2.13 PCR	pag.62
2.2.14 Primers per acido salicilico	pag.62
2.2.15 Primers per metil-jasmonato	pag.64
2.2.16 Primers per la REAL TIME PCR	pag.65
2.2.17 Primers per la ChIP-REAL TIME PCR	pag.65
2.2.18 Primers per MSP in corrispondenza dell'ATG	pag.66
2.2.19 Estrazione del DNA genomico da foglie di riso	pag.67
2.2.20 Conversione con bisolfito di sodio	pag.70
2.2.21 METHYLATION SPECIFIC PCR (MSP)	pag.72
2.2.22 PCR TOUCHDOWN	pag.73
2.2.23 Crosslinking dei campioni da sottoporre alla ChIP	pag.73
2.2.24 Estrazione della cromatina	pag.74
2.2.25 Immunoprecipitazione	pag.75
2.2.26 Decrosslinking	pag.76
2.2.27 REAL TIME PCR	pag.77

2.2.27.1 Standardizzazione dei primers	pag.77
2.2.27.2 Allestimento della reazione per la REAL TIME PCR	pag.79
2.2.28 Analisi statistica dei dati ottenuti con la REAL TIME PCR	pag.79
2.2.29 Calcolo della concentrazione del DNA e dell'RNA mediante QUBIT	pag.79
2.2.30 Estrazione dei protoplasti da foglie di <i>Oryza sativa</i>	pag.80
2.2.31 Immunolabeling	pag.81
2.2.32 Estrazione delle proteine totali dalle foglie di piante di riso	pag.81

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Acido salicilico	pag.83
3.1.2 Analisi di espressione su piante	pag.87
3.1.3 Analisi di espressione su coleoptili	pag.90
3.1.4 Effetti fisiologici del SA sulla crescita	pag.93
3.1.5 Rilevazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)	pag.94
3.1.6 Conclusione	pag.97
3.2 Acido jasmonico	pag.98
3.2.1 Induzione del priming utilizzando una concentrazione di metil-jasmonato di 100µM	pag.101
3.2.2 Induzione del priming utilizzando Me-JA 10 µM	pag.103
3.2.3 Validazione dei risultati mediante REAL TIME PCR	pag.105
3.2.3.1 Analisi di REAL TIME PCR del gene BBPI	pag.106
3.2.3.2 Analisi di REAL TIME PCR del gene POX	pag.107
3.2.3.3 Analisi di REAL TIME PCR del gene LOX	pag.108
3.2.3.4 Analisi di REAL TIME PCR del gene JAMYB	pag.109
3.2.3.5 Conclusioni dell'analisi della REAL TIME PCR	pag.110
3.3 Analisi epigenetiche	pag.111
3.3.1 Analisi <i>in silico</i> del promotore di BBPI e POX	pag.111
3.3.2 Analisi della metilazione del DNA mediante Methylation Specific PCR (MSP)	pag.113
3.3.3 Analisi delle modifiche istoniche	pag.115
3.3.3.1 Progettazione dei primers per la ChIP	pag.117
3.3.3.2 Studio dell'andamento delle modifiche epigenetiche nel promotore e nel corpo dei geni primed BBPI E POX	pag.117

3.3.3.2.1 Analisi epigenetiche del gene POX	pag.118
3.3.3.2.2 Analisi epigenetiche del gene BBPI	pag.124
3.3.3.3 MSP in corrispondenza dell'ATG	pag.130
3.4 Immunolabeling	pag.131
3.4.1 Strategia 1: immunolabeling dei tessuti	pag.133
3.4.2 Strategia 2: degradazione enzimatica	pag.135
3.4.3 Strategia 3: estrazione dei protoplasti	pag.135
3.4.3.1 Visualizzazione al microscopio confocale	pag.136
3.4.4 Conclusione	pag.137

CAPITOLO 4

4.1 Conclusioni e prospettive future	pag.139
--------------------------------------	---------

CAPITOLO 5

5.1 Bibliografia	pag.142
------------------	---------

Ringraziamenti	pag.156
----------------	---------

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

Piante ed animali hanno dei sistemi immunitari innati che si basano su dei meccanismi molto simili poiché discendono da un ancestore comune (Ausubel, 2005). Il principio su cui si basano è un meccanismo di riconoscimento di una molecola specifica del patogeno, riconosciuta come estranea, da parte di un recettore dell'ospite.

Tuttavia nel corso dell'evoluzione le varie specie si sono adattate al proprio habitat modulando il proprio sistema di difesa al fine di sopravvivere ai vari stress che devono affrontare.

I primi studi sui sistemi immunitari sono stati eseguiti sugli animali, nello specifico in *Drosophila*, in cui venne scoperto un recettore transmembrana la cui mutazione provocava una malformazione a livello dorso-ventrale dell'embrione. Esso fu chiamato TOLL, parola che in tedesco significa “pazzo” (Hashimoto et al. ,1988), proprio a causa degli effetti che si presentavano in sua assenza. Studi successivi hanno anche dimostrato il suo coinvolgimento nei meccanismi di difesa (Lemaitre et al. 1996; Akira et al. 2006; Kawai and Akira 2005), infatti favoriva la risposta agli attacchi di patogeni fungini.

Anche nei mammiferi sono stati individuati dei recettori transmembrana aventi le medesime caratteristiche, per questo chiamati Toll-Like Receptors (TLRs), superfamiglia di proteine caratterizzate da un dominio extra-cellulare caratterizzato dalla presenza di ripetizioni ricche di leucina (leucine-rich repeat, LRR). Tali domini hanno la funzione di riconoscere e legare le molecole associate e caratteristiche del patogeno, identificate con il nome di Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP) oppure Microbial-Associated Molecular Pattern (MAMP) oppure Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP).

1.1 Elicitori: PAMP, MAMP E DAMP

Con il termine elicitore si intende una molecola del patogeno riconosciuta dall'ospite che innesca un meccanismo di difesa, ma può anche essere considerato come una molecola propria dell'ospite prodotta durante la difesa che a sua volta la amplifica (Henry et al., 2011). Tali elicitori possono essere classificati in due categorie (FIG.1):

- generali, se provocano l'attivazione del sistema immunitario innato primario (discusso in seguito), che costituisce una resistenza basale in cui mediante un recettore di membrana la cellula attiva una cascata di segnalazione che raggiungendo il nucleo permette l'attivazione della risposta di difesa;

- specifici, se provocano l'attivazione di un'immunità secondaria (discussa in seguito), mediante un riconoscimento che avviene a livello citoplasmatico da parte di proteine di avirulenza specifiche che riconoscono gli effettori del patogeno.

TIPOLOGIE DI ELICITORI

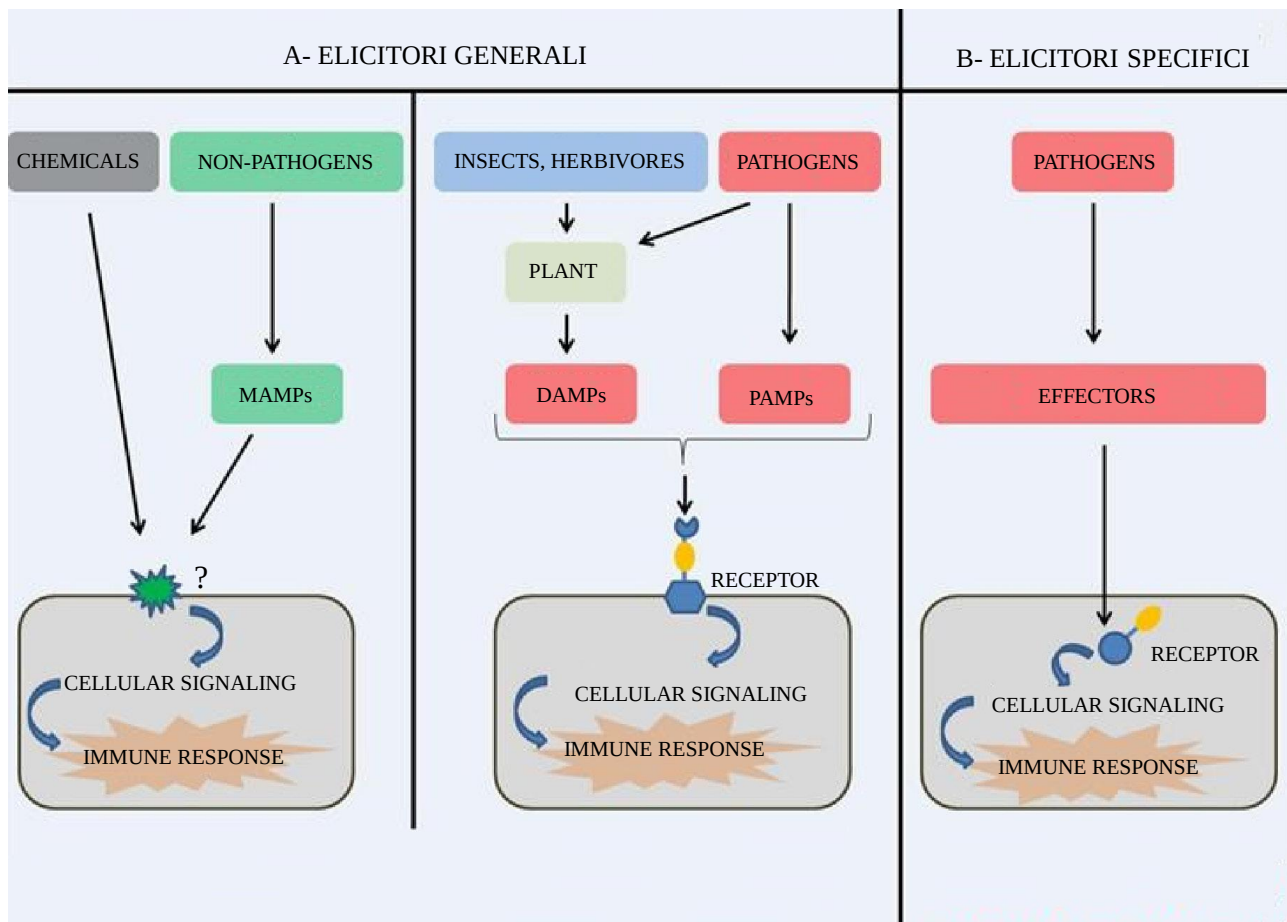


FIG.1. TIPOLOGIE DI EFFETTORI (Adattato da Henry et al., 2012). Gli elicitori generali (A) comprendono sostanze chimiche, molecole associate ai microbi, molecole derivate dall'ospite danneggiato, molecole associate ai patogeni. Gli elicitori specifici (B) comprendono gli effettori prodotti dai patogeni che penetrano nell'ambiente cellulare ma che sono riconosciuti da proteine di resistenza dell'ospite.

Il riconoscimento di queste molecole da parte di specifici recettori TLR induce la loro dimerizzazione, talvolta coadiuvata dall'azione di altre proteine adattatrici, innescando una cascata di segnalazione comprendente anche le Mitogen Associated Protein Kinase (MAPK) che culmina con l'espressione dei geni di difesa (Ozinsky et al., 2000; Underhill and Ozinsky, 2002; Akira and Takaeda, 2004).

Se a livello della membrana è presente un'interazione recettore-PAMP, a livello citoplasmatico è stato possibile individuare delle proteine di riconoscimento del patogeno (pathogen recognition protein, PRR), le quali agiscono come dei sensori percependo sia la presenza del patogeno mediante

il riconoscimento di una sua molecola, sia percependo delle molecole prodotte dall'ospite in condizioni di difesa (Inohara *et al.*, 2002), per esempio cambiamenti della concentrazione di K^+ . Esse possono attivare una serie di pathways per rispondere all'attacco i quali possono indurre perfino la morte cellulare.

Anche nelle piante è possibile individuare dei meccanismi che si basano sul riconoscimento di PAMP per attivare una serie di vie di segnalazione per indurre la risposta più opportuna. In passato sono stati condotti molti studi per individuare alcuni PAMP e loro recettori.

Il primo individuato è stato il peptide Pep 13 da *Phytophthora* (Brunner *et al.*, 2002), in seguito furono individuati anche flg22 ed elf18 con i rispettivi recettori in *Arabidopsis*.

Flg22 è un frammento in corrispondenza dell'N-terminale della proteina flagellina, indispensabile per la mobilità batterica ed infatti è estremamente conservata in tutti i taxa. Il suo rilascio nelle immediate vicinanze della pianta attiva la sua difesa immunitaria innata (Felix *et al.*, 1999): formazione di callosio, espressione di geni di difesa come Plant Defensin 1.2 (PDF1.2), Pathogenesis Related (PR) 1 e PR 5. Questi geni sono attivati da più pathways di difesa, quindi un singolo PAMP può attivare meccanismi diversi. Il recettore per flg22 mostra avere un dominio extracellulare LRR con cui lega flg22, successivamente va incontro a dimerizzazione e fosforilazione attivando la cascata di segnalazione.

In parallelo si attivano anche i geni codificanti per degli elicitori endogeni come AtPep1 e relativo recettore. Tali elicitori endogeni hanno la funzione di creare un feedback positivo per amplificare la cascata di segnalazione e portare ad una risposta più intensa (Ryan *et al.*, 2002).

1.2 Meccanismi di difesa delle piante

Nel loro habitat le piante sono continuamente sottoposte ad una serie di attacchi da parte di vari tipi di patogeni: virus, batteri, funghi, oomiceti, nematodi, insetti ed erbivori. Quindi per sopravvivere hanno evoluto una serie di meccanismi di difesa per controbattere efficacemente a questi attacchi utilizzando strategie diverse a seconda della natura del patogeno.

I patogeni fungini possono essere classificati in base al loro ciclo vitale: necrotrofi, i quali inducono prima la morte della pianta per poi cibarsene; biotrofi, i quali penetrano nei tessuti della pianta da cui traggono nutrimento e quindi non provocano la morte; emibiotrofi, i quali possono avere una natura sia necrotrofa che biotrofa a seconda della fase del ciclo vitale in cui si trovano. Indipendentemente dalla loro natura, i patogeni secernono delle sostanze che sono riconosciute dall'ospite inducendo i meccanismi. Uno studio del 2002 di Lowe e Howlett ha analizzato il

secretoma di una serie di funghi di varie famiglie al fine di individuarne la composizione. Sorprendentemente solo una piccola parte del genoma codifica per le proteine contenute nel secretoma, dal 4 al 14%. L'oscillazione della percentuale è dovuta al tipo di vita del fungo: quelli biotrofi hanno una minore porzione di geni coinvolti nel secretoma rispetto ai necrotrofi (Lowe and Howlett, 2002). Nello specifico sono stati analizzati tre elicitori: MISS7 da *Laccaria bicolor*, importante per la sua simbiosi con il pioppo poiché entra nel nucleo delle cellule dell'ospite per modulare l'espressione di alcuni geni ed alterare la struttura delle radici (Plett et al., 2011); SP7 dalla micorriza *Glomus intraradices*, effettore che entra nel nucleo delle cellule dell'ospite per bloccare i meccanismi di difesa (Kloppholz et al., 2011); CORISMATO MUTASI da *Ustilago maydis*, che dimerizza e sopprime il pathways di difesa dell'ospite (Djamei et al., 2011). È interessante notare che i geni codificanti per gli effettori si trovano in corrispondenza dei telomeri ricchi di trasposoni, quindi è possibile che vengano trasferiti tra i vari organismi, anche di specie diversa, mediante un meccanismo genico chiamato trasferimento genico orizzontale (Richards et al., 2011).

L'interazione patogeno-pianta si basa quindi su un delicato equilibrio che, se va a favore del patogeno, si sviluppa la malattia, se è a favore della pianta ospite, il patogeno viene ucciso e la pianta sopravvive.

Il primo step è la percezione da parte dell'ospite della presenza del patogeno: il riconoscimento di una specifica molecola attraverso l'interazione con un recettore Pattern Recognition Receptors (PRR) innescando una prima linea di difesa detta immunità stimolata dai PAMP (PAMP Triggered Immunity, PTI), che si manifesta con una cascata di segnalazione in cui un ruolo fondamentale è ricoperto dalle MAPK, che culmina con l'espressione di alcuni geni di difesa, ingresso di Ca^{2+} nella cellula e produzione di specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygene Species, ROS). Nel corso dell'evoluzione però, il patogeno ha sviluppato la capacità di secernere delle molecole effettrici che, agendo nel citoplasma dell'ospite, bloccano la cascata di segnalazione, diffondendo la malattia. Tale condizione è chiamata suscettibilità indotta dell'effettore (Effector Triggered Susceptibility, ETS). A sua volta l'ospite può ulteriormente reagire esprimendo geni codificanti per recettori intracellulari che riconoscono le molecole effettrici del patogeno innescando l'immunità indotte dall'effettore (Effector Triggered Immunity, ETI) (Chisholm *et al.*, 2006; Jones and Dangl, 2006). Quando questa si attua, si attiva un pathway nell'ospite che culmina con l'espressione dei geni di difesa, produzione di ROS, produzione di composti antimicrobici e/o morte cellulare programmata (van Loon *et al.*, 2006) (FIG.2).

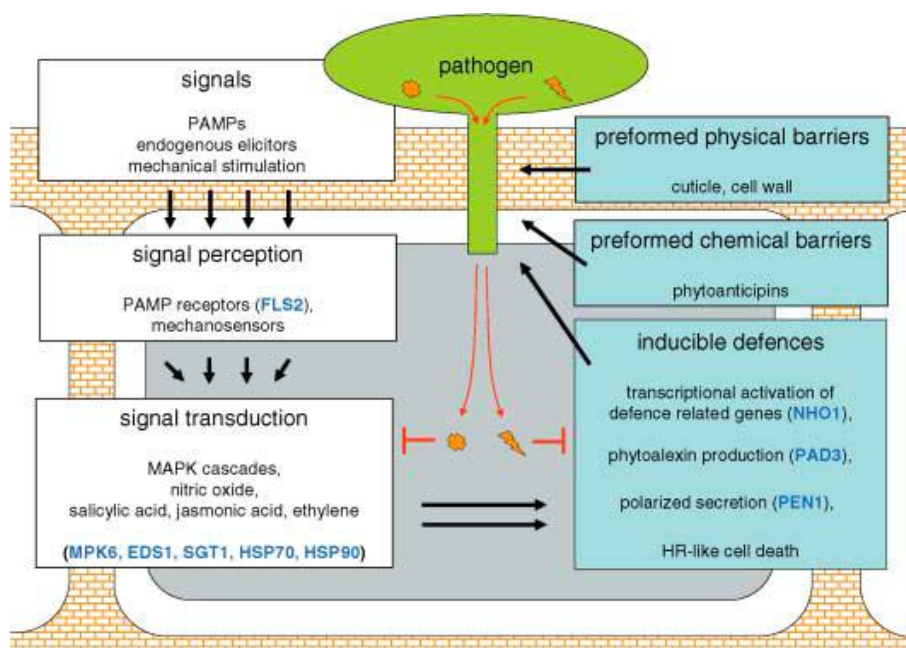


FIG.2. INTERAZIONE PIANTA-PATOGENO(Nurberger and Lipka, 2005). Meccanismi di percezione, segnalazione e risposta sono la base dell'interazione pianta-patogeno. Il riconoscimento dei PAMP mediante specifici recettori sulla superficie cellulare inducono delle risposte di difesa nella pianta. Stress meccanico può avvenire anche durante un'invasione microbica (Gus-Mayer et al., 1998; Schmelzer, 2002). Il legame del recettore con il PAMP induce una difesa che si attua mediante una cascata di segnalazione. Alcuni patogeni sintetizzano proteine effettrici che bloccano la cascata di segnalazione dell'ospite (Alfano and Collmer, 2004; Chang et al., 2004; Espinosa et al., 2003; Kang et al., 2004; Thordal-Christensen, 2003) (LINEA ROSSA). Nella scatola bianca sono elencati le molecole percepite dall'ospite ed i meccanismi di percezione e trasduzione del segnale. Nella scatola blu sono indicate le barriere fisiche, chimiche ed i meccanismi di difesa indotti. FLS2, flagellin sensing 2; MPK6, mitogen-activated protein kinase 6; SGT1, suppressor of G2 allele of Skp1; HSP, heat shock protein; PAD3, phytoalexin deficient 3; NHO1, non-host resistance 1; PEN, penetration.

La PTI e l'ETI, anche se avvengono in momenti diversi, mostrano avere alcuni punti in comune come la sintesi di callosio e lignina, sintesi di proteine Pathogenesis Related (PR), ma è durante lo sviluppo dell'immunità indotta dall'effettore (ETI) che si decide la sopravvivenza della pianta.

Inoltre, durante l'ETI può manifestarsi la morte localizzata nel sito di infezione. Questa difesa è detta risposta di ipersensibilità o Hypersensitive Response (HR). Tale morte viene indotta in tempi molto brevi ed induce in parallelo una serie di meccanismi di difesa che innescano la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Baker and Orlandi, 1995; Levine et al, 1994; May et al, 1996; Mehdy, 1994), ingresso di ioni nel citoplasma che inducono un'alcalinizzazione del pH, nello specifico avviene l'ingresso degli ioni Ca^{2+} e la fuoriuscita degli ioni Cl^- e K^+ (Atkinson and Baker, 1989). Oltre a ciò si ha l'ispessimento della parete cellulare, il rilascio di sostanze di segnalazione secondarie come l'ossido nitrico nonché l'espressione precoce di alcuni geni PR

codificanti per proteine aventi funzione antibatterica e/o antifungina. È molto interessante notare che non è chiaro quale sia con certezza il fattore scatenante l'HR, ma si è ipotizzato possano essere le molecole prodotte durante la risposta allo stress in quanto tossiche (per esempio le fitoalessine), oltre al fatto che la presenza dei ROS induce degradazione delle membrane, proteine ed acidi nucleici (Morel and Dang, 1997; Baker and Orlandi, 1995).

Quindi, a livello locale si attivano dei meccanismi che inducono la morte di una parte della pianta per arginare l'avanzata del patogeno, nelle zone adiacenti a questa si innescano dei pathway anti-morte al fine di confinare la zona di morte cellulare, mentre a livello sistemico si innescano una via di segnalazione che sfrutta dei fitormoni al fine di innescare i meccanismi di difesa anche nelle parti più distali della pianta ed indurre la resistenza sistemica acquisita (System Acquired Resistance, SAR).

La SAR può essere indotta sia dalla PTI che dall'ETI ed è caratterizzata da un accumulo del fitormone acido salicilico (SA) sia a livello locale che sistemico. Tale accumulo provoca una serie di cambiamenti nella pianta che portano all'espressione di geni codificanti per proteine PR, coinvolte nella difesa contro i patogeni. Questa nuova condizione rende la pianta stessa più protetta agli stress.

In più, nelle piante è anche possibile trovare una condizione di pacifica coesistenza con alcuni micro-organismi, come nel caso delle micorrize e dei funghi benefici. Tali organismi interagiscono con le radici della pianta la quale ovviamente riconosce la presenza estranea, ma la risposta è modulata in maniera tale da instaurare una simbiosi da cui entrambi traggono vantaggio. In questa fase agiscono in maniera sinergica altri due fitormoni, acido jasmonico (JA) ed etilene (ET).

1.3 Fitormoni vegetali

A questo punto è importante introdurre il concetto di fitormoni, poiché nelle piante hanno un ruolo fondamentale in molti ambiti. Esse sono delle molecole di piccole dimensioni che dirigono vari processi della pianta come la crescita, lo sviluppo, la differenziazione, la riproduzione e la difesa. Normalmente agiscono a basse concentrazioni. I più studiati sono SA, JA, ET, ma negli ultimi anni si è posta l'attenzione anche su altri come acido abscissico (ABA), auxine, giberelline, citochine, brassinosteroidi, stringolattoni, questi ultimi appartenenti ad una nuova classe di fitormoni (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008).

L'acido salicilico è stato considerato tra le molecole fondamentali nei meccanismi di difesa. Infatti la sua concentrazione subisce un incremento in seguito ad infezione o viceversa la sua applicazione

esogena rende la pianta più resistente ai patogeni (Ryals *et al.*, 1996). Da tutto ciò emerge che tale molecola è sicuramente coinvolta nella risposta a stress di natura biotica, oltre ad essere fondamentale per l'insorgenza della SAR (Nunkel and Brooks, 2002). Nel pathway regolato dal SA, un ruolo importante è svolto dalla proteina Non Expressor of PR1 (NPR1) la quale è sensibile ai cambiamenti del potenziale redox indotti dall'accumulo del SA. Tali cambiamenti inducono un incremento del glutatione che passa da una condizione di oligomeri localizzati nel citoplasma a monomero che entra nel nucleo per attivare i fattori di trascrizione TGA, GRX480, WRKY che modulano l'espressione dei geni SA-responsivi. Normalmente il pathway del SA si attiva in seguito della presenza di patogeni biotrofi ed emibiotrofi (Grant and Lamb, 2006). Nei mutanti che non possono accumulare SA o che non esprimono NPR1, è presente una marcata suscettibilità ai patogeni i quali normalmente prima colonizzano l'apoplasto, lo spazio tra le cellule, per poi indurre la morte delle cellule stesse (Glazebrook *et al.*, 1996; Nawrath *et al.*, 1999; Reuber *et al.*, 1998).

Il JA è una molecola di segnalazione derivata da un acido grasso coinvolto nello sviluppo del polline e del seme; inoltre svolge un ruolo centrale nella difesa in risposta a ferita, ozono, microbi ed è importante per indurre l'espressione di geni JA-dipendenti come PDF1.2, THIONIN 2.1 (THI2.1), HEVEIN LIKE PROTEIN (HEL), CHITINASI B (CHIB). Studi in cui è stata analizzata la capacità di risposta a stress abiotici da parte di piante di *Arabidopsis* incapaci di produrre o percepire il JA hanno evidenziato che esse sono molto più suscettibili ai suddetti stress; altri studi in cui delle piante di patata transgeniche over-esprimenti il gene cloroplastico Allene Ossido Sintasi (AOS) con ruolo chiave nella biosintesi del JA, non erano capaci di innescare un'espressione costitutiva dei geni JA-responsivi, pur producendo un'elevata quantità di JA (12 volte più del wild-type) (Seo *et al.*, 2001). Tali piante rispondono allo stress abiotico, quale la ferita, esprimendo i geni ad essa responsivi. Ciò è possibile in quanto avviene la migrazione del JA dal cloroplasto al citoplasma cellulare in cui sono presenti i suoi recettori, mentre il JA in circolo nella pianta non può penetrare nella cellula senza un carrier a causa della sua natura acida (Seo *et al.*, 2001). Da tutto ciò emerge che gli stimoli esterni possono attivare altri meccanismi di biosintesi del JA. Infine i mutanti con una produzione costitutiva di JA mostravano più resistenza (Seo *et al.*, 2001).

La repressione dei geni JA-dipendenti può avvenire mediante l'azione dell'ubiquitina ligase E3 SCF COI1 la quale forma un complesso con le proteine contenenti un dominio ZIM (JAZ). In seguito all'accumulo del JA, il JA-isoleucina lega COI1 del complesso inducendo la degradazione di JAZ, ubiquitinato, nel proteasoma. Tutto ciò consente l'espressione dei geni JA-dipendenti come MYC2, il quale inibisce il pathway del SA; oppure ERF1 e ORA59, i quali agiscono sinergicamente con il pathway dell'ET.

L' ET ha un ruolo poco chiaro poiché può sia favorire i vari meccanismi di difesa, sia favorire

l'avanzata del patogeno, quindi ha effetti divergenti osservati in più specie.

Il suo pathway è formato da un recettore di membrana specifico ETR che, in assenza del suo ligando, inibisce la proteina di controllo CTR1 la quale a sua volta inibisce il regolatore positivo ETHYLENE INSENSITIVE2 (EIN2). In presenza di etilene, ogni inibizione viene rimossa ed EIN2 induce EIN3 che attiva il fattore di trascrizione ERF1 favorendo l'espressione dei geni ET-dipendenti.

Questi tre fitormoni regolano principalmente la difesa nella pianta poiché ognuno ricopre un ruolo centrale nel pathway di cui fa parte. Tali pathways non sono indipendenti tra loro ma interagiscono sia in maniera sinergica che inibitoria in base alla condizione in cui vengono a trovarsi (Kunkel and Brooks, 2002). Queste interazioni danno origine ad un crosstalk.

Il crosstalk tra SA-JA è molto complesso: generalmente è di natura inibitoria da parte del SA su JA, infatti NPR1 citosolico inibisce l'ubiquitinazione (e quindi la successiva degradazione) di JAZ mentre i fattori di trascrizione coinvolti nel suo pathway inibiscono MYC2 (Pieterse et al. 2009).

Mutanti di *Arabidopsis* in geni specifici di un pathway, favoriscono l'insorgenza dell'altro (Grupta and Glazebrooke, 2000; Petersen et al., 2000; Kloeck et al. 2001). Tuttavia, ci sono anche prove della loro azione sinergica in tabacco per l'espressione di PR1 (Xu et al. 1994), mentre esperimenti di microarray in *Arabidopsis* hanno dimostrato che piante sottoposte a diversi tipi di trattamenti esprimono geni co-indotti sia da SA che da JA (Schenk et al., 2000). Piante di *Arabidopsis* trattate con SA e JA esprimono il gene aconitasi e peroxisomal NAD-malate dehydrogenase, i quali non sono espressi nei trattamenti singoli, evidenziando così un sinergismo tra i due ormoni (Proietti et al., 2013).

Il crosstalk tra JA ed ET è quasi sempre di natura sinergica in quanto l'espressione di molti geni tra cui PDF 1.2 è indotta da entrambi i fotormoni, inoltre i fattori di trascrizione ERF1 ed ORA59 favoriscono questo crosstalk, mentre MYC2 favorisce esclusivamente il pathway del JA inibendo quello dell'ET (Petersen et al., 2009). In *Arabidopsis* è stata ampiamente verificata la necessità della sinergia ET-JA per l'insorgenza dell'ISR o per attivare pienamente i geni JA-dipendenti (Petersen et al., 2009). Inoltre questo crosstalk favorisce la difesa contro i necrotrofi.

Il pathway ET-SA è sia di natura inibitoria che sinergica (Kunkel and Brooks, 2002). Infatti è stato dimostrato che ET incrementa notevolmente la risposta indotta da SA mediante l'azione di EIN2, dando un'amplificata espressione del gene PR1b in *Arabidopsis* (Lawton et al., 1994; DeVos et al., 2006). Tuttavia altri studi hanno evidenziato un'elevata espressione di geni SA-dipendenti nei mutanti per ET in *Arabidopsis*.

Da tutto ciò emerge che le relazioni tra i vari pathway sono enormemente complesse e di varia natura.

Oltre a questi fitormoni principali, nella difesa ne intervengono anche altri. ABA da un lato inibisce il pathway di SA (Adie *et al.*, 2006) e la presenza della SAR inibisce l'espressione di geni ABA-dipendenti, dall'altro favorisce il pathway solo del JA perchè favorisce l'azione di MYC2 e quindi antagonizza il pathway combinato JA-ET (Anderson *et al.*, 2004).

Le auxine svolgono un ruolo importante per tutta la vita della pianta interagendo con tutti i pathways in vari modi: generalmente favoriscono la biosintesi del JA, mentre reprimono il pathway del SA il quale ha un'azione inibitoria sulle auxine stesse (Nagpal *et al.*, 2005).

Le giberelline interagiscono con i vari pathway modulando la presenza della proteina DELLA la quale promuove la suscettibilità a patogeni biotrofi e resistenza ai necrotrofi. Quindi regolando la sua degradazione si inibisce la risposta di difesa mediata dal JA favorendo così la risposta ai patogeni biotrofi (Navarro *et al.*, 2006).

Le citochine agiscono insieme con le auxine anche se in realtà si conosce molto poco circa il loro coinvolgimento nei vari pathway. Tuttavia è nota la loro importanza nella differenziazione e divisione dei tessuti vegetali.

I brassinosteroidi hanno un ruolo molto importante nello sviluppo e differenziazione cellulare. È nota la presenza di un recettore nelle cellule per i brassinosteroidi che interagisce con BAK1, ma la sua completa funzione ancora non è stata completamente chiarita.

1.4 Regolazione trascrizionale

Durante la loro esistenza le piante devono rispondere a tutti gli stimoli sia interni che esterni che riescono a percepire al fine di adattarsi nel più breve tempo e nel miglior modo possibile alle diverse condizioni in cui vengono a trovarsi. Tali condizioni comprendono lo sviluppo, la riproduzione, la risposta agli stimoli della luce, il metabolismo e non ultima la presenza di stress. Nel corso dell'evoluzione gli eucarioti hanno imparato a modulare adeguatamente il loro trascrittoma, infatti una notevole parte del loro genoma contiene geni codificanti per proteine che regolano l'espressione. In *Arabidopsis* per esempio è stato dimostrato che il 15% del cromosoma 4 codifica per fattori regolatori dell'espressione (Singh, 1998), mentre per altre specie vegetali la percentuale può oscillare da 6% al 10% a seconda dei database (Zorrilla *et al.*, 2014).

I fattori coinvolti nella regolazione hanno funzioni diverse ed agiscono a diversi livelli in modo da creare un complesso proteico che agisce in maniera combinatoria. Sono infatti stati raggruppati in quattro principali famiglie:

1. attivatori/repressori, proteine che riconoscono una sequenza specifica nel promotore di un gene, la legano inducendo un effetto che può essere positivo se favorisce l'espressione del gene o negativo se la reprime;
2. coattivatori/corepressori, proteine che coadiuvano gli attivatori o repressori nel loro ruolo ma senza i quali non potrebbero agire poiché non interagiscono fisicamente con il DNA;
3. fattori di trascrizione generali, proteine appartenenti a famiglie diverse che hanno un motivo caratteristico che permette loro di interagire con il DNA al fine di formare il complesso trascrizionale che trascrive il gene espresso;
4. fattori di rimodellamento, proteine che rimodellano il DNA rendendo più accessibili i siti di legame del promotore ai fattori di trascrizione.

Il complesso enzimatico trascrizionale ha un peso di circa 2500000 Da e solamente in lievito mostra essere composto di 14 subunità. Oltre alla RNA polimerasi II sono richieste altre proteine che permettono il legame sul promotore e l'avvio della trascrizione. Alcune di queste proteine mostrano essere TATA box Binding Protein (TBP) come TFIID, fattore di trascrizione generale a cui si aggiungono altre proteine chiamate, TBP Associated Factor (TAFs).

Tuttavia queste interazioni avvengono in base allo stato del compattamento della cromatina. Essa è costituita dalla doppia elica del DNA che si avvolge per 146 bp intorno all'ottamero istonico per formare il nucleosoma. Tale ottamero istonico è formato da proteine chiamate istoni, aventi carica positiva che quindi interagiscono facilmente con il DNA che invece ha una carica negativa. Gli istoni che costituiscono l'ottamero sono di 4 tipi e formano due dischi che poi si accoppiano uno sopra l'altro per formare l'ottamero vero e proprio. Le proteine istoniche sono: H2A, H2B che formano un dimeri; H3 e H4 che ne formano un altro. I due dimeri si uniscono per dare la prima metà del nucleosoma a cui se ne aggiunge un'altra. Gli istoni H2A e H2B sono molto conservate sia nelle piante che negli animali, mentre gli istoni H3 e H4 possono essere specie o addirittura tessuto specifici.

Nel momento in cui il DNA si avvolge intorno agli istoni per formare il nucleosoma, che costituisce il primo livello di avvolgimento, le code N-terminali degli istoni protrudono all'esterno e questa condizione è molto utile poiché possono essere oggetto di modifiche enzimatiche che fanno variare l'intensità dell'interazione DNA-istoni.

Se il grado di compattamento tra DNA e gli istoni è molto elevato si parla di condizioni di eterocromatina, la quale non permette l'accesso all'apparato trascrizionale e quindi i geni in esso contenuti rimangono silenti o spenti; se invece il legame non è così forte si parla di eucromatina, che invece permette l'accesso dell'apparato trascrizionale al fine di fare esprimere i geni contenuti

che quindi sono accesi. È possibile passare da uno stato di eterocromatina ad uno di eucromatina mediante l'azione di enzimi specifici, acetilasi appartenenti alla famiglia delle Histone Acetyl Transferase (HAT), le quali aggiungono un gruppo acetile alla coda N-terminale soprattutto degli istoni H3 e H4 per alterare momentaneamente il legame DNA-ottamero istonico in modo da permettere l'accesso all'apparato trascrizionale. Processo inverso è mediato dalle deacetilasi che rimuovono il gruppo acetile facendo aumentare l'affinità di legame tra DNA e gli istoni riportando l'eucromatina ad una condizione di eterocromatina.

Per completezza è bene precisare che l'eterocromatina può essere di due tipi: facoltativa, se può essere convertita momentaneamente in eucromatina e quindi i geni in essa contenuti sono momentaneamente silenti; costitutiva, se non potrà mai essere convertita in eucromatina.

Quest'ultima infatti è presente in precise zone dei cromosomi come i telomeri ed i centromeri, che in massima parte non mostrano avere valore genico.

1.5 Principali famiglie di fattori di trascrizione vegetali

Nelle piante i fattori di trascrizione contengono una grande varietà di motivi strutturali che permettono il loro legame a sequenze specifiche di DNA (Singh, 1998). Tra le più studiate e note abbiamo le seguenti:

famiglia ERF: questa famiglia è compresa nella superfamiglia dei fattori di trascrizione di APETALA2/ethylene-responsive element binding protein (AP2/EREBP), superfamiglia di fattori di trascrizione che contiene a sua volta tre famiglie: AP2, RAV ed ERF. Tutti i componenti sono caratterizzati dalla presenza di un dominio che lega il DNA AP2/ERF costituito da 60-70 amminoacidi (Rashid et al., 2012) (FIG.3). La sequenza consenso con cui interagiscono è chiamata GCC box ed è presente nei promotori di geni etilene-sensibili. Essa ha la seguente sequenza: TAAGAGCCGCC. Il dominio di legame al DNA è stato analizzato con la risonanza magnetica nucleare ed è emerso che ha una struttura con tre foglietti- β antiparalleli ed una α -elica (Allen et al., 1998). I residui di Trp ed Arg presenti nel foglietto- β sono cruciali per l'interazione con il DNA. Sono stati individuati numerosi rappresentanti nel genoma di molte specie vegetali: 145 in *Arabidopsis* (Nagako et al., 2006), 200 in pioppo (Zhuang et al., 2008) e 163 in riso (Sharoni et al., 2011). Questi fattori di trascrizione sono coinvolti non solo nella risposta a stress abiotici e biotici (Singh et al., 2002), ma anche a processi di sviluppo e crescita (Rashid et al., 2012). Curiosamente, se un tempo si pensava che fossero esclusivamente specifici delle piante (Singh et al., 2002), Wuitschick e colleghi nel 2003 hanno confutato questa ipotesi individuando il dominio AP2/ERF in

geni del ciliato *Tetrahymena Thermophila* ed in un cianobatterio chiamato *Trichodesmium erythaeum*. La spiegazione di questa presenza è stata imputata ad un trasferimento genico orizzontale.

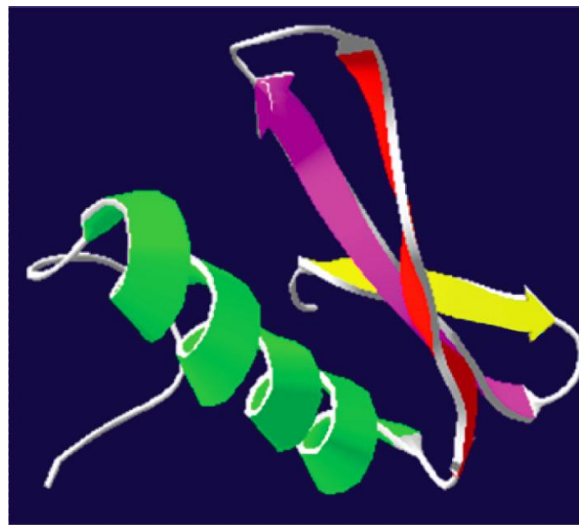


FIG.3. DOMINIO ERF

Famiglia b/ZIP: i fattori di trascrizione Basic Domain Leucine Zipper (b/ZIP) sono dimeri caratterizzati da un dominio conservato contenente dai 40 agli 80 residui amminoacidici (b/ZIP domain), composto da due motivi strutturali di α -eliche, una contenente una regione basica di circa 16 amminoacidi che permette la localizzazione nucleare ed il contatto con il DNA, l'altra mostra le ripetizioni di 7 leucine (ZIP leucine) che permettono la dimerizzazione (Correa et al., 2008). Le due subunità interagiscono idrofobicamente mediante le due eliche dando una struttura a super coiled-coil. Riconoscono e legano la sequenza consenso sul DNA contenente un ACGT core (Jalali et al., 2006) (FIG.4). Questa famiglia è presente in tutti gli eucarioti ed in *Arabidopsis* se ne contano 77 membri, in riso 92 membri. In *Arabidopsis* i membri sono stati suddivisi in 10 gruppi (Jakoby et al., 2002), di cui è degno di nota il gruppo A comprendente i fattori coinvolti nella risposta allo stress ed allo sviluppo (Jalali et al., 2006). Tali fattori sono chiamati TGA/Octopine synthase (ocs)-element-Binding Factor (OBF), interagiscono con NPR1, componente chiave della segnalazione del pathway del SA. La loro sequenza consenso è la TGA box: TGACGTCA.



FIG.4. DOMINIO bZIP CHE INTERAGISCE CON IL DNA.

Famiglia MYB: i fattori di trascrizione della superfamiglia MYB sono stati individuati per la prima volta nel v-MYB gene nel virus mieloblastosi (MYeloBlastosis) aviario (AMV) (Klempnauer et al., 1982) e successivamente nei vertebrati (Weston, 1998). Nelle piante venne individuato per la prima volta in *Zea mais* da Paz-Ares e colleghi nel 1987 durante uno studio sulla biosintesi delle antocianine. Sono presenti in tutti gli eucarioti e sono coinvolti nei processi biologici di sviluppo, crescita, proliferazione, difesa. Le proteine MYB contengono un dominio caratteristico di circa 52 residui amminoacidici che formano un motivo helix-turn-helix con tre residui di Trp spazati regolarmente tra loro. L' α -elica interagisce con la scanalatura maggiore del DNA legando il core conservato TAAC (Gin and Martin, 1999) (FIG.5). Tali fattori di trascrizione sono stati raggruppati in 4 sottogruppi in base al numero di domini MYB contenuti nella loro struttura. Sono presenti sia nelle monocotiledoni che nelle dicotiledoni: in *Oryza sativa* ne sono state individuate 155 ed in *Arabidopsis thaliana* 197 (Katiyar et al., 2012).

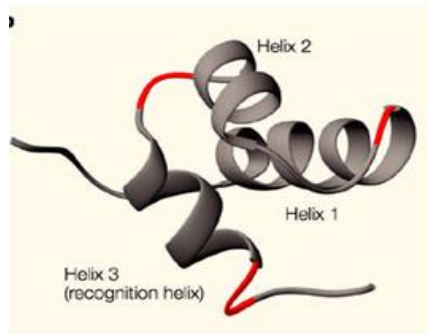


FIG.5: DOMINIO MYB

Famiglia MYC: i fattori di trascrizione MYC sono stati individuati per primi nel virus MyeloCytomatosi e sono caratterizzati dalla presenza del dominio basico helix-loop-helix (b/HLH) composto da circa 60 residui amminoacidici con due distinte funzioni: la zona dell'N terminale comprende 15 amminoacidi che legano il DNA, la zona in corrispondenza del C terminale è deputata alla formazione dei dimeri (Toledo-Ortiz et al., 2003). Il dominio b/HLH è costituito da due α -eliche distanziate tra loro (FIG.6). La sequenza riconosciuta sul DNA è composta da un esanucleotide chiamato E-box: CANNTG. In natura ce ne sono di vari tipi, per esempio esiste il G-box: CACGTG che varia solo nella parte centrale del core. Alcuni fattori MYC li legano specificamente, altri no (Robinson et al., 2000). Questa superfamiglia di fattori di trascrizione è ampiamente distribuita in tutti gli eucarioti in cui sono coinvolti in numerosi processi biologici tra cui anche quelli delle risposte allo stress.

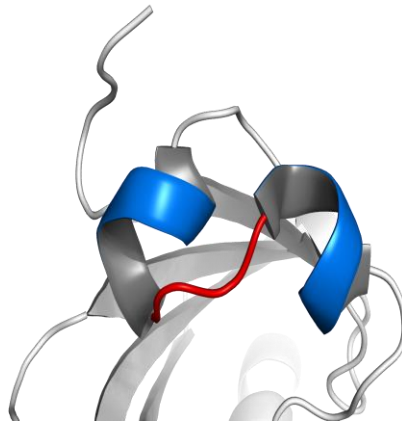


FIG.6. DOMINIO b/HLH

Famiglia DOF: la famiglia dei fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia DNA binding with One Finger (DOF) contiene nella sua struttura un dominio zinc finger di 52 amminoacidi con motivo C2/C2 (FIG.7) la quale permette di legare il *cis-acting* element con il core T/AAAAG (Yanagisawa et al., 1999). Alcuni studi hanno evidenziato la capacità di questi fattori di trascrizione di interagire con altri come bZIP (Kang and Singh, 2000) e le High Mobility Group (HMG) (Yanagisawa, 2004). Sembrano essere coinvolti in innumerevoli processi biologici come lo sviluppo, la segnalazione mediata dai fitormoni (Kisu et al., 1998; Mena et al., 2002) e le risposte agli stress abiotici e biotici (Yanagisawa, 2002; Kang et al., 2003). Sono specifici del regno vegetale e sono stati individuati 37 geni in *Arabidopsis* e 30 in riso (Hernando-Amado et al., 2012).

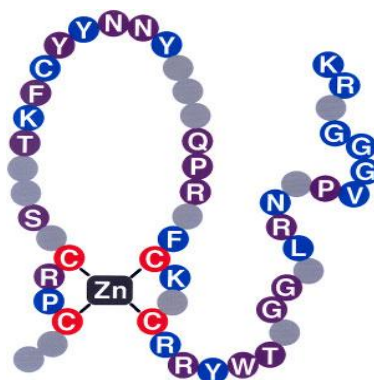


FIG.7. DOMINIO DOF

Famiglia NAC: le proteine della famiglia NAC (NAM (no apical meristem), ATAF (Arabidopsis transcription activation factor), CUC (cup-shaped cotyledon)) sono specifiche del regno vegetale. Essi contengono un dominio NAC all'N terminale comprendente circa 160 residui amminoacidici, suddivisi a sua volta in 5 sottodomini contenenti dei foglietti- β uniti tra loro mediante α -eliche (FIG.8). Sono coinvolti in molti processi di sviluppo e risposte allo stress. Sono stati individuati 105 geni NAC in Arabidopsis e 140 in riso (Hu et al., 2010).



FIG.8. DOMINIO NAC

Famiglia WHIRLY: la famiglia dei fattori di trascrizione WHIRLY costituiscono una piccola famiglia presente nelle angiosperme (Krause et al., 2009). Nella maggior parte delle specie sono presenti solo 2 proteine (Whirly1 e Whirly2) ma in Arabidopsis è presente una terza (Desveaux et al., 2005). Tutte mostrano avere una sequenza target all'N terminale che le fa dirigere verso i mitocondri (whirly 2) o i cloroplasti (whirly 1-3). In generale mostrano tutte lo stesso punto isoelettrico e le stesse dimensioni. Dal punto di vista strutturale sono composte da un tetramero dalla forma WHIRLIGIG (trottola in inglese), da cui il nome della famiglia (Krause et al., 2009). Infatti in ogni monomero è presente un motivo ripetuto due volte composto da 4 foglietti- β , un' α -elica e 4 foglietti- β (Desveaux et al., 2002). I monomeri interagiscono tra loro mediante un motivo helix-loop-helix posizionato in prossimità dell'estremità C-terminale (Desveaux et al., 2002) (FIG.9). Essi riconoscono una sequenza consenso sul singolo filamento di DNA: GTCAAA(AA). La loro interazione con il DNA è stabilizzata da altre interazioni che si instaurano con i fattori di trascrizione WRKY e bZIP che legano il filamento complementare (Despres et al., 2000).

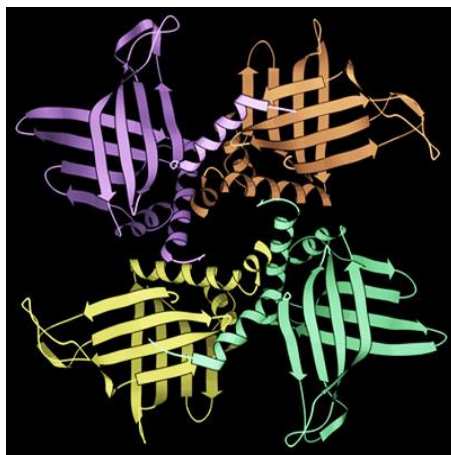


FIG.9. TETRAMERO DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE WHIRLY.

Famiglia WRKY: i membri appartenenti a questa famiglia sono implicati in molte vie di segnalazione cellulare per lo sviluppo, ma soprattutto in quelle della difesa (Somssich, 2009; Singh et al. 2002). Sono caratterizzati dalla presenza di almeno un dominio WRKY, caratteristico della famiglia (Eulgem et al., 2000), tale dominio, situato in prossimità dell'N terminale, è composto da 60 amminoacidi che cominciano con la sequenza W R K Y G Q K, da cui il nome ed un motivo Zn finger con sequenza: C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X1-H/C che lega la sequenza consenso detta W box: (T)(T)TGAC(C/T) con il core TGAC altamente conservato (FIG.10).

I fattori di trascrizione WRKY sono stati suddivisi in tre gruppi sulla base del numero di domini WRKY che contengono. Le proteine appartenenti al primo gruppo mostrano avere due domini caratteristici in prossimità delle due estremità: quello all'N terminale interagisce con la W box, mentre l'altro probabilmente favorisce l'interazione con un'altra proteina o aiuta la stabilizzazione del legame con il DNA (Eulgem et al., 2000). Le proteine del secondo gruppo mostrano un solo dominio WRKY, ma analisi filogenetiche hanno permesso un'ulteriore divisione in 5 sottogruppi caratterizzati da altri domini strutturali. Le proteine appartenenti al terzo gruppo hanno un solo dominio WRKY, ma uno Zn finger strutturato diversamente, invece che C2-H2 ha la seguente struttura C2-HC.

Il singolo dominio WRKY presente nei gruppi due e tre è funzionalmente equivalente a quello in prossimità del C-terminale di quelle del gruppo uno.

Questi fattori di trascrizione sono presenti negli eucarioti ed in *Arabidopsis* sono stati individuati 72 geni (Eulgem and Somssich, 2007).

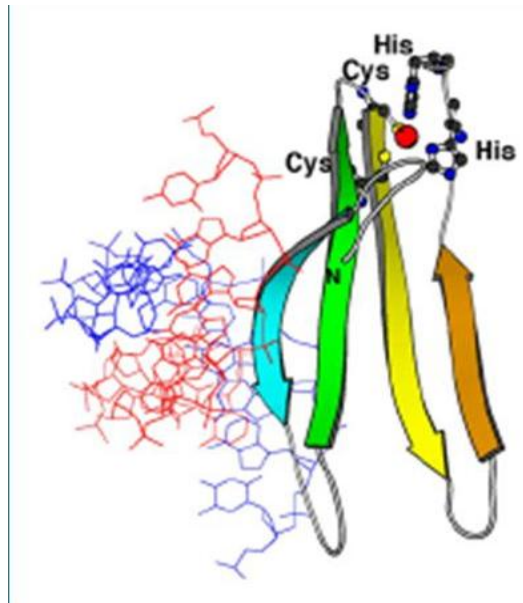


FIG.10. DOMINIO WRKY

Il sistema immunitario vegetale si è evoluto per far fronte ai più diversi attacchi dei patogeni ed agli stress in generale. Da qui la necessità di modulare adeguatamente l'espressione genica mediante dei fattori di trascrizione i quali hanno dei domini strutturali specifici che li rendono capaci di rispondere nella maniera più opportuna alle condizioni di stress in cui vengono a trovarsi.

1.6 Regolazione epigenetica

L'epigenetica è la branca della genetica che si occupa dello studio dei cambiamenti dell'espressione genica che avvengono in assenza di modifiche della sequenza. In tutti gli esseri viventi i meccanismi epigenetici sono cruciali per un corretto sviluppo e le loro alterazioni si traducono per quanto riguarda l'uomo in sindromi o cancro (Rival et al., 2010).

Oggetto di questa disciplina sono le modifiche a carico degli istoni, la metilazione del DNA e le sequenze di RNA non codificante; i primi due sono anche oggetto di studio di questa tesi di dottorato e quindi verranno affrontati in maniera più approfondita.

La molecola del DNA ha una struttura a doppia elica che all'interno delle cellule assume diversi gradi di compattamento al fine di localizzarsi all'interno del nucleo. Tale compattamento si realizza per mezzo di legami tra il DNA e proteine di compattamento. Il primo gruppo di proteine con cui entra in contatto il DNA sono gli istoni, proteine di piccole dimensioni aventi natura basica e cariche positivamente. Tali proteine formano un complesso proteico chiamato ottamero istonico attorno al quale il DNA si avvolge per 146 bp (come descritto in precedenza). Le interazioni sono favorite grazie alla carica negativa della molecola del DNA che quindi instaura interazioni elettrostatiche con l'ottamero istonico. In questa maniera si forma il nucleosoma. Gli istoni inoltre hanno anche la caratteristica di avere delle code contenenti un numero di residui amminioacidici che oscilla da 25 a 40 (Grant, 2001) e che protrudono verso l'esterno. Da un lato stabilizzano l'avvolgimento del DNA, dall'altro possono essere oggetto di modifiche a carico delle code all' N-terminale. Tali modifiche post-traduzionali hanno effetto sull'espressione genica.

Successivamente agiscono altre proteine dello schaffold (o dell'impalcatura) che permettono di raggiungere dei compattamenti sempre maggiori fino a costituire il cromosoma, in cui si arriva al livello massimo di compattamento (FIG.11).

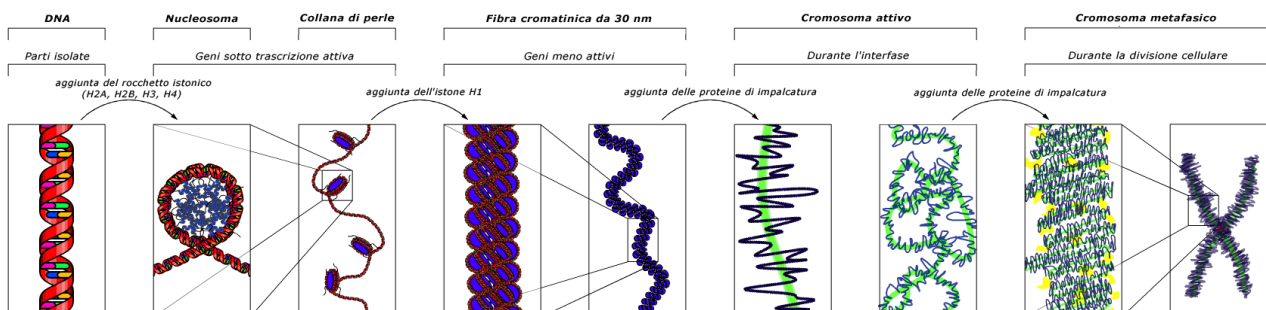


FIG.11. GRADI DI COMPATTAMENTO DEL DNA.

L'insieme del DNA con le proteine di compattamento è chiamato cromatina. Essa può essere di due tipi: eucromatina, cromatina poco compattata e trascrizionalmente attiva in cui i geni sono accessibili all'apparato trascrizionale; eterocromatina, cromatina caratterizzata da un grado di compattamento maggiore in cui l'apparato trascrizionale non può accedere e quindi i geni in essa compresi sono trascrizionalmente silenti (come descritto precedentemente).

La cromatina non è una struttura statica, anzi è molto dinamica poiché permette all'organismo di reagire adeguatamente agli stimoli ambientali. Tutto ciò è permesso da dei complessi di rimodellamento presenti sia nelle piante che negli animali (Li et al., 2002). Di questo gruppo di complessi di rimodellamento fa parte SWI/SNF, molto conservato sia nelle piante che negli animali, il quale permette una maggiore accessibilità al DNA per fattori di trascrizione ed altre proteine mediante l'idrolisi di ATP per destabilizzare temporaneamente il legame DNA-istoni (Li et al., 2002). Un altro complesso è costituito dalle acetiltransferasi presenti sia nelle piante che negli animali e sono di due tipi: A, localizzata nel citoplasma; B, localizzata nel nucleo. Essi aggiungono un gruppo acetile sulle Lys delle code N-terminali degli istoni H3 e H4, favorendo il distacco momentaneo del DNA dagli istoni e quindi favorendo la trascrizione. Il complesso che agisce in maniera diametralmente opposta è costituito dalle deacetilasi, enzimi che rimuovono il suddetto gruppo acetile favorendo un ricompattamento del nucleosoma, inibendo quindi la trascrizione. Le piante mostrano avere tre tipi di deacetilasi, contrariamente agli animali ed ai lieviti che invece ne hanno solo due (Li et al., 2002). Un altro gruppo molto importante è quello costituito dalle proteine Polycomb Group (Pc-G), il quale svolge sia nelle piante che negli animali un ruolo di repressore genico con un meccanismo ancora non noto (Pirrotta, 1998). La sua funzione comunque è quella di evitare una sovra-espressione di geni dello sviluppo che, se fosse fuori controllo, indurrebbe malformazioni e morte. Un ulteriore gruppo di proteine è quello della Chromatin assembly factor-1 (CAF1), coinvolto nell'assemblamento della cromatina durante la replicazione e la riparazione. Quest'ultimo favorisce la stabilità del genoma (Li et al., 2002). Inoltre può anche avvenire una sostituzione dell'istone H2A con un altro chiamato H2A.Z, caratteristico delle zone densamente trascritte.

Nell'ambito dell'epigenetica, un ruolo importante è svolto dagli istoni i quali, per la loro tendenza a compattare il DNA, sono dei repressori genici inoltre bloccano fisicamente l'accesso ad altre proteine, ed esperimenti in cui venivano deleti davano come risultato un'incrementata espressione genica (Lauria and Rossi, 2011). Le modifiche post-traduzionali di cui sono oggetto le code istoniche sono schematicamente riportate nella figura sottostante (FIG.12). Come è possibile osservare, esse sono per lo più localizzate in corrispondenza dell'N-terminale, mentre l'ubiquitinazione avviene al C terminale.

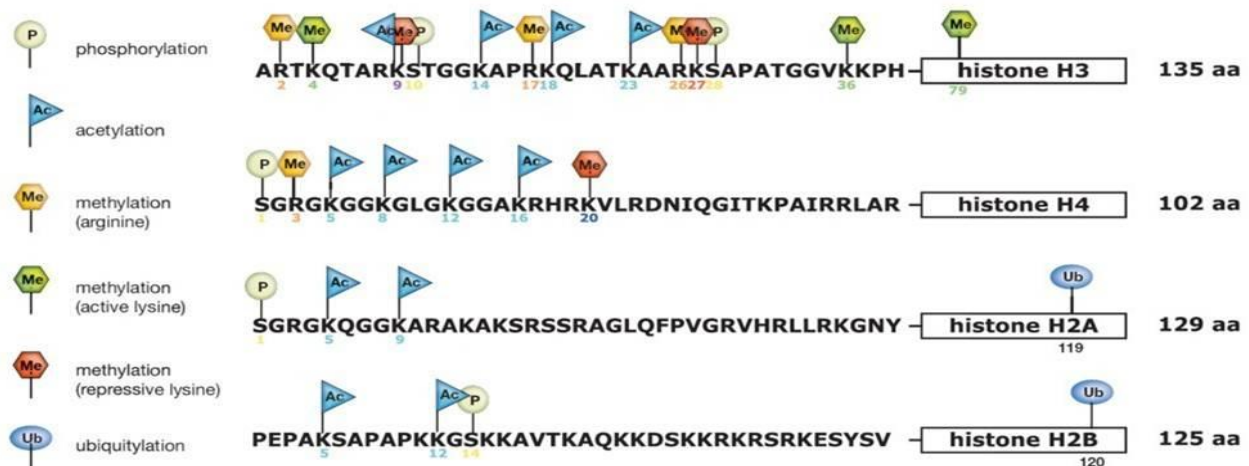


FIG.12. MODIFICHE ISTONICHE

Come già ampiamente descritto in precedenza l'acetilazione consiste nell'aggiunta di un gruppo acetile sul residuo di Lys al fine di favorire l'espressione genica.

La fosforilazione è una modifica post traduzionale a carico delle Ser, Thr e Tyr. Oggetto tra i più interessanti di questa modifica è la Ser 10 dell'istone H3 la cui fosforilazione induce effetti diversi: favorisce l'espressione genica, ma è anche fondamentale per la condensazione dei cromosomi nella mitosi (Baek, 2011). Infatti, la fosforilazione sulla Ser 10 di H3 sembra favorire l'acetilazione della Lys 14 di H3 e quindi l'attivazione trascrizionale; invece, se la fosforilazione è presente contemporaneamente su Ser 10, Ser 28 e Thr 11, sembra esserci la condensazione mitotica (Baek, 2011).

L'ubiquitinazione è l'unica modifica che avviene aggiungendo una o più proteine di ubiquitina in corrispondenza del C-terminale a carico di una Lys degli istoni H2A e H2B. In quest'ultimo è possibile aggiungere una sola molecola di ubiquitina, invece nel H2A, anche più di una. Questa modificazione sembra essere correlata con un incremento dell'espressione genica (Zhang, 2014).

In natura sono presenti anche altre modifiche istoniche, non ancora del tutto chiare per funzione e meccanismi come la sumoilazione, ADP ribosilazione, lisina crotonilazione, tirosina idrossilazione e la metilazione. Tutte insieme queste modifiche creano un codice, decifrabile da proteine specifiche (Li *et al.*, 2008).

Tra le modifiche post-traduzionali a cui possono essere soggette le code istoniche vi è la metilazione. Tale modifica avviene mediante un trasferimento del gruppo metile su residui di Lys o

Arg ad opera di metiltransferasi.

Il suo significato epigenetico non è affatto univoco infatti agisce sia da attivatore che repressore trascrizionale (Jaskiewicz et al., 2011) in base a quale residuo è modificato e quanti gruppo metili sono presenti (Li et al., 2008).

La metilazione a carico dell'Arg avviene ad opera di enzimi arginina-metiltransferasi chiamati Protein Arginine Methyl Transferase (PRMT) i quali trasferiscono il gruppo metile da S-adenosyl-L-Methionine (SAM). I residui di arginina possono essere mono e di- metilati con due differenti modalità: asimmetrica e simmetrica, per questo gli enzimi sono stati raggruppati in due categorie, rispettivamente PRMT I e II. Tuttavia mostrano avere tutte un core molto conservato comprendente il sito di legame ed il sito catalitico (Zhang and Reinberg, 2001) (FIG.13).

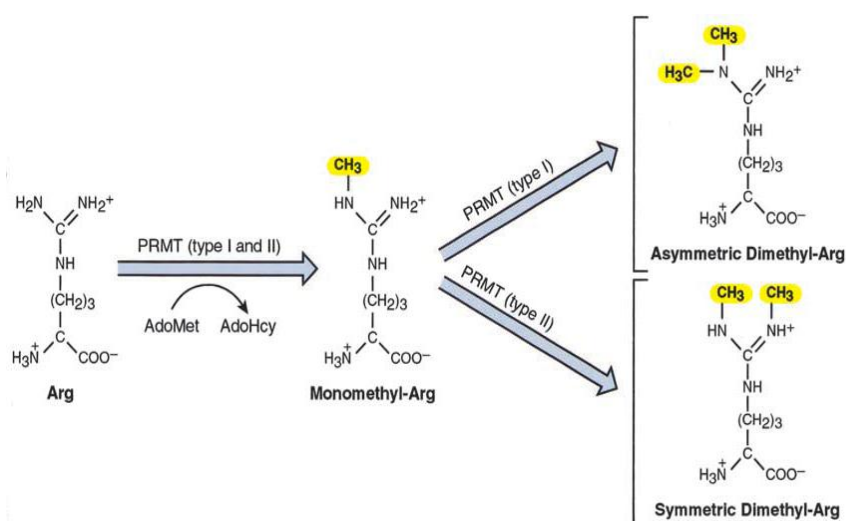


FIG.13. AZIONE DEGLI ENZIMI PRMT I E II

Come anticipato, anche le Lys possono essere oggetto di metilazione da parte di metiltransferasi istoniche (Histone Methyl-Transferase, HMT) (FIG.14). Possono acquistare fino a tre gruppi metili, anche se non è ancora chiaro se questa reazione sia catalizzata sempre dallo stesso enzima HMT (Zhang and Reinberg, 2001).

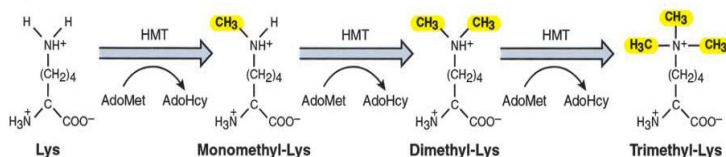


FIG.14. METILAZIONE DELLA LISINA

La metilazione avviene soprattutto a carico degli istoni H3 ed H4, in cui sembrano essere preferiti dei residui amminioacidici piuttosto che altri. Infatti la metilazione avviene più frequentemente su Lys 4, 9, 27 e 36 dell'istone H3 e Lys 20 dell'istone H4 (Zhang and Reingberg, 2001).

Studi recenti si sono concentrati sul significato di queste modifiche: la metilazione di Lys 9 e 27 dell'istone H3 e Lys 20 dell'istone H4 influenzano la formazione dell'eterocromatina, l'inattivazione del cromosoma X ed il silenziamento genico. La metilazione di Lys 4, 36 e 79 dell'istone H3 sono associate generalmente all'attivazione trascrizionale (Li et al., 2008). Nelle cellule T umane, la monometilazione della Lys 9, 27, 79 dell'istone H3 sono associate all'espressione genica, mentre la loro trimetilazione induce silenziamento genico (Li et al., 2008).

In particolar modo è oggetto di attenzione degli scienziati e di questa tesi la metilazione a carico della Lys 4 dell'istone H3. Essa può essere oggetto di mono-, di- e trimetilazione, ognuna con un effetto diverso: la condizione di monometilazione non sembra dare alcun effetto sulla trascrizione genica, la condizione di dimetilazione rende l'accesso alla cromatina più facilitato per l'apparato trascrizionale creando uno stato permissivo alla trascrizione, la condizione di trimetilazione favorisce fortemente l'espressione genica rendendo il DNA molto accessibile all'apparato trascrizionale (Li et al., 2008; He et al., 2010; Zhao and Zhou, 2012).

Inoltre recentemente è stata avanzata l'ipotesi che la di- e trimetilazione possano essere generate durante la fase dell'elongazione della polimerasi (Pavri et al., 2006); perciò in futuro sarà interessante comprendere se la trimetilazione è una conseguenza del passaggio della polimerasi oppure se ha una funzione attiva nel rimodellamento della cromatina (Li et al., 2007).

1.7 La metilazione del DNA

Tra i vari meccanismi epigenetici che regolano l'espressione genica nelle cellule un ruolo di rilievo merita la metilazione del DNA, modifica molto comune negli eucarioti superiori (Li et al., 2002). Essa è a carico di una citosina che diventa 5-metil-citosina ed è eseguita da enzimi che fanno parte della famiglia delle metiltransferasi. Tale modifica nelle piante può avvenire in ogni contesto di sequenza in cui si trova la citosina: simmetrica come il dinucleotide CG, oppure CHG; asimmetrica come la sequenza CHH, in cui H è una qualsiasi base diversa dalla guanina. La differenza è che la prima è ereditabile della progenie, l'altra deve essere rinnovata (Jones et al., 2001). Negli animali tale metilazione sembra avvenire esclusivamente nel dinucleotide CG (Akimoto et al., 2007).

In *Arabidopsis* la metilazione è instaurata *de novo* da una Domain-Rearranged Methyltransferase (DMT), mentre viene mantenuta da metilasi di mantenimento come Methyltransferase 1 (MET1)

nel dinucleotide CG e Chromomethyltransferase 3 (CMT3) in CHG (Li et al., 2002).

In generale sembra che nei vertebrati, i dinucleotidi CG siano ampiamente metilati in tutto il genoma tranne che nelle isole CG, mentre nelle piante, negli invertebrati e nei funghi sembra sia presente un pattern di distribuzione a mosaico in cui zone altamente metilate si alternano ad altre poco metilate (Feng et al., 2010). In particolare sembra che nei mammiferi ci sia un livello di metilazione totale del 4% del genoma, mentre per le piante si raggiunge un valore del 30% (Akimoto et al., 2007) poiché è presente una notevole differenza del valore della densità genica: nelle piante sono presenti molti più geni rispetto ai mammiferi (Li et al., 2008).

La funzione della metilazione del DNA è generalmente di repressione trascrizionale perchè richiama proteine di silenziamento come HP1 o l'istone H1, inducendo così il silenziamento genico (Li et al., 2002; Feng et al., 2008; Lauria and Rossi, 2011). Tuttavia recenti analisi hanno evidenziato che, per quanto riguarda *Arabidopsis*, circa un terzo dei geni espressi mostrano avere metilazione nella sequenza genica (Zemach and Grafi, 2007).

Quindi bisogna analizzare le modifiche epigenetiche non singolarmente, ma il loro effetto globale sull'espressione genica poiché una singola modifica presa singolarmente non avrà lo stesso effetto se contestualizzata con altre (Li et al., 2008). Quindi è importante comprendere come interagiscono queste modifiche tra loro (FIG.15). La metilazione del DNA è coinvolta anche in altri processi biologici come la difesa contro la diffusione dei trasposoni, l'imprinting, il silenziamento dei transgeni (Li et al., 2008).

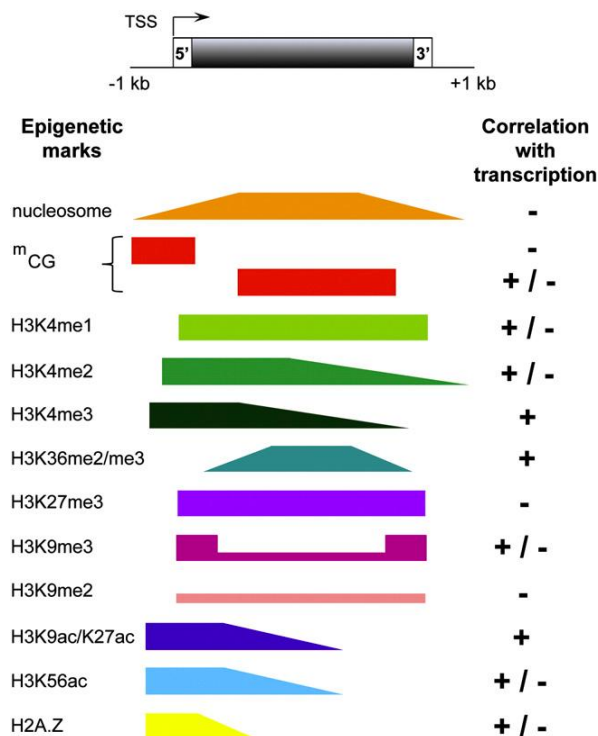


FIG.15. ESEMPIO DI MODIFICHE EPIGENETICHE E LORO EFFETTI SULLA TRASCRIZIONE GENICA (adattata da Lauria and Rossi, 2011). TSS= sito di start della trascrizione.

1.8 Il riso

1.8.1 Descrizione della pianta del riso

La pianta studiata in questo lavoro di tesi è la monocotiledone modello *Oryza sativa* spp. *Japonica* cultivar carnaroli. Essa appartiene alla famiglia delle poacee o graminacee, all'ordine delle poales, alla classe delle liliopside e al phylum delle magnoliophyta.

Il seme, chiamato anche cariosside o chicco è caratterizzato da rivestimenti esterni (glumella) che hanno lo scopo di proteggere l'embrione posizionato più internamente e circondato quasi interamente dalla parte amidacea ricca di nutrienti per il suo sviluppo (FIG. 16).

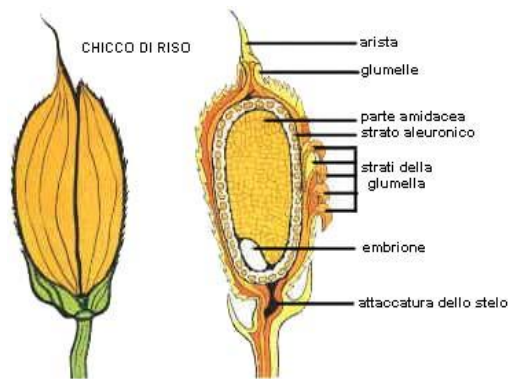


FIG.16. STRUTTURA INTERNA DI UN CHICCO DI RISO.

Il seme ha bisogno di essere imbibito di acqua per germinare e dare i coleoptili, piccole piante in cui è possibile individuare una radice bianca ed un germoglio verde che si estendono in direzioni opposte. Nonostante il riso non sia una pianta acquatica, esso si sviluppa e cresce in ambiente acquatico in quanto ha delle radici con parenchima aerifero che permettono la sopravvivenza in quelle condizioni. Inoltre mostra avere un fusto (o culmo) con internodi cavi e pieni a cui aggiunge una foglia ogni 7 giorni fino a raggiungere un'altezza che varia dai 120 ai 200 cm circa in base alla specie. Una volta raggiunta la fase dell'infiorescenza, la pianta sviluppa una pannocchia contenente delle spighe alla sommità delle quali è presente un fiore ermafrodita che diventerà un seme. Una pianta necessita per uno sviluppo completo di circa 90 giorni.

La subspecie japonica cresce in climi temperati e pluviali come Giappone, Corea, Cina settentrionale, Brasile, USA, Egitto, Italia dando alta produttività con una cariosside corta ed arrotondata (FIG.17).



FIG.17. SEMI DI RISO CARNAROLI

1.8.2 Brevi cenni storici

Scavi archeologici condotti nei villaggi preistorici e protostorici in molte regioni dell'Asia, soprattutto nel sud-est, confermano che il riso era conosciuto ed utilizzato per l'alimentazione già 15000 anni fa mentre le prime tracce di coltivazione del riso nell'acqua, metodo utilizzato ancora oggi, risalgono a 5000 anni fa. Circa 2000 anni fa la coltivazione del riso è stata diffusa nella restante parte di Asia, ma è solo 1000 anni fa che il riso venne portato nel Mediterraneo dagli Arabi.

1.9 Immunità innata in *Oryza sativa*

1.9.1 Meccanismo dell'immunità innata mediato da Xa-21.

Negli anni '70 è stato individuato un gene da *Oryza longistaminata*, specie di riso selvatico, che conferiva resistenza ad ampio spettro contro vari tipi della malattia indotta da *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Tale gene è stato isolato da Song et al. nel 1995 e chiamato Xa21. Solo più recentemente si è chiarito una parte del meccanismo di cui fa parte (Lee et al., 2009).

Il recettore Xa21 è un recettore transmembrana, con un dominio extracellulare con ripetizioni ricche di leucina, le quali permettono l'interazione con il suo ligando, un dominio transmembrana chiamato dominio juxtamembrana (JM) ed un dominio intracellulare di natura chinasica (Song et al., 1995). I domini chinasici possono essere di due tipi: quelli identificati come RD mostrano la presenza di un'arginina (R) prima dell'aspartato catalitico (D); quelli denominato non-RD al posto dell'arginina hanno una cisteina o glicina. Normalmente questi ultimi sono associati in meccanismi di risposta precoce e Xa21 ne è un valido esempio (Park et al., 2010). L'analisi ad ampio spettro del genoma vegetale ha identificato la presenza una grande famiglia di recettori di superficie con dominio chinasico non RD ed in riso ne sono stati individuati ben 328, mentre in *Arabidopsis* sono in numero molto inferiore (Dardick and Ronald, 2006).

Mentre il dominio RD permette al recettore di attivarsi mediante un'autofosforilazione, quello non-RD ha meccanismi alternativi che conducono al medesimo risultato.

Il trascritto del gene codificante per Xa21 viene trasferito nel reticolo endoplasmatico dove viene tradotto. In questa fase interagisce con delle chaperonine e co-chaperonine come BiP3 e SDF2, fondamentali per la sua biogenesi poiché costituiscono il controllo qualitativo della neo proteina che, se corretta viene fatta migrare nella membrana plasmatica, altrimenti raggiunge il proteasoma per la degradazione mediante il complesso ER-associated degradation (ERAD). Quando il recettore

è presente all'interno delle membrane, in assenza del suo ligando, esso viene legato a livello citoplasmatico dalla proteina XB24, la quale mostra essere un'ATPasi con attività idrolitica. Associandosi con Xa21, XB24 induce l'autofosforilazione su un sito di Ser/Thr su Xa21 rendendolo inattivo.

Nel momento in cui nell'ambiente extracellulare è presente il suo ligando, il PAMP activator of Xa21-mediated immunity, detto Ax21, avviene l'interazione con il dominio LRR del recettore. Il legame è permesso dal riconoscimento di almeno un sito di sulfonazione sulla Tyr22 di Ax21. Studi di mutanti hanno evidenziato che mancando tale modifica a questa Tyr, il legame non può avvenire in alcuna maniera (Lee et al., 2009).

L'interazione diretta tra Xa21-Ax21 induce il rilascio di XB24 (fattore inibente l'attività del recettore) nonché una cascata di fosforilazione che culmina con l'espressione dei geni di difesa. Tale cascata sicuramente coinvolge un altro coattivatore, ma ad oggi non si è ancora capito chi possa essere. Tuttavia poiché in Arabidopsis un ruolo simile è svolto dalla proteina BAK1 (Li et al., 2002), si ipotizza che in riso essa possa avere il medesimo ruolo (Park et al., 2010).

E' stato evidenziato chiaramente il ruolo del dominio transmembrana JM, il quale regola l'attività chinasi inducendo un'auto/trans fosforilazione di proteine target a valle. In tutto ciò il residuo Thr 705 nel dominio JM di Xa21 svolge un ruolo principale per l'autofosforilazione, confermato da esperimenti svolti con mutanti (Chen et al., 2010).

In concomitanza, avviene anche una fosforilazione del RING finger di XB3, un'ubiquitina ligasi che è stato ipotizzato possa attivare anche la cascata della MAPK (Park et al., 2010). Tale segnalazione viene modulata negativamente dall'azione della proteina XB15, fosfatasi 2C la quale agisce defosforilando in maniera tempo e dose dipendente il recettore Xa21 rendendolo inattivo ed impedendo che la cascata del segnale raggiunga il nucleo permettendo l'espressione dei geni di difesa. Park e colleghi nel 2008 hanno studiato dei mutanti difettivi nell'espressione di XB15, i quali mostravano esprimere costitutivamente geni di difesa quali OsPR e morte cellulare spontanea. Da tutto ciò emerge quanto sia importante il ruolo di regolatore di XB15.

L'immunità innata appena descritta è rappresentata nella figura sottostante (FIG.18).

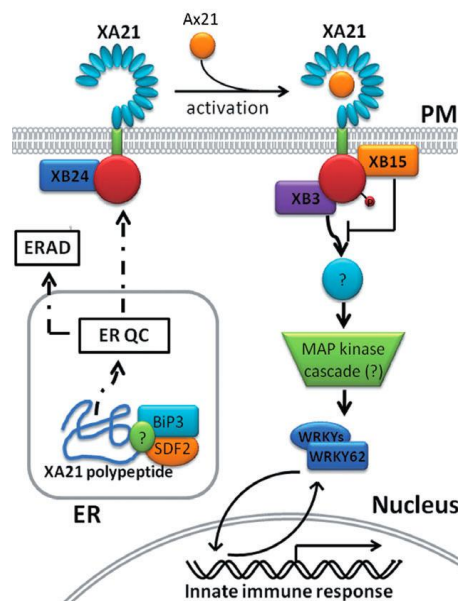


FIG.18. IMMUNITA' INNATA MEDIATA da XA21 (Adattata da Park et al., 2010). Durante la biogenesi di XA21 un ruolo importante è svolto dalle chaperonine e co chaperonine BiP3 e SDF2 che ne aiutano il folding ed il trasferimento sulla membrana (ER QC) o verso il proteasoma per la degradazione (ERAD). In condizioni di assenza di stress il recettore è in forma inattiva in quanto legato nel dominio chinasi intracellulare da XB24, un'ATPasi che fosforila un sito ser/thr. Il legame al suo ligando Ax21 mediante riconoscimento ed interazione con LRR extracellulari, induce il rilascio di XB24, ma induce il legame sia con XB3, ubiquitina ligasi che si è ipotizzato possa attivare la cascata della MAPK, sia con il regolatore negativo XB15 che rende inattivo il recettore in maniera tempo e dose dipendente. Il risultato di questa interazione è l'espressione di geni di difesa.

1.9.2 Immunità innata mediata da CEBIP

La chitina, N-acetil-D-glucosamina, è il costituente principale delle pareti fungine che, una volta riconosciuto induce sia nelle piante che negli animali delle risposte di difesa quali produzione di ROS, espressione delle proteine PR e produzione di fitoalessine, composti antifungini.

Nelle piante è presente una proteina che lega l'elicatore chitina, Chitin Elicitor Binding Protein (CEBIP). Essa è una glicoproteina di membrana contenente due domini LysM, mentre è priva di un dominio chinasi intracellulare. Esperimenti con mutanti difettivi nell'esprimere CEBIP, risultavano in una maggiore suscettibilità all'attacco fungino. Da qui l'idea del suo ruolo chiave nella difesa. È stata scoperta da Shimizu e colleghi nel 2010, la presenza di un'altra proteina chiamata Chitin elicitor receptor kinase 1 (CERK1 o LysM-RLK1) con capacità RD chinasi, la quale coadiuva l'azione di CEBIP, poiché in sua assenza CERK1 da solo non può innescare i meccanismi di difesa (Cheng and Ronald, 2011). Insieme, formano etero ed omodimeri che

innescano la cascata delle MAPK, portando alla formazione di ROS, espressione dei geni di difesa, produzione di fitoalessine ed incremento della concentrazione di acido fosfatidico (PA), molecola coinvolta nello sviluppo dei meccanismi di difesa (FIG.18).

1.9.3 Immunità innata mediata da OsFLS2

La flagellina è la proteina principale del flagello batterico. Essa induce delle risposte di difesa sia nelle piante che negli animali. Gomez and Boller nel 2000 studiarono come la pianta di *Arabidopsis* interagiva e rispondeva alla sua presenza, mettendo in luce la presenza di un sensore FLG2. In riso è stato individuato l'ortologo di questa proteina, chiamata OsFLG2 (Che et al., 2000) la quale innescava una serie di segnali di difesa, ad oggi non chiari che portano alla produzione di ROS, risposta di ipersensibilità ed espressione di geni PR (Tanaka et al., 2003) (FIG.18).

1.9.4 Immunità innata mediata da LPS

I batteri gram negativi sono caratterizzati dalla presenza nella loro parete di lipopolisaccaridi (LPS) i quali inducono dei meccanismi di difesa sia nelle piante che negli animali. Nello specifico per quanto riguarda le piante non è nota la proteina sensore che avvia il meccanismo di segnalazione che sembra sovrapporsi a quello della chitina. Quindi il risultato di questa segnalazione provoca produzione di ROS, risposta di ipersensibilità ed espressione dei geni di difesa (Desaki et al., 2006) (FIG.18).

1.9.5 Immunità indotta dagli effettori

Nelle piante, quindi anche nel riso, sono presenti delle proteine effettrici che riconoscono delle molecole associate al patogeno innescando i meccanismi di difesa più opportuni. Tali proteine mostrano avere un sito di legame al nucleo (NBS) ed una ripetizione ricca di leucina (LRR) (Yoshimura et al. 1998; Wang et al., 1999; Zou et al., 2006), anche se recentemente sono state individuate altre proteine che legano gli effettori prive delle ripetizioni ricche di leucina (Gu et al., 2005; Iyer and McCouch, 2004; Jiang et al., 2006) (FIG.18).

Manosalva e colleghi nel 2007 hanno identificato 12 proteine germin-like (OsGLP) che

conferiscono al riso resistenza a *M. grisea* e *Rhizoctonia solani*.

1.10 Trasduzione del segnale nell'immunità innata del riso

Le GTPasi RAC appartengono alla superfamiglia RAC. I membri di questa famiglia sono coinvolti nei processi di trasduzione del segnale poiché attivano le MAPK. Il genoma del riso contiene 7 geni codificanti RAC GTPasi. OsRAC1 è una piccola GTPasi indotta da molecole effettrici, chitina e sfingolipidi. Essa riconosce e lega proteine che a loro volta legano effettori come Pit caratterizzate da NBS/LRR al fine di innescare i meccanismi di difesa. OsRAC1 agisce formando un complesso citosolico con altre proteine quali RAR1-SGT1-HSP90-HSP70, (Nakashima et al., 2008) per attivare la cascata delle MAPK e generare la produzione di ROS, di fitoalessine ed espressione di geni PR (Kawasaki et al., 1999) (FIG.18).

1.10.1 Trasduzione del segnale mediato dalle MAPK

Le MAPK sono un'importante famiglia di trasduttori del segnale intracellulari che permettono il raggiungimento del nucleo da parte della via di segnalazione iniziata a livello della membrana citoplasmatica o dal citoplasma (Zhang and Klessig, 2001). Una cascata di fosforilazione ne comprende minimo tre ed è noto che prendono parte sia a risposte di difesa ma anche ad altri eventi cellulari che richiedono una trasduzione del segnale (FIG.18).

In riso sono state individuate 17 MAPK, ma solo di alcune se ne conosce a fondo la funzione e le caratteristiche.

MAPK5 è una chinasi coinvolta nei meccanismi di risposta a stress di natura abiotica; infatti agisce come regolatore negativo nelle risposte di difesa contro *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (XOO) e negli stress biotici in generale (Xiong and Yang, 2003; Seo et al., 2011).

MAPK6 è una chinasi che fa parte del complesso RAC1 mediato dal sensore Pit e trasmette una segnalazione che porta alla produzione di diterpenoidi contro *M. grisea*. Inoltre questa MAPK è coinvolta sia nella PTI che nell'ETI (Kishi-Kaboshi et al., 2010).

1.10.2 Fattori di trascrizione coinvolti nella trasduzione del segnale in riso

Una volta che la trasduzione del segnale ha raggiunto il nucleo, si attivano degli specifici fattori di trascrizione che permettono l'espressione dei geni associati alle risposte di difesa (FIG.19).

Tra di essi è compresa la superfamiglia di fattori di trascrizione WRKY di cui sono stati individuati circa 100 geni nel genoma di riso e TGA che favoriscono l'espressione dei geni Pathogenesis Related (PR) che codificano per proteine che contrastano l'avanzata del patogeno o la condizione di stress.

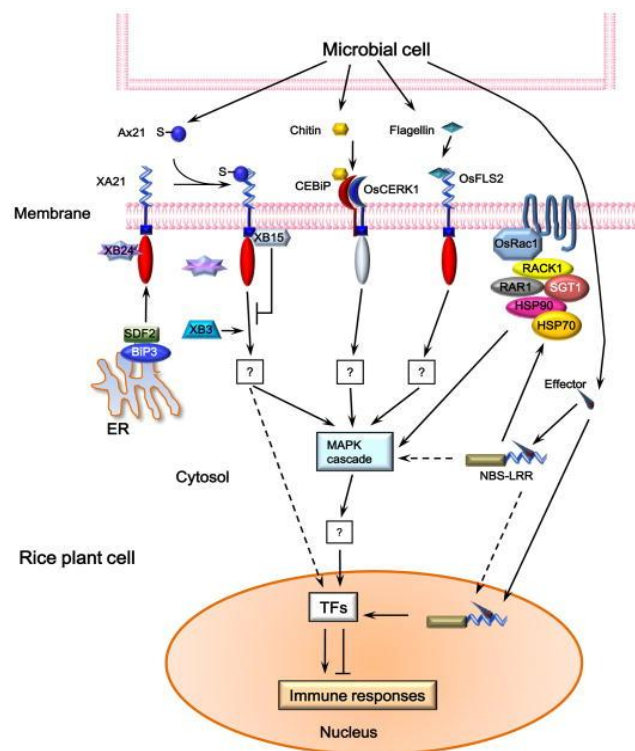


FIG.19. PATHWAY DI SEGNALE DELL'IMMUNITÀ INNATA DEL RISO (Adattato da Chen and Roland 2011). Le molecole derivanti dal patogeno sono riconosciute dall'ospite: il peptide solfato Ax21 è riconosciuto e legato dal recettore Xa21 che attiva la segnalazione delle MAPK mediante l'azione di XB3 ed in parallelo è regolato negativamente in maniera tempo e dose dipendente da XB15. In assenza del suo ligando è in forma inattiva associato all'inibitore XB24. La proteina di membrana CEBIP riconosce e lega la chitina, costituente della parete fungina e si dimerizza con CERK1 avente dominio chitinasico di cui CEBIP è privo. Il passo successivo si attiva la cascata di MAPK che raggiunge il nucleo. Il recettore della flagellina, costituente del flagello batterico, OsFLS2 lega il suo ligando attivando la cascata di segnalazione della MAPK. Il sensore intracellulare OsRAC1 mediante il suo complesso proteico citoplasmatico riconosce e lega l'effettore con il suo dominio NBS-LRR attivando le MAPK. Il risultato finale è che la cascata di fosforilazione in ogni caso raggiunge il nucleo attivando dei fattori di trascrizione (es. WRKY) già presenti o inducendo la loro espressione insieme a quella dei geni di difesa.

1.11 Il priming

Oltre alle barriere chimiche e fisiche ed i meccanismi di difesa già descritti, le piante possono trovarsi in una condizione fisiologica chiamata stato di priming. È un fenomeno che rende le cellule primed più reattive nella risposta agli stress, rispetto a quelle non-primed (Conrath, 2011). Questa condizione segue a una percezione degli induttori di stress come PAMP, MAMP, effettori, microbi benefici, composti sintetici e ferita, in basse concentrazioni. Le piante primed mostrano delle risposte agli stress molto più efficaci, intense e rapide rispetto alle piante non-primed (Conrath, 2011).

Questo fenomeno è conosciuto da decenni, ma all'inizio (1933) venne chiamato “sensitization” e da subito fu compresa la sua importanza nell'ambito dell'immunità vegetale. È solo con il passare del tempo e con l'evoluzione di metodi di analisi sempre più raffinati che è stato possibile mettere in luce, almeno in parte, lo sviluppo e lo svolgimento di questo meccanismo coinvolto nella SAR, ISR, BABA-IR, resistenza a ferita.

Una prima ipotesi avanzata per spiegare questo fenomeno è che nelle cellule primed avvenga un accumulo in forma inattiva di proteine coinvolte nella cascata di segnalazione, le quali vengono attivate in presenza di uno stress; si ha così una rapida amplificazione del segnale favorendo una difesa più efficace (Conrath et al, 2006) (FIG.20).

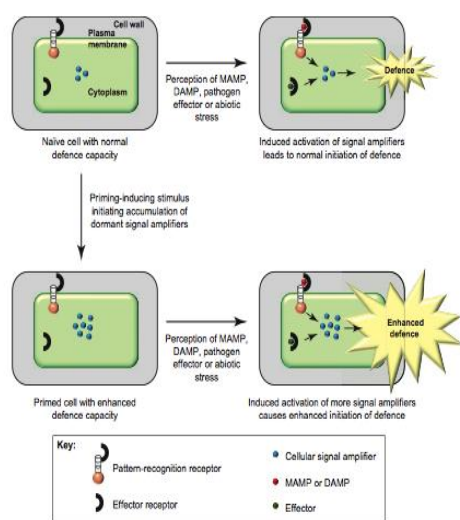


FIG.20. RAPPRESENTAZIONE DEL MECCANISMO DEL PRIMING. (Adattato da Conrath, 2011). In una cellula non-primed sono presenti nel suo citoplasma, in una condizione di assenza di stress, un numero limitato di amplificatori del segnale (punti blu). Nel momento in cui i suoi recettori riconoscono e legano il loro ligando si ha l'attivazione delle molecole amplificatrici del segnale e lo sviluppo di un meccanismo di difesa. Nelle cellule primed invece è presente già di partenza un numero maggiore degli amplificatori del segnale nel citoplasma cosicché si ha, dopo il riconoscimento di molecole dello stress, un'attivazione incrementata della difesa.

Nel corso degli anni sono stati analizzati numerosi esempi di piante rese primed mediante vari trattamenti che conferivano ad esse una difesa più intensa a stress successivi. Un primo esempio è quello eseguito da Thulke e Conrath nel 1998 che hanno indotto uno stato di priming in sospensioni cellulari di prezzemolo usando SA al fine di avere una maggiore espressione del gene *Phenylalanine Ammonia Lyase* (fenilalanina ammonia liasi, PAL), deputato alla biosintesi dei fenilpropanoidi e quindi coinvolto nella difesa. In questo esperimento, dopo aver trattato la sospensione cellulare con varie concentrazioni di SA, è stata eseguita un'infezione con un elicitore fungino derivato dalla parete cellulare di *Phytophthora sojae*. L'analisi dell'espressione genica di PAL ha evidenziato una maggiore espressione nelle cellule che avevano subito un pretrattamento con 500 μM di SA rispetto a quelle trattate con concentrazioni inferiori o a quelle non pretrattate (FIG.21. A).

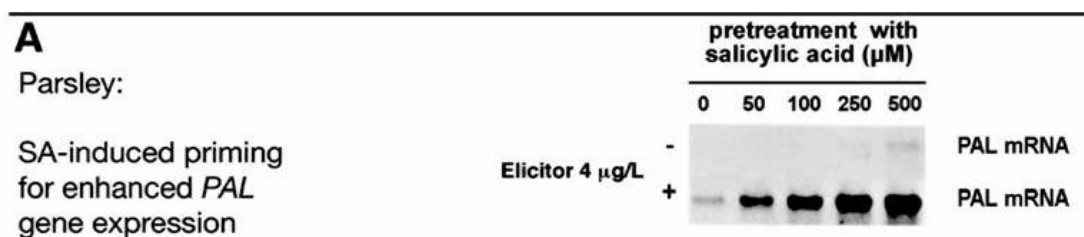


FIG.21.A.INDUZIONE DEL PRIMING USANDO SA (Adattato da Conrath et al, 2006). Sospensioni cellulare di prezzemolo pretrattate a diverse concentrazioni di SA mostrano un' incrementata espressione del gene PAL in seguito a trattamento con elicitore fungino (-, campioni non trattati con l'elicitore; +, campioni che sono stati pre-trattati con l'elicitore avente concentrazione 4 $\mu\text{g/L}$).

Gli stessi risultati sono stati ottenuti usando al posto del SA come induttore del priming, alcuni suoi analoghi come 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) and benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid (BTH).

Piante di *Arabidopsis* rese primed mediante trattamento con *Pseudomonas fluorescens* mostrano una maggiore espressione del gene della lipo-ossigenasi 2 (LOX2), noto per essere coinvolto nelle risposte allo stress. Anche dei pretrattamenti con BABA rendono piante di *Arabidopsis* primed e più capaci ad esprimere PR1 in seguito ad inoculo fungino (Jakab et al., 2005) anche se il meccanismo molecolare dell'acido β -amino-butyrico (BABA) non è stato ancora chiarito.

Il priming può essere indotto anche in seguito a percezione di LPS (Newman et al., 2002; Erbs and Newman, 2003) e lipooligosaccaridi (LOS): il pretrattamento di foglie di *Arabidopsis* con LOS purificati da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* le rende più resistenti ad infezioni di

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000 (Newman et al., 2002). Tuttavia anche in questo caso non si conosce il meccanismo molecolare.

Inoltre è anche noto che le miscele volatili (Volatile Organic Compound, VOC) che rilasciano le piante in seguito di attacco di insetti possono indurre priming oltre che nelle stesse piante (Heil and Ton, 2008), anche in quelle limitrofe, pure di differenti specie (Paschold et al., 2006). Questa tesi è stata anche confermata da Kessler e colleghi nel 2006, i quali hanno verificato che le sostanze volatili rilasciate da *Artemisia tridentata* inducono il priming nelle vicine piante di tabacco provocando in esse un accumulo di metaboliti secondari e proteinasi. Anche in questo caso, si conosce molto poco il meccanismo molecolare alla base di questo evento.

Non tutte le molecole volatili sono in grado di indurre il priming, ma solo quelle che rispondono ai seguenti criteri (Heil and Ton, 2008):

- inducono una risposta di difesa;

- sono prodotte e secrete dal sito di attacco;

- sono trasferite dal sito di attacco a livello sistemico;

- si accumulano a livello sistemico prima dello stress.

Questo tipo di segnalazione aerea si accoppia con quella vascolare al fine di assicurare la diffusione del segnale in tutta la pianta poiché, mentre quella vascolare necessita dei vasi per essere trasportata e potrebbe non arrivare in tutte le zone della pianta, quella aerea raggiunge molto più in fretta tutta la pianta (FIG. 22).

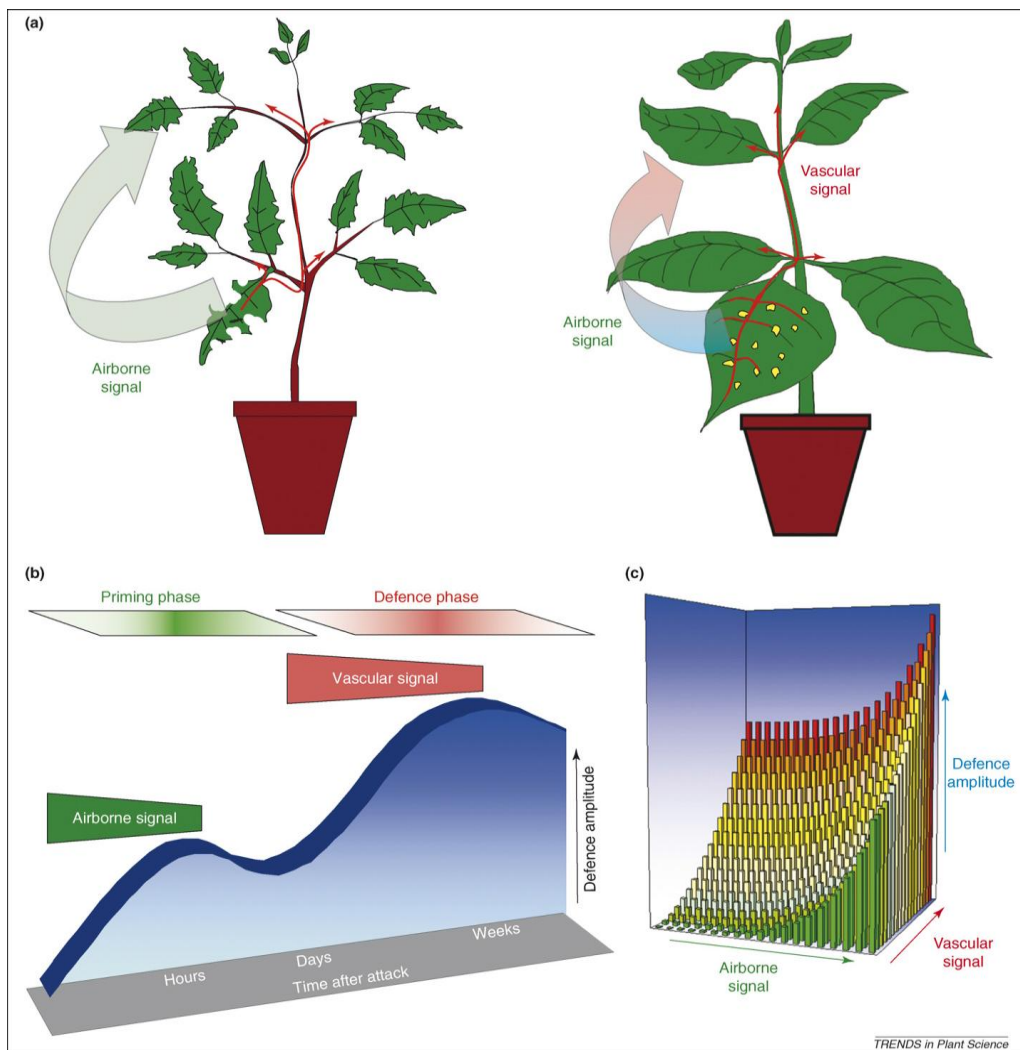


FIG.22. SCHEMA DELLA SEGNALAZIONE AEREA. (Adattato da Heil and Ton, 2008). a. Dopo aver subito uno stress le piante emettono delle sostanze volatili che raggiungono le parti più distali prima del segnale vascolare rendendo la pianta più protetta e pronta a rispondere agli stress. b. La segnalazione aerea induce in tempi precoci il priming nella pianta inducendo una bassa espressione dei geni della difesa. Dopo alcuni giorni il segnale vascolare induce la fase di difesa che risulta notevolmente incrementata per la presenza del priming. c. l'intensità del segnale aereo (verde) è inversamente proporzionale all'intensità della difesa: se la segnalazione aerea avviene a concentrazioni molto basse, si avrà l'induzione del priming ed una maggiore intensità della risposta di difesa nella pianta, supportata dalla segnalazione vascolare. Ad alte concentrazioni della segnalazione aerea, si ha lo sviluppo di una forte difesa, ma senza il priming.

Anche se nel corso del tempo si sono chiariti molti aspetti del fenomeno del priming, tanto altro ancora rimane da chiarire, in particolar modo nell'ambito molecolare. Un punto importante in questa condizione fisiologica è la segnalazione che permette di avere cellule primed più reattive e pronte alla difesa rispetto a quelle non-primed (Conrath et al., 2006). Quindi l'attenzione dei ricercatori si è incentrata sulle molecole deputate alla segnalazione e all'amplificazione del segnale. Molti studi sono stati eseguiti sull'attività delle MAPK, le quali mediano la segnalazione attraverso una cascata

di fosforilazione del segnale che raggiunge il nucleo al fine di modificare l'espressione genica nella maniera più opportuna. Esse sono presenti in tutti gli eucarioti e la loro cascata è costituita da tre chinasi in successione, la prima Mitogen Associated Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) attiva la seconda Mitogen Associated Kinase Kinase (MAPKK) che attiva l'ultima Mitogen Associated Kinase (MAPK), la quale agisce a livello del nucleare.

Studi eseguiti da Beckers e colleghi nel 2009 hanno messo in luce in modo univoco il ruolo delle MAPK in *Arabidopsis*, chiamate MPK, in cui nel corso degli anni sono state individuate 20 MPK, 10 MPKK e circa 80 MPKKK (Colcombet and Hirt, 2008). In particolar modo si sono focalizzati su due MPK3 e MPK6, note per essere coinvolte nei meccanismi di difesa. Per verificare il loro coinvolgimento nel priming, piante di *Arabidopsis* trattate con basse concentrazioni di SA, BTH e 4-Cl-SA sono state infettate con un ceppo virulento di *Pseudomonas*. In tutti questi casi si è manifestato un'incremento dell'espressione genica di MPK3. Da tutto ciò si evince che MPK3 è coinvolta nel meccanismo del priming. Per chiarire ulteriormente il suo ruolo e quello di MPK6, Beckers e colleghi hanno studiato anche la cinetica di accumulo in seguito ad un pretrattamento con 100 μ M di BTH. Entrambi i geni mostrano un picco di espressione a 48h che è molto più intenso per MPK 3 ed inoltre mostra un andamento bifasico (Beckers *et al.*, 2009). Quindi è possibile affermare che entrambi sono coinvolti nel meccanismo del priming.

Se il pretrattamento con BTH viene seguito da un inoculo fungino o infiltrazione con H_2O , si ha a 72h un accumulo di entrambe le proteine MPK3 e 6, anche se MPK3 è presente maggiormente (Beckers *et al.*, 2008).

E' stata fatta chiarezza sull'importanza del ruolo di queste molecole mediante l'utilizzo di mutanti $\Delta mpk3$ e $\Delta mpk6$ che mostrano esprimere comunque i geni di difesa anche se in maniera leggermente attenuata. Quindi è chiaro che MPK3 e 6 non sono fondamentali per l'insorgenza del priming, ma entrambe partecipano a questo meccanismo con ruoli diversi e quello più importante è svolto da MPK3 (Beckers *et al.*, 2008).

1.11.1 Eredita' del priming

Un altro aspetto molto interessante del priming è che può essere trasmesso alla progenie (Slaughter *et al.*, 2012). La progenie di piante di *Arabidopsis* pretrattat con BABA o con un ceppo avirulento di *Pseudomonas*, mostrano avere una maggiore resistenza ai patogeni virulenti inoculati: riescono ad esprimere in modo più rapido ed intenso i geni della difesa come PR1 rispetto alle piante non-primed (Slaughter *et al.*, 2012).

Gli effetti di questa eredità sono visibili ad occhio nudo inoculando la progenie con l'oomicete biotrofo *H. arabidopsidis*. Dopo 7 giorni tali piante che avevano ricevuto il trattamento e derivanti da quelle trattate avevano delle lesioni molto minori rispetto alle piante non trattate e derivate da quelle non trattate. Piante derivate da piante trattate a cui non è stato rinnovato il trattamento, perdono completamente la condizione di priming (Slaughter et al., 2012). Quindi tale meccanismo deve essere rinnovato ad ogni progenie, altrimenti tende a decadere.

1.11.2 Priming nei semi

È possibile indurre il priming nei semi prima della loro germinazione facendoli imbibire con delle opportune soluzioni, mimando uno stress abiotico per disidratarli nuovamente (Chen and Arora, 2012). In questa situazione i semi primed sono molto più avvantaggiati nello sviluppo e nella resistenza agli stress rispetto ai semi non-primed. Tutto ciò è possibile perchè vengono espresse maggiormente ed anticipatamente i geni che favoriscono la germinazione e lo sviluppo ed è stato dimostrato in varie specie una produzione più intensa di ATP. Nel corso degli anni si sono evolute due strategie del priming dei semi:

1. germinazione “head-start”, in cui avviene una prima fase di uptake nella quale solo una parte delle funzioni cellulari sono attive seguita da una seconda fase in cui si attiva l'effetto del priming dove si ha l'espressione di geni di difesa e del metabolismo che permetteranno una germinazione molto veloce;
2. cross-tolleranza, in cui la prima imbibizione risveglia dei meccanismi di difesa senza attivarli al fine di creare una memoria dello stress (fase I e II) che reagisce repentinamente nel caso di incontro dello stress vero e proprio.

Indipendentemente dalle strategie, nella fase III si ha la germinazione che si manifesta con la protrusione della radichetta (FIG.23).

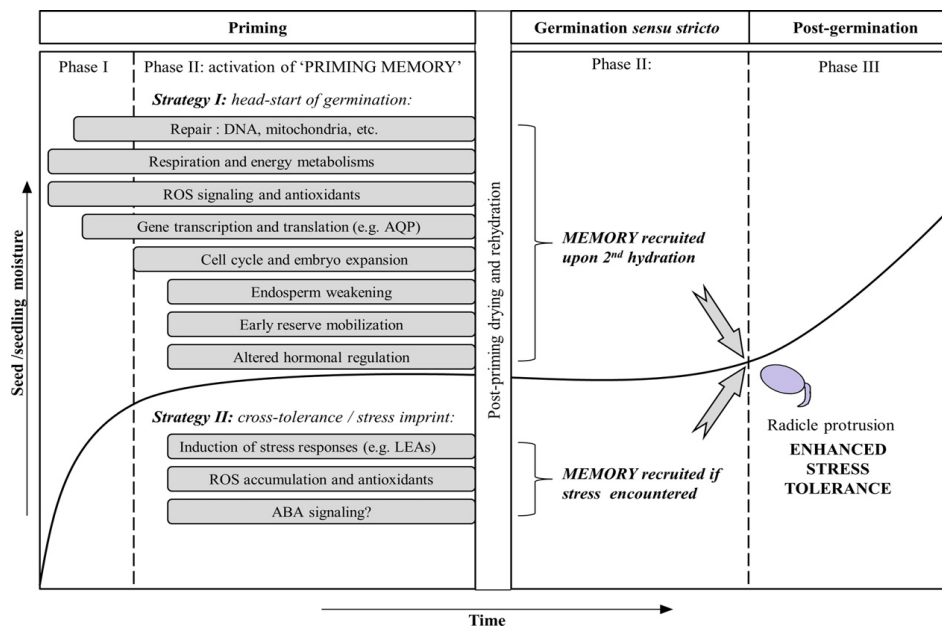


FIG.23. MODELLO DI INSTAURAZIONE DELLA MEMORIA DEL PRIMING (Adattato da Nonogaki et al., 2007).

Per fare avvenire con successo il priming nei semi (soprattutto per i cereali) bisogna avere delle accortezze al fine di ottimizzare le condizioni. I parametri più importanti da controllare sono: l'areazione è molto importante perchè accelera il rinnovo cellulare; la disponibilità di luce, poiché regola l'espressione di alcuni geni-luce dipendenti; il tempo della durata del trattamento; la temperatura, che deve favorire la germinazione; il metodo utilizzato non deve essere in alcun modo tossico o nocivo e non deve alterare il potenziale osmotico (Sivasubramaniam et al., 2011).

1.12 Tecniche per indurre il priming nei semi

Le tecniche fino ad oggi utilizzate per indurre il priming nei semi sono le seguenti (Sivasubramaniam et al., 2011):

1. osmopriming, tecnica standard del priming sui semi che consiste nell'immergere e fare imbibire i semi in una soluzione areata con basso potenziale osmotico per un periodo di tempo limitato, per poi sciacquare i semi e farli asciugare. In questo metodo per tenere basso il potenziale osmotico della soluzione, viene usato mannitolo o PEG, ma entrambi possono influire negativamente sulla germinazione;
2. halo priming, che prevede l'utilizzo di sali quali cloruri, solfati, nitrati, ma può causare tossicità nonché inibizione della germinazione dei semi in riso (Basra et al., 2005);

3. idropriming, che prevede l'immersione dei semi in acqua calda o vaporizzata per un tempo limitato. Questo metodo può favorire l'insorgenza di patogeni (Wang et al., 2005);
4. matrix priming, che prevede l'incubazione dei semi in una matrice solida con quantità limitata di acqua dando un'imbibizione lenta;
5. biopriming, combinazione tra l'idratazione e l'inoculo di batteri benefici al fine di proteggere i semi.

L'effetto del priming sulla germinabilità è riportato in figura (FIG.24).

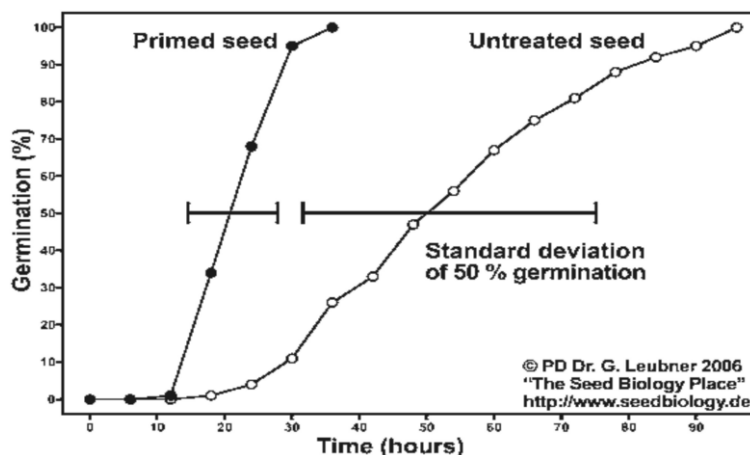


FIG.24. TASSO DI GERMINABILITA' IN SEMI PRIMED (Adattato da Sivasubramaniam et al., 2011).

In *Oryza sativa*, sono stati adottati vari metodi per incrementare la germinabilità e migliorare la qualità dei semi come l'utilizzo di KNO_3 , Na_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (Geetha, 1992), KCl e CaCl_2 (Nagaraj, 1996) nella tecnica dell'halopriming; oppure l'utilizzo di PEG, Mannitol, KNO_3 , KCl , K_3PO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 and NaCl nella tecnica del matrix priming (Farooq et al., 2005). Tutte queste tecniche vengono utilizzate per incrementare la produzione ed hanno lo scopo di far fronte alle grandi perdite che si hanno ogni anno nei Paesi asiatici e africani in cui i cereali ed in particolar modo il riso, costituiscono la base dell'alimentazione per la maggior parte della popolazione. Lo sviluppo di nuove tecniche in questo campo permetterebbe quindi di salvare molte vite umane.

1.13 Studi di proteomica in riso

In questi ultimi anni la proteomica si è affermata come ulteriore strumento nelle indagini molecolari per monitorare i cambiamenti globali della sintesi delle proteine in risposta alle diverse condizioni in cui vengono a trovarsi gli organismi (Komatsu and Tanaka, 2004). L'analisi del cambiamento della sintesi proteica permette di comprendere a fondo anche la funzione dei geni ad essa correlati (Komatsu and Tanaka, 2004), quindi è possibile considerare la proteomica e la genomica come due facce della stessa medaglia. Gli scienziati hanno inizialmente focalizzato la loro attenzione sulle proteine presenti nei vari tessuti della pianta del riso (Komatsu et al., 1993; Zhong et al., 1997; Komatsu et al., 1999) e nei suoi organelli (Mikami et al., 2001; Heazlewood et al., 2003). Da tutto ciò è nato un database accessibile on line e che ancora oggi viene aggiornato <http://gene64.dna.affrc.go.jp/RPD> (Komatsu and Tanaka, 2004).

Tra i vari studi che hanno contribuito alla formazione del database, sono degni di nota quelli che si sono occupati dello studio delle proteine coinvolte nei meccanismi di difesa del riso, trattando delle sospensioni cellulari con funghi o elicitori fungini (Kim et al., 2003; Kim et al., 2009). Questi lavori hanno evidenziato ed identificato le proteine maggiormente sintetizzate dalle cellule trattate rispetto a quelle di controllo oppure espresse *ex novo*. Ciò significa che le cellule hanno una prima interazione con il patogeno o gli elicitori che porta ad una risposta nell'espressione genica e quindi nella sintesi delle proteine di difesa per far fronte allo stress (Kim et al., 2009). Un aspetto molto interessante è che la risposta delle cellule ad interazioni incompatibili sono molto più intense e rapide rispetto a quelle compatibili (Kim et al., 2009), poiché il riconoscimento fra il gene di avirulenza del patogeno e quello di resistenza della pianta provoca una secrezione di proteine molto rapida ed intensa (Kim et al., 2009).

Un risultato analogo è stato ottenuto da Kim e colleghi nel 2003 trattando le sospensioni cellulari anche con dei fitormoni, ottenendo la sintesi di proteine coinvolte nella difesa.

Uno studio sulla *Zantedeschia aethiopica* condotta da Luzzatto-Knaan e colleghi (2014) ha analizzato mediante un approccio proteomico, l'induzione del priming utilizzando un trattamento a basse concentrazione di Me-JA e successivo stress indotto dal patogeno fungino *Pectobacterium carotovorum*. Questo studio ha fatto emergere che il pretrattamento induce il priming in *Z. aethiopica* portando ad una maggiore sintesi di proteine coinvolte nella difesa rispetto al singolo stress con il fungo. In particolar modo gli autori si sono focalizzati su due enzimi, la perossidasi e la poli-fenol ossidasi, entrambi coinvolti nello stress ed entrambi molto più sintetizzate nella condizione di priming, assicurando una risposta di difesa più rapida ed efficace (FIG.25).

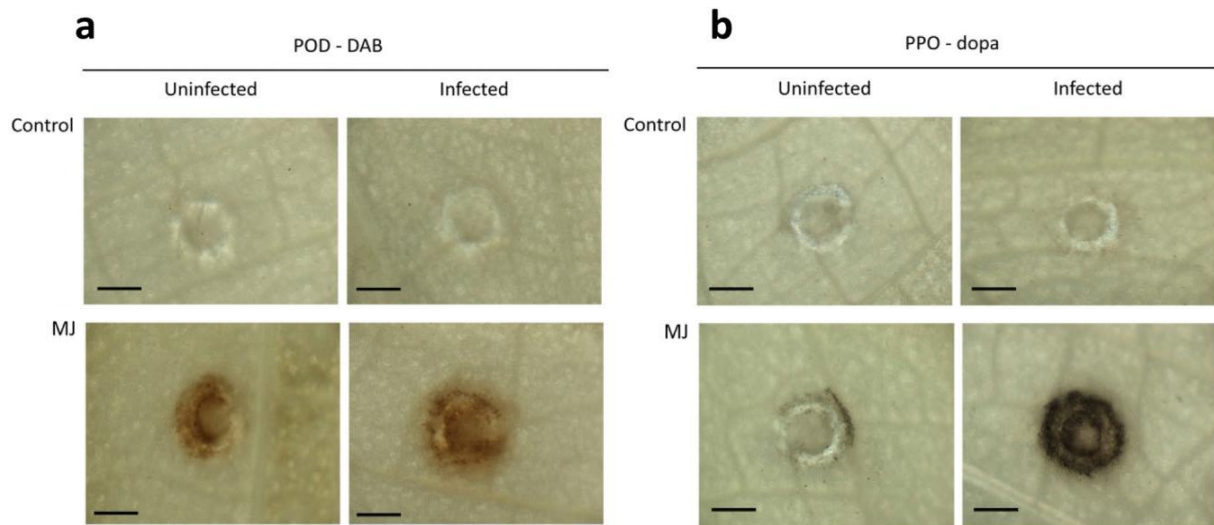


FIG.25. Visualizzazione con microscopio ottico delle attività della perossidasi (POX) e polifenol ossidasi (PPO) in *Zanteschia aethiopica* trattata con attivatori vegetali. Control: trattamento con acqua distillata; MJ: trattamento con 10 mg/ml Me-JA. Dischi inoculati con *Pectobacterium carotovorum* 24 hpt. L'attività enzimatica è stata analizzata 24 hpt dop l'incubazione con diaminobenzidina (DAB) per la rilevazione dell'attività di POD (a), e dopa per l'attività della PPO (b). Le attività sono visualizzate mediante l'accumulo di prodotti marrone/nero nei siti di infezione. Bar: 500 μ m.

1.14 L'epigenetica del riso

Come già anticipato, le modifiche istoniche in correlazione alla metilazione del DNA creano un codice che permette la corretta espressione genica (Li et al., 2008). In uno studio del 2008 Li e colleghi hanno analizzato con tiling array due cromosomi di *Oryza sativa* con lo scopo di individuare le regioni contenenti la metilazione del DNA e le modifiche istoniche correlate con l'espressione genica: la di- e trimetilazione della Lys 4 dell'istone H3, rispettivamente H3K4me2 e H3K4me3. Lo scopo di questo studio era proprio cercare di capire i patterns di distribuzione di questi caratteri epigenetici e come interagivano tra loro. Al fine di avere risultati più completi i ricercatori hanno analizzato sia piante giovani che colture cellulari.

In figura 23 è possibile osservare la distribuzione di eucromatina ed eterocromatina nei due cromosomi analizzati il 4 e il 10: in entrambi l'estremità del braccio corto e gran parte del braccio lungo sono caratterizzati dalla presenza di eucromatina, mentre le regioni centromeriche e quelle prossimali ad esse mostrano avere la presenza di eterocromatina. Inoltre è possibile osservare che la percentuale la H3K4me3 aumenta passando dal braccio corto a quello lungo in entrambi i casi, mentre la metilazione del DNA diminuisce leggermente. La H3K4me2 non sembra variare in

maniera considerevole tra le varie zone. Da tutto ciò emerge che la maggior parte dell'eucromatina è presente nel braccio lungo di entrambi i cromosomi dove sono presenti i geni trascrizionalmente attivi e quindi è logico che aumenti la percentuale di H3K4me3. La cosa interessante però è che la metilazione non scende drasticamente, quindi significa che in questo caso non vale il principio che la presenza della metilazione del DNA è sinonimo di repressione genica (FIG.26).

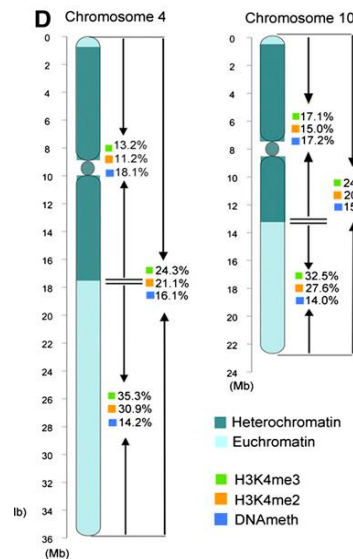


FIG.26. ORGANIZZAZIONE DEI CROMOSOMI 4 E 10 DI *ORYZA SATIVA*

Inoltre gli autori hanno messo in relazione le due modifiche istoniche con le metilazione del DNA e l'espressione genica in entrambi i cromosomi. Nel cromosoma 4 è possibile osservare una maggiore espressione soprattutto nei geni posizionati nel braccio lungo in cui sono presenti maggiormente le metilazioni istoniche, ma anche la metilazione del DNA in minor presenza. Viceversa i trasposoni (Transposable Elements, TE) sono presenti soprattutto nel braccio corto dove è minore la presenza delle due modifiche istoniche ma è maggiore la metilazione del DNA, caratteristica insita dei trasposoni (FIG.27).

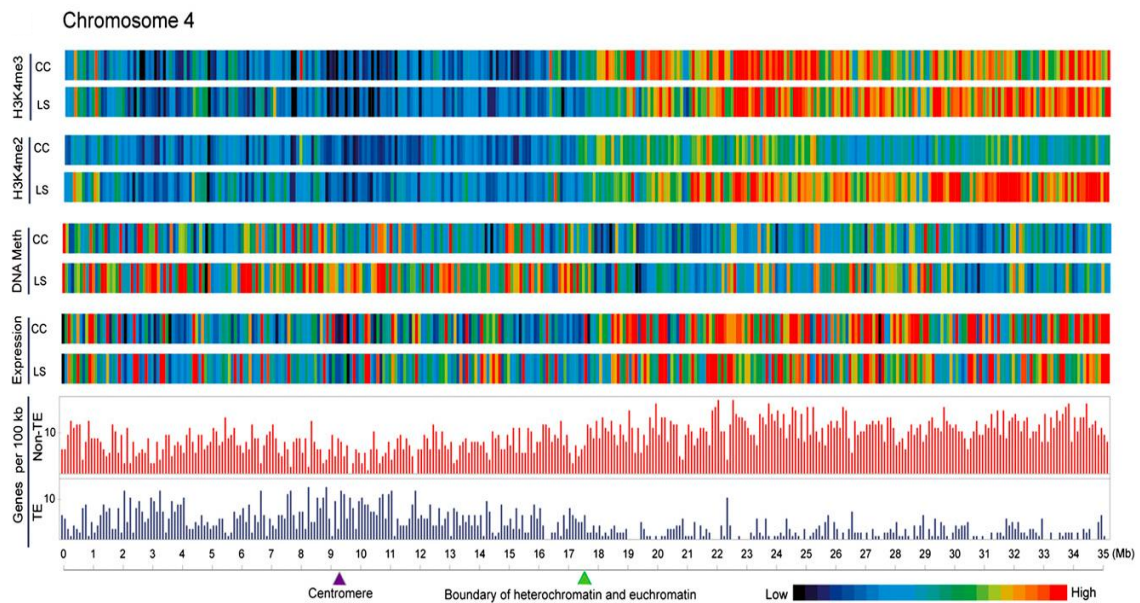


FIGURA 27. Pattern di distribuzione della metilazione sul cromosoma 4 di *Oryza sativa*. CC = colture cellulari; LS = piantine; TE = trasposoni; Non-TE = geni espressi

E' possibile fare un discorso analogo per quanto riguarda il cromosoma 10. Anche in questo caso è possibile notare che è presente un maggiore livello di espressione genica nel braccio lungo in cui si individua un'elevata presenza delle modifiche istoniche. Tuttavia è presente anche la metilazione del DNA. E quindi è possibile concludere che la metilazione del DNA può essere concomitante con le modifiche istoniche associabili alla trascrizione. Ovviamente essa è in maggior parte presente nel braccio corto dove si concentrano gli elementi trasponibili (FIG.28).

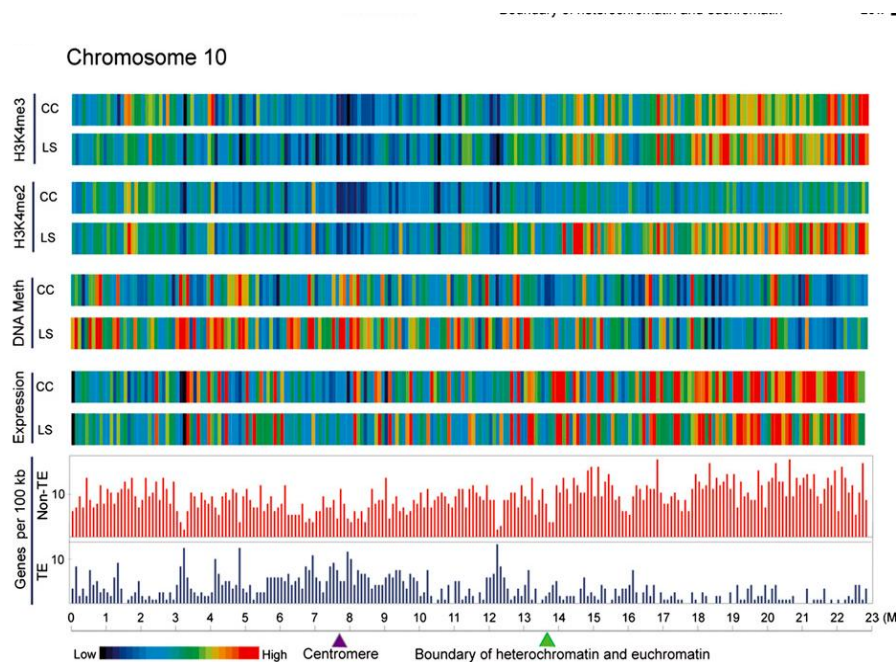


FIG.28. PATTERN DI DISTRIBUZIONE DELLA METILAZIONE SUL CROMOSOMA 10.

Analisi più approfondite di Li e colleghi su un pool di geni che coprivano quasi la totalità di entrambi i cromosomi hanno fatto emergere tre possibili casi in cui la metilazione può essere presente: solo sul promotore, solo nel corpo del gene o in entrambi. Queste combinazioni possono dare vari effetti nell'espressione (FIG.29). Come è possibile osservare in figura, la copresenza di H3K4me3 e metilazione del DNA danno un'espressione meno intensa della trimetilazione da sola, ma risulta un'espressione maggiore rispetto alla condizione di assenza di ogni modifica. Stessa condizione è visibile per la H3K4me2 che in presenza della metilazione del DNA induce un'espressione minore della modifica istonica da sola. Ovviamente H3K4me3 induce una maggiore espressione di H3K4me2.

Da qui è possibile dedurre che la metilazione del DNA e le modifiche istoniche possono cooperare insieme al fine di modulare l'espressione genica.

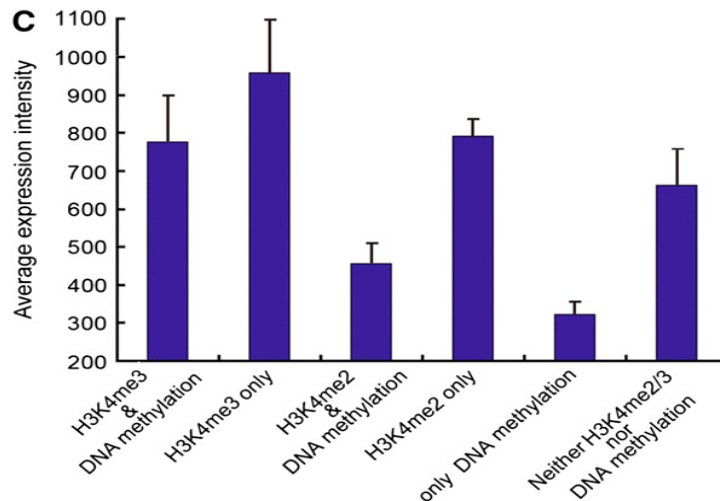


FIG.29. EFFETTI DELLA METILAZIONE SULL'ESPRESSIONE GENICA.

(ADATTATO DA LI ET AL., 2008)

Un'ipotesi che è stata avanzata è che la presenza della metilazione del DNA in corrispondenza del sito di START della trascrizione e nel corpo del gene causa il silenziamento genico. Se vi è invece la presenza di H3K4me2 il gene può essere inducibile; la presenza sia della dimetilazione che della trimetilazione rende il gene moderatamente espresso. Con uno stato di maggiore presenza della trimetilazione, si ha una massiccia espressione del gene (FIG.30).

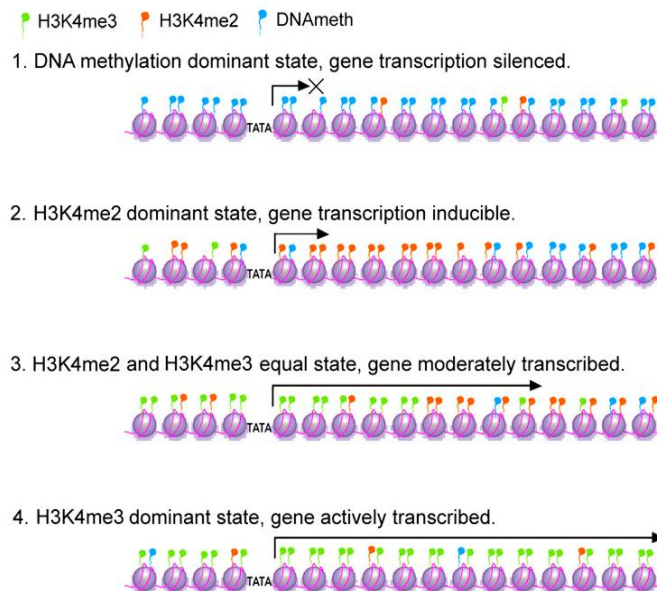


FIG.30. COMBINAZIONE DELLE METILAZIONI.

Analisi condotte da Li e colleghi per individuare il posizionamento delle modifiche hanno fatto emergere la presenza di un picco delle tre modifiche (metilazione del Dna, H3K4me2, H3K4me3) in corrispondenza del sito di start di trascrizione (FIG. 31). In realtà guardando con attenzione l'andamento dei tre picchi è possibile notare che il picco relativo alle metilazioni istoniche è leggermente anticipato rispetto al sito di start della trascrizione, mentre il picco relativo alla metilazione del DNA è leggermente posticipato.

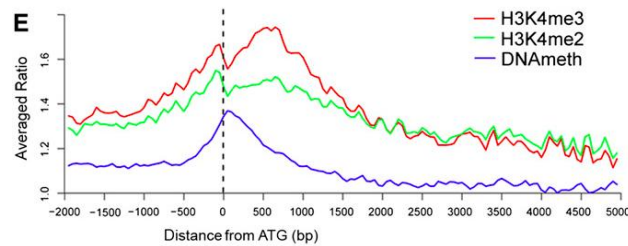


FIG.31. ANDAMENTO DELLE METILAZIONI.

Zong e colleghi (2013) hanno evidenziato che la H3K4me3 è molto presente nei geni responsivi allo stress che vengono notevolmente espressi in condizioni di difesa, tuttavia questa modifica induce un'elevata espressione in geni che costitutivamente sono poco espressi, come nel caso della difesa, mentre inibisce l'espressione in quelli che costitutivamente sono espressi molto (Zong et al., 2013).

Li e colleghi nel 2012 hanno ottenuto una mappa del metiloma del DNA di *Oryza sativa* con una risoluzione di una singola base. Hanno analizzato varie sottospecie tra cui quella japónica in cui hanno individuato 35,598,491 metilcitosine totali, di cui 14,989,765 con metilazione sul dinucleotide CG, 11,370,419 con metilazione su CHH e 9,238,307 con metilazione su CHG (FIG. 32).

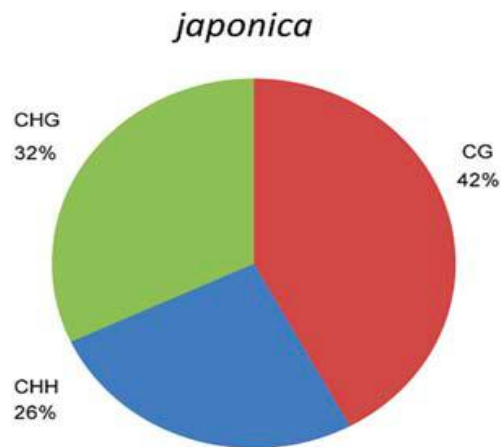


FIG.32. DISTRIBUZIONE DA METILAZIONE DEL DNA IN *ORYZA SATIVA* SSP. *JAPONICA*.

Successivamente hanno anche analizzato l'andamento della metilazione del DNA su tutti i cromosomi in cui appare chiaro che è predominante la metilazione a carico del dinucleotide CG (FIG.33).

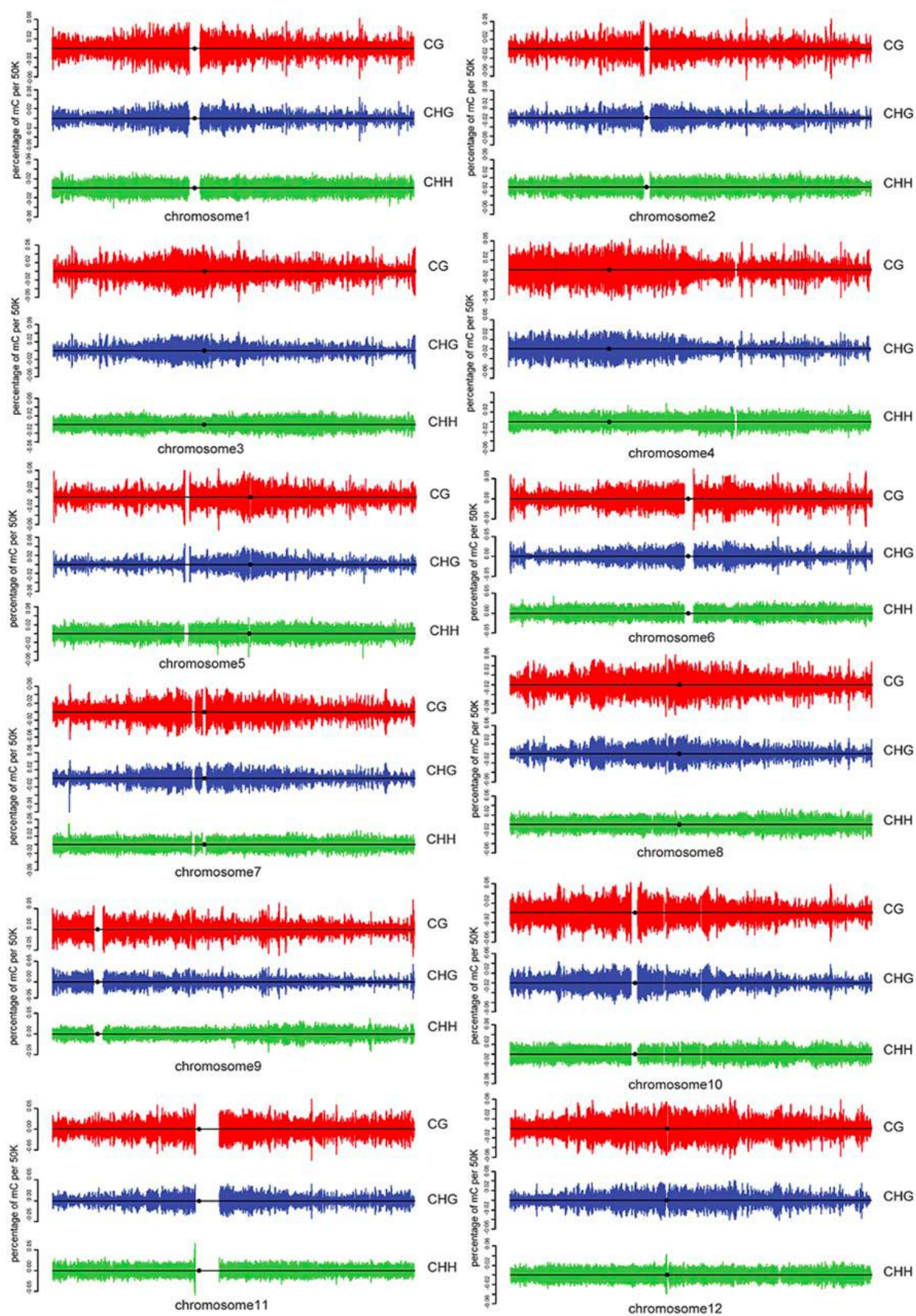


FIG.33. METILAZIONE SUI CROMOSOMI DI ORYZA SATIVA.

Da tutto ciò emerge che il riso ha dei livelli di metilazione molto elevati, perfino maggiori di quelli trovati in *Arabidopsis*, anche perchè mostra avere delle regioni di eterocromatina metilata molto più vaste di quest'ultima (Li et al., 2012). Probabilmente queste differenze sono imputabili al fatto che piante differenti si sono dovute adattare a diversi habitat (Li et al., 2012).

La presenza della metilazione del DNA nei promotori sembra reprimere l'espressione genica, mentre nel corpo del gene sembra avere l'effetto opposto, cioè favorire la trascrizione. Tuttavia resta ancora da capire a fondo questa relazione (Li et al., 2012).

Inoltre Tsuji e colleghi nel 2006 hanno effettuato uno studio su radici di riso in cui veniva messa in relazione la presenza della trimetilazione, dimetilazione ed acetilazione in risposta ad uno stress. Più precisamente le radici di coleptili di riso venivano tenute in condizione di assenza di ossigeno mediante immersione per 24 h. Successivamente venivano riposte in condizioni normali per altre 24h. Gli autori hanno studiato l'espressione di due geni: alcol deidrogenasi (ADH) ed una piruvato decarbossilasi (PDC1), geni scelti perchè la loro espressione si attiva o si inibisce in risposta alla presenza di ossigeno. Analisi di REAL TIME hanno evidenziato per entrambi un andamento bifasico: l'espressione diminuisce al termine delle prime 24h, quando i coleptili vengono posti in condizioni normali. Analisi condotte dagli stessi autori con la tecnica dell'immuno precipitazione della cromatina (Chromatin Immuno Precipitation, ChIP) associata alla REAL TIME hanno messo in evidenza come viene modulata nel tempo la presenza di modifiche istoniche quali l'acetilazione della Lys 4 dell'istone H3 e la di- e tri- metilazione della stessa lisina. La di- e tri-metilazione hanno un andamento opposto: prima dello stress, la dimetilazione è prevalente ma, dal momento in cui i coleptili sono immersi, si ha una maggiore presenza della tri-metilazione con conseguente aumento dell'espressione genica. Questo significa che le medesime lisine che si trovano in una condizione di dimetilazione in assenza di stress, sono successivamente trimetilate. Curiosamente gli autori hanno evidenziato un andamento anche per quanto riguarda l'acetilazione dell'istone H3: essa infatti raggiunge il suo picco in un tempo successivo di quello della trimetilazione. Ciò fa ipotizzare che la presenza della trimetilazione favorisce fortemente l'espressione dei geni presi in esame e che tale espressione risulta incrementata in un tempo successivo dalla presenza dell'acetilazione.

Ovviamente quando i coleptili vengono posti in condizioni ottimali l'espressione cessa, la trimetilazione diminuisce, lasciando il posto alla dimetilazione, e l'acetilazione decresce fortemente.

1.15 Isole CpG

Le isole CpG sono delle sequenze discrete di DNA in cui è presente un'elevata frequenza di dinucleotidi CG non metilati. Sono presenti sia nelle piante che negli animali ed in entrambi sembrano localizzarsi in prossimità dei geni.

Ashikawa (2002) ha analizzato in *Oryza sativa* delle sequenze nell'intorno di geni in cui era frequente la presenza del dinucleotide CG ed in cui non era presente la metilazione. Tali sequenze in *Arabidopsis* sono per l'80% associate a geni. Ashikawa ha raggruppato 75 geni del cromosoma 1 di *Oryza sativa* in 5 gruppi in base alla localizzazione dell'isola CG: al primo gruppo appartenevano i geni contenenti tale sequenza in corrispondenza del 5', al secondo gruppo quelli che mostravano averla distribuita lungo tutto il gene, al terzo i geni contenenti tale sequenza a valle del 5', al quarto i geni aventi tale sequenza in corrispondenza sia del 5' che a valle, al quinto ed ultimo gruppo quelli che ne erano del tutto privi. La maggior parte dei geni studiati mostravano delle caratteristiche che li rendevano appartenenti al primo gruppo, mentre geni specifici del germoglio o della radice appartenevano agli altri gruppi. Tutto ciò fa emergere una correlazione tra i geni tessuto-specifici e la posizione dell'isola CG. Questo è un ottimo punto di partenza per lo studio di geni non caratterizzati, di cui si potrebbero avere delle informazioni utili sulla base della posizione dell'isola CG ad essi associata (Ashikawa, 2002). Curiosamente questa condizione sembra essere presente anche nell'uomo in cui i geni espressi durante la fase precoce dell'embrione che sembrano avere l'isola CG dopo il sito di start della trascrizione sono diversi rispetto a quelli espressi nei tessuti già differenziati (Ashikawa, 2002; Ponger et al., 2001).

1.15 Scopo della tesi

Lo scopo che si propone questa tesi è lo studio del meccanismo del priming in *Oryza sativa* ssp. *Japonica* cultivar carnaroli. Questa pianta non rappresenta solamente la principale fonte di sostentamento per più della metà della popolazione mondiale, ma riveste un ruolo molto importante anche nell'ambito scientifico poiché è una monocotiledone modello (Li et al., 2012). Inoltre tra tutti i cereali è la pianta con il genoma più piccolo e quindi più facile da studiare (Komatsu and Tanaka, 2004).

Al fine di raggiungere tale scopo sono state seguite due strategie: la prima prevedeva di indurre il priming con il fitormone SA, normalmente coinvolto nella via di segnalazione indotta da stress biotici, accoppiandolo poi con uno stress di tale natura, infezione fungina usando *Fusarium culmorum*; mentre la seconda ha previsto l'utilizzo del fitormone JA coinvolto nelle risposte a stress abiotici, accoppiandolo poi con uno stress di questo tipo; la ferita, al fine di mimare l'azione di insetti masticatori, ruminanti e ferite in genere.

Lo scopo di questi studi è quello di individuare dei geni coinvolti nel meccanismo del priming e studiarne il loro andamento d'espressione utilizzando la PCR semiquantitativa e quantitativa.

Il passo successivo è stato quello di eseguire delle analisi di natura epigenetica per studiare la metilazione del DNA e le modifiche istoniche al fine di correlare tali informazioni con l'espressione genica del priming.

Quindi è stata eseguita un'analisi per verificare la presenza della metilazione del DNA a carico della citosina, la 5'-metilcitosina, utilizzando la tecnica della Methylation Specific PCR (MSP) la quale permette di indagare lo stato di metilazione in zone specifiche.

Inoltre, per l'analisi delle modifiche istoniche è stata eseguita l'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) utilizzando degli anticorpi diretti contro l'acetilazione della lisina 9 dell'istone H3 e contro la trimetilazione della lisina 4 dell'istone H3. Entrambe queste modifiche istoniche sono note per favorire l'espressione genica: la prima è associabile ad uno stato di cromatina aperta, quindi il gene è trascrizionalmente attivo, mentre la seconda è associata ad uno stato di intensa attività trascrizionale, quindi il gene da essa regolato è trascritto ad alti livelli.

I risultati di queste analisi epigenetiche hanno permesso di approfondire la conoscenza del fenomeno del priming.

CAPITOLO2

2.1 Materiali

- ✓ I semi di *Oryza sativa* ssp. Japonica cultivar carnaroli sono stati forniti dall'Ente Nazionale Risi (Milano, Italia).
- ✓ Il patogeno *Fusarium culmorum* utilizzato nell'infezione è stato cresciuto e propagato nel laboratorio del Prof. Chilosi.
- ✓ L'estrazione dell'RNA totale è stata eseguita utilizzando il kit "Nucleospin RNA plant" prodotto dalla Macherey-Nagel (Düren, Germania).
- ✓ La conversione con bisolfito di sodio è stata eseguita utilizzando il kit "Epitect Bisulfite Kit" è prodotto dalla QIAGEN (Hilde, Germania)
- ✓ L'enzima "ImProm-II TM Reverse Transcriptase" usato nella reazione di retrotrascrizione è stato acquistato dalla Promega (Madison, WI, USA);
- ✓ I primers utilizzati nelle reazioni di PCR sono stati sintetizzati nei laboratori della PRIMM srl (Milano, Italia) e della BIOFAB research s.r.l. (Roma);
- ✓ La "BioTaq" utilizzata nelle reazioni di PCR, la taq Hot Start "MyTAQ" per la MSP ed il "GelRed" necessario per la colorazione degli acidi nucleici su gel di agarosio sono stati acquistati dalla Bioline (Milano, Italia,);
- ✓ I marcatori di peso molecolare utilizzati per la determinazione dei pesi molecolari e il detergente "RNAse away" per la decontaminazione di RNAsi sono stati acquistati alla Fermentas (Hanover, MD, USA);
- ✓ La Sso Advanced SYBR Green Supermix per le reazioni di REAL TIME PCR è stata acquistata presso la ditta BIORAD (Hercules, CA, USA);
- ✓ Gli anticorpi utilizzati nell'esperimento della ChIP sono della Abcam (Cambridge, Massachusetts, USA);
- ✓ Gli inibitori di proteasi e le protein A agarose beads utilizzati nel protocollo della ChIP sono della Roche (Basel, Svizzera);
- ✓ Le polveri per la preparazione di tutte le soluzioni utilizzate sono della SIGMA (St. Louis, Missouri, USA);
- ✓ I reagenti liquidi utilizzati negli esperimenti sono prodotti da Carlo Erba (Parigi, Francia)
- ✓ L'agarosio per la preparazione dei gel è un prodotto Aurogene (Roma, Italia).

2.1.1 Strumentazioni

- ✓ L'autoclave (mod. ALFA-Junior) è della PBI International (Milano, Italia)
- ✓ Il vortex (mod. REAX 2000) è della Heidolph (Germania)
- ✓ La bilancia analitica di precisione (mod. E42-B) è della Gilbertini (Novate, Milano)
- ✓ La centrifuga refrigerata Universal 32R è della Hettich (Germania)
- ✓ La centrifuga HERMLE Z252M è della Hermle Machine Company (Germania)
- ✓ Il termociclatore mod. TC-24/H(b) è della BIOER TECHNOLOGY (Tokyo, Japan)
- ✓ Il transilluminatore ultravioletto mod. TC- 365 R/F è della Spectroline (Westbury, New York, USA). La fotocamera digitale mod. 4.0 Megapixel è della Canon (Milano, Italia).
- ✓ L'apparato per l'elettroforesi su gel di agarosio mod. Mini-Sub Cell GT e l'alimentatore sono della
- ✓ Bio-Rad (Hercules, California, USA).
- ✓ Lo spettrofotometro mod. Lambda 20 è della PERKIN ELMER (Waltham, MA, USA).
- ✓ La pompa da vuoto è della DVA (Bologna, Italia)
- ✓ Il sonicatore è della Sonics & Materials (Newtown, USA)
- ✓ Il microscopio confocale è della Zeiss (Oberkochen, Germania)
- ✓ Il pHmetro mod. HI9017 è della Hanna Instruments (Woonsocket, Rhode Island, USA)
- ✓ Il blocco oscillante mod. Promax 1020 è della Heidolph (Schwabach, Germania)
- ✓ La cappa è della Gelaire (Sydney, Australia)
- ✓ Il termiciclatore per real time mod. Cycler 1000 è della BIORAD (Hercules, California, USA)
- ✓ Le camere di crescita sono state messe a disposizione dai prof: Ciaffi, Onofri, Ceoloni, Astolfi.
- ✓ Lo strumento Speed Vac concentrator è della Savant Instruments (SVPT, Roma, Italia).
- ✓ Il microscopio confocale mod. LSM 710 è della Zeiss (Germania).
- ✓ Il QUBIT per quantificare la concentrazione di DNA ed RNA è della Life Technologies (Carlsbad, USA)
- ✓ La bilancia analitica mod. WTB2000 è della RADWAG (Polonia)
- ✓ Il bagnetto termostato mod. SUB14 è della GRANT (Hopewell, Virginia, USA)
- ✓ Il blocco riscaldante mod. QBT è della GRANT (Hopewell, Virginia, USA)
- ✓ L'incubatore mod. CH-4103 è della Fors AG (Bottmingen, Svizzera)
- ✓ Il microincubatore mod. M91 è dei F.lli Galli (Milano, Italia)

- ✓ Il termociclatore mod. TC-312 è della Techne (Princeton, New Jersey, USA)

2.2 Metodi

2.2.1 Sterilizzazione e germinazione dei semi di riso

I semi di *Oryza sativa* ssp. Japonica cultivar Carnaroli sono stati sottoposti ad un processo di sterilizzazione non troppo aggressiva al fine di eliminare muffe e microorganismi che potevano annidarsi sulla cariosside. Quindi sono stati sottoposti ad un primo lavaggio con H₂O₂ 10% per 10 minuti a cui poi ne è seguito un altro con EtOH 70% per 5 minuti. Successivamente i semi sono stati scolati e risciacquati ulteriormente per 5 volte con H₂O sterile. Infine, sono stati lasciati ad imbibire in acqua sterile over night.

2.2.2 Piastramento semi

Il giorno successivo, i semi scolati sono stati trasferiti su delle Piastre Petri sul cui fondo erano presenti due fogli di carta da filtro ritagliati opportunamente ed autoclavati. Prima di posizionare i semi, i fogli di carta da filtro nelle piastre sono stati fatti imbibire con 5 ml di H₂O sterile. Sono stati posizionati 20 semi per piastra, poi sono stati aggiunti 2 ml di H₂O sterile, infine le piastre sono state ben chiuse con del parafilm al fine di non far evaporare l'acqua ed evitare contaminazioni.

E' seguita un'incubazione a 37°C per due giorni, aggiungendo di tanto in tanto altra H₂O sterile. Tale trattamento ha lo scopo di favorire la germinazione.

2.2.3 Trasferimento dei coleoptili su agar

I semi germinati sono stati trasferiti su un supporto di AGAR che si sostituisce al terreno ma fornisce ai germogli tutte le sostanze nutritive di cui hanno bisogno per crescere. Quindi la polvere di agar è stata sciolta mediante una sterilizzazione in autoclave in H₂O deionizzata e successivamente trasferita in vaschette di alluminio precedentemente autoclavate di dimensione 20 cm X 10 cm. Dopo che l'agar si è polimerizzato e freddato è stato inciso con una spatola sterile al fine di fare dei piccoli solchi non troppo profondi che ospiteranno i germogli. In ogni vaschetta sono stati trasferiti 54 semi, disposti 9 semi in ogni fila per 7 file totali. Nel trasferimento è stata

posta attenzione a non ferire in alcun modo la radice o il germoglio, quindi aiutandosi con delle pinzette sterili i semi sono stati adagiati nel solco inserendoci prima la radice.

Una volta terminata la semina le vaschette sono state chiuse con altre vaschette e sigillate con del parafilm per impedire l'accesso alle muffe. Tali vaschette sono state trasferite in una cella climatica con un fotoperiodo di 14h a 28°C e 10h a 23° per 7 giorni.

2.2.4 Trasferimento dei coleoptili in soluzione idroponica

La soluzione idroponica YOSHIDA è così composta:

REAGENTE	CONCENTRAZIONE
NH ₄ NO ₃	500 mM
K ₂ SO ₄	200 mM
CaCl ₂	360 mM
MgSO ₄	300 mM
NaH ₂ PO ₄	0,4 mM
MnCl ₂	20 mM
NH ₄ Mo ₇ O ₂₄	0,2 mM
H ₃ BO ₃	15 mM
ZnSO ₄	0,3 mM
CuSO ₄	0,3 mM
FeEDTA	40 µM

È stata portata a volume con H₂O deionizzata. Tale soluzione si sostituisce al terreno e permette all'operatore di controllare direttamente le concentrazioni dei sali usati per la crescita ottimale delle piante.

I supporti delle piantine sono dei vassoi contenenti degli alveoli rivestiti alla base con della lana di roccia imbibita nella soluzione idroponica. Tale lana di roccia servirà da substrato per le piantine e

manterrà un ambiente umido.

Successivamente in ogni alveolo è stato trasferito un coleoptile in modo da avere la radice verso il basso e la parte aerea verso l'alto. Infine si procede con il coprire la parte del seme con una piccola quantità di altra lana di roccia in modo che fuoriesca verso l'alto esclusivamente il germoglio.

I vassoi alveolari sono poi stati trasferiti in altri vassoi più grandi riempiti con 1,2 l di soluzione idroponica in modo che la base degli alveoli e quindi le radici, siano sempre a contatto con tale soluzione.

I vassoi sono stati trasferiti in camera di crescita per 14 giorni con il seguente fotoperiodo:

28°C per 14h luce;

23°C per 10h buio.

Ogni due giorni è stata cambiata la soluzione idroponica.

2.2.5 Trattamento induzione priming con acido salicilico

I semi dopo l'imbibizione over night con H₂O sterile, sono stati sottoposti ad un trattamento ulteriore di imbibizione con una soluzione di acido salicilico 100µM oppure H₂O sterile per i semi di controllo per 1h. Poi sono stati scolati e disposti nelle Piastre Petri (vedi sopra).

2.2.6 Preparazione spore di *Fusarium culmorum*

Dalle piastre su cui è stato fatto crescere il *Fusarium culmorum*, è stata eseguita un'operazione di raschiamento in presenza di alcuni ml di H₂O sterile al fine di prelevare le spore. Una goccia di tale sospensione è stata trasferita in una camera di Toma ed osservata al microscopio con OBIETTIVO 20X per la conta delle spore con il seguente calcolo:

$$\frac{(\text{SOMMA SPORE IN 5 QUADRATI SUPERIORI} + \text{SOMMA SPORE IN 5 QUADRATI INFERIORI})}{2} = \text{media delle spore presenti in due zone} \times 50000 = \text{spore/ml}$$

2.2.7 Infezione coleoptili di 7 giorni

La metà delle vaschette contenenti coleoptili di controllo e trattati con SA, sono state aperte ed è stata eseguita l'infezione con delle spore di *Fusarium culmorum* con una concentrazione di 120000 spore/ml. Tali spore sono state posizionate sul culmo della pianta. Poi le vaschette sono state richiuse e sono stati fatti i prelievi 1-2-3 giorni dopo l'infezione congelando immediatamente i campioni in N₂ liquido e conservandoli a -80°C fino al loro utilizzo.

2.2.8 Trattamento di induzione del priming usando metil jasmonato

La soluzione stock 100 mM di metil jasmonato è stata preparata unendo 436µl di EtOH e 10µl di metil jasmonato. Da tale soluzione è stata preparata una diluizione 10 µM e TWEEN 20 1% da usare come trattamento e H₂O sterile e TWEEN 20 1% come controllo.

Entrambe le soluzioni sono state spruzzate su due vassoi fino a che tutte le piante non mostrassero le foglie visibilmente bagnate. Infine sono state riportate in cella.

2.2.9 Ferita delle piante

Piante di 21 giorni di un vassoio spruzzato con metil-jasmonato ed uno con H₂O, sono state ferite usando una pinza scanalata su tutta la lunghezza per alterare la struttura della foglia. Inoltre è stato usato anche il carborundum per eliminare delgi strati superficiali della foglia in alcuni punti.

Alla fine del trattamento le piante sono state riportate in cella. I campioni foliari sono stati prelevati 3-6-24-48 h dopo il trattamento, immediatamente congelati in N₂ liquido e conservati a -80°C fino al loro utilizzo.

2.2.10 Estrazione dell'RNA

I campioni di riso, coleoptili e foglie, sono stati finemente pestellati in N₂ liquido usando mortaio e pestello continuamente raffreddati al fine di evitare lo scongelamento del materiale ed aliquote di

160 mg sono state sottoposte al protocollo di estrazione di RNA usando il kit Macherey Nagel NUCLEOSPIN RNA PLANT. Prima di eseguire le estrazioni tutti i materiali che sarebbero entrati a contatto con i campioni sono stati lavati con il detergente “RNAse away” e poi autoclavati per 1h a 121°C.

Il protocollo della casa produttrice è riportato qui di seguito:

- ✓ alla polvere è stato aggiunto 350 µl di buffer RAP contenente guanidina idrocloruro e SDS per rompere le pareti e le membrane cellulari e 3,5 µl di β-mercaptoetanolo, agente riducente dei ponti di solfuro;
- ✓ i campioni sono stati vortexati per alcuni secondi per permettere ai reagenti di agire;
- ✓ la soluzione così ottenuta è stata trasferita in una colonnina Nucleo Spin Filter inserita in un'eppendorf;
- ✓ è stata eseguita una centrifugata a 13500 rpm a 4°C per far separare i detriti cellulari dal lisato che contiene gli acidi nucleici. Gettare la Nucleo Spin Filter;
- ✓ il lisato è stato trasferito in un'altra eppendorf evitando di trasperire un eventuale pellet che si può formare;
- ✓ sono stati aggiunti 350 µl di EtOH 70% e capovolgere 5 volte per fare precipitare gli acidi nucleici;
- ✓ la soluzione è stata trasferita in una Nucleospin RNA plant column e centrifugata a 13500 rpm per un minuto al fine di far legare gli acidi nucleici alla membrana di silice;
- ✓ sulla membrana è stato aggiunto il buffer Membrane Desalting Buffer (MDB) per desalare la membrana e preparare il campione al passaggio successivo con la Dnase;
- ✓ è stata pipettata al centro della membrana soluzione composta da 30 µl di DNase I SET Macherey Nagel e 70 µl di buffer specifico. Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti;
- ✓ è stato eseguito un lavaggio con 200µl di buffer RA2 contenente un agente inattivante della Dnase e centrifugare per un minuto a 13500 rpm;
- ✓ è stato eseguito un lavaggio con 600µl di buffer RA3 contenente in massima parte EtOH e centrifugare per un minuto a 13500 rpm al fine di eliminare detriti di DNA;
- ✓ è stato eseguito un lavaggio con 250µl di buffer RA3 e centrifugare per due minuti a 13500 rpm;
- ✓ la membrana è stata trasferita in un'eppendorf in cui eseguire l'eluizione con 50µl di H₂O RNAse free per poi centrifugare per un minuto a 13500 rpm.

Il campione di RNA così ottenuto è stato subito analizzato mediante lettura allo spettrofotometro visualizzando l'assorbanza a 260 nm a cui assorbono gli acidi nucleici, 280 nm a cui assorbono le proteine e facendo il rapporto degli assorbimenti A_{260}/A_{280} . Tale rapporto è stato sempre compreso tra 1,8 e 2,2, tale range è ottimale e garantisce la bontà del campione. Inoltre, mediante il valore di assorbimento a 260 nm è stato possibile dedurre la concentrazione di ogni campione poiché una soluzione pura di RNA con un'assorbanza pari a 1 a 260 nm ha una concentrazione di 40 µg/ml, perciò sapendo il valore dell'assorbimento di un campione si può impostare una proporzione per dedurre la concentrazione.

Per appurare l'avvenuta decontaminazione dell'RNA dal DNA, il campione è sottoposto a PCR con una coppia di primers per un gene housekeeping, l'actina e successiva analisi su gel di agarosio all'1,2%. Tale gel, mediante visualizzazione al transilluminatore, non deve dare alcun amplificato.

2.2.11 Analisi dell'RNA mediante gel di agarosio 1%

Per verificare la qualità e l'integrità del campione, è stato caricato un 1 µg di RNA su gel di agarosio all'1% (w/v). L'opportuna quantità di agarosio è stata sciolta in un tampone TAE contenente Tris-acetato 40 mM ed EDTA 1 mM, ed è stato aggiunto del GEL RED, agente intercalante che rende visibile le molecole di RNA in seguito ad illuminazione con luce UV. Prima della carica ai campioni di RNA è stato aggiunto del glicerolo 40%.

2.2.12 Sintesi del cDNA

Per la retrotrascrizione dell'RNA, è stato usato la retrotrascrittasi della Promega "ImProm-II Reverse Transcriptase" seguendo le indicazioni della casa produttrice: 1µg di RNA stampo è stato unito a 1µl di OLIGO dT con concentrazione 0,5 µg/µl nel termociclatore a 70°C per 5 minuti al fine di denaturare l'RNA ed i primers. Successivamente il campione è posto a 4°C per 5 minuti e tenuto in ghiaccio fino all'aggiunta della mix finale composta da: reaction buffer specifico 1X, $MgCl_2$ 3mM, dNTP mix 0,5mM, 1 µl di enzima REVERSE TRASCRITASE ed acqua sterile fino ad un volume di 20 µl.

Dopo aver preparato questa mix si imposta nel termociclatore il seguente programma:

25°C per 15 minuti di ANNEALING

42°C per 60 minuti di ESTENSIONE

70°C per 15 minuti per INATTIVARE L'ENZIMA

2.2.13 PCR

I cDNA sono stati sottoposti ad amplificazione mediante PCR usando l'enzima Taq polimerasi “Biotaq” della Bioline usando inizialmente la coppia di primers del gene codificante l'actina per standardizzare la quantità dei campioni da usare in PCR. Successivamente sono stati usati per le PCR anche le altre coppie di primers oggetto dello studio.

La miscela di reazione per la PCR è così composta:

MgCl₂----> 2,5 mM

Reaction Buffer---> 1X

dNTPmix---> 0,2 mM

primer FOR---> 0,5 mM

primer REV---> 0,5 mM

enzima TAQ---> 3,5 U

E' stato raggiunto un volume finale di 25 µl aggiungendo una giusta quantità di campione ed H₂O sterile. Dopo aver spipattato la mix per omogeneizzarla, l'eppendorf è stata posta nel termociclatore ed è stato impostato il seguente programma:

95°C per 2 minuti come denaturazione iniziale

25 CICLI

95°C per un minuto per denaturare il campione
T.A. per 1 minuto per eseguire l'annealing
72°C per 30 secondi per permettere l'estensione

72°C per 5 minuti per l'estensione finale

2.2.14 Primers per acido salicilico

Questi primers sono stati progettati utilizzando il programma Primer3 in cui è stata inserita la sequenza del gene, non variando nulla nelle opzioni di default.

GENE CODIFICANTE	CODICE NCBI- PHYTOZOME	PRIMERS	SEQUENZA	T.A.*	LUNGHEZZA AMPLIFICATO
ACTINA	X16280.1	ACT for ACT rev	CTGCGGGTATCCATGAGACT GGAGCAAGGCAGTGATCTTC	57°C	154 bp
OsPR 1a	AJ278436.1 AF251277	PR 1a for PR 1a rev	TTATCCTGCTGCTTGCTGGT GATGTTCTCGCCGTACTIONTCC	56°C	228 bp
OsPR 1b	U89895.1	PR 1b for PR 1b rev	CTTGGCGAGAACCTCTTCTG GCCGGCTTATAGTTGCATGT	55°C	236 bp
OsPR 4a	AY050642.1 AK121127	PR 4a for PR 4a rev	GTGCGAGCCACGTATCATT CTGGATACACTTGCCACACG	55°C	183 bp
OsPR 4b	AK063234.1	PR 4b for PR 4b rev	CGGAAAACAATTGGGATTG TCGTCACCGAGAGACATTG	56°C	165 bp
OsWRKY 62	AK067834.1	WRKY62 for WRKY62 rev	GAGACCGTGAAGGATGGGTA GTCGCCACTAGCATTGACCT	58°C	161 bp
Lipoxygenase	AJ270938.1 (AK072241)	LOX for LOX rev	CAGTACCAGACCACCCTCGT TGCTCATCATCCTCTCGTTG	56°C	154 bp
OsWRKY 53	NC_008395.2	WRKY 53 for WRKY 53 rev	TCTCCTTCCACACCAACTCC GTCCTCCAGCTTGTGTTCC	58°C	158 bp
Os WRKY76	AK068337	WRKY 76 for WRKY 76 rev	CAAGTCGATGACCAATGACG GCTCTCCCTGCTCCTCTTCT	57°C	193 bp
OsMAPK5	AF332873	MAPK5 for MAPK5 rev	GCAGATCCTGCTCGAGTACA GAGTCGATGAGGAGGTTGGA	54°C	168 bp
CEBiP	NM_001055410	CEBiP for CEBiP rev	ATGGCACCTATGGATTACCC TGAGCGATGAACTGTTGGAG	56°C	207 bp
OsNH1	AK120715	NH1 for NH1 rev	ATCTTGATGATGCGTTTGC TCAGCTTGCTCCAGTATTC	51°C	406 bp
JaMYB	AY026332	JAMYB for JAMYB rev	TCCGGTGGCTGAACTATCTC GCTTTTGCACTCTGGTCCTC	56°C	180 bp
BISAMT	NC_008395.2	BISAMT for BISAMT rev	TGTACCAGTTCAGGGGGAAG ATTACTGCAAGGCGACCATC	56°C	155 bp
WRKY 71	AB190817	WRKY71 for WRKY71 rev	TCTTTCACCAGCAGCCTCTC GTGACCATGTCGCTGAACTG	58°C	157 bp
CHITINASI	AK064754	CHIT for CHIT rev	ACGGACCGAGCAAGAACTAC TGCACGTTGTTGGTCCAGTA	57°C	223 bp

*T.A.= temperatura di annealing

2.2.15 Primers per metil-jasmonato

Questi primers sono stati progettati utilizzando il programma Primer3 in cui è stata inserita la sequenza del gene, non alterando nulla nelle opzioni di default.

GENE CODIFICANTE	CODICE NCBI-PHYTOZOME	PRIMERS	SEQUENZA	T.A.*	LUNGHEZZA AMPLIFICATO
ACTINA	X16280.1	ACT for ACT rev	CTGCGGGTATCCATGAGACT GGAGCAAGGCAGTGATCTTC	57°C	154 bp
OsPR 1a	AJ278436.1 AF251277	PR 1a for PR 1a rev	TTATCCTGCTGCTTGCTGGT GATGTTCTCGCCGTA CTTC	56°C	228 bp
OsPR 1b	U89895.1	PR 1b for PR 1b rev	CTTGCGGAGAACCTCTTCTG GCCGGCTTATAGTTGCATGT	55°C	236 bp
OsMAPK5	AF332873	MAPK5 for MAPK5 rev	GCAGATCCTGCTCGAGTACA GAGTCGATGAGGAGGTTGGA	54°C	168 bp
JaMYB	AY026332	JAMYB for JAMYB rev	TCCGGTGGCTGAACTATCTC GCTTTTGCACTCTGGTCCTC	56°C	180 bp
Lipo-ossigenasi (LOX)	AF095896	LOX-JA for LOX-JA rev	TGTACGTGCCGAGGGACGAG GCGAGCGTCTCCCTCGCGAACT C	62°C	348 bp
OsPR10	D38170	PR 10 for PR 10 rev	GCTACAGGCATCAGTGGTCA GACTCAAACGCCACGAGAAT	56°C	450 bp
BOWMAN-BIRK PROTEINASE INHIBITOR (BBPI)	U76004	BBPI for BBPI rev	GCTCATCTGCGAGGACATCT TTCCCTCATGGTCCACACAAG	56°C	495 bp
Perossidasi OsPOX	X66125	OsPOX for OsPOX rev	ACCGACATGGTTGCTCTCTC ATGGCTGCTCTGCTCCATAC	57°C	612 bp
Fenil-ammonio liasi	XI6099	OsPAL for OsPAL rev	CACAAGCTGAAGCACCACC C GAGTTCACGTCCTGGTTGTG	58°C	607 bp
OsEDR1	AY167575	OsEDR1 for OsEDR1 rev	CTTGTGATTGGTGAAAGGAT TGGC GCAATTAGGACGGTGAAGGA TCT	59°C	302 bp

*T.A.= temperatura di annealing

2.2.16 Primers per la REAL TIME PCR

Questi primers sono stati progettati utilizzando il programma IDT in cui è stata inserita la sequenza genica non modificando le impostazioni di default.

GENE CODIFICANTE	CODICE NCBI- PHYTOZOME	PRIMERS	SEQUENZA	T.A.*	LUNGHEZZA AMPLIFICATO
Eukaryotic elongation factor 1- alpha e-EF1a	AK061464	eEF1a for eEF1a rev	AGCGTGTGATTGAGAGGTTC ACTTCCACAGGGCAATATCG	56°C	132 bp
BOWMAN-BIRK PROTEINASE INHIBITOR (BBPI)	U76004	BBPI for BBPI rev	TGATCTACCCGCCACTGTA GAGAACCAGTCACTGCAGAC	56°C	137 bp
Perossidasi OsPOX	X66125	OsPOX for OsPOX rev	TGAGGGGATTGAGCGTCATC TCCCTTCTCCCCAACAGAAC	57°C	157 bp
Lipo-ossigenasi (LOX)	AF095896	LOX-JA for LOX-JA rev	CAAGCAGTTCCCTTACCCTC TCTTCACCTCCGAGAACTCC	56°C	135 bp
JaMYB	AY026332	JAMYB for JAMYB rev	TGTTTTGATGGCTCTCCGAG TCAAATCTTGACTCCGACG	56°C	73 bp

T.A.= temperatura di annealing

2.2.17 Primers per la ChIP-REAL TIME PCR

Questi primers sono stati progettati utilizzando il programma IDT in cui è stata inserita la sequenza genica non modificando le impostazioni di default.

GENE CODIFICANTE	CODICE NCBI- PHYTOZOME	PRIMERS	SEQUENZA	T.A.	LUNGHEZZA AMPLIFICATO
Eukaryotic elongation factor 1-alpha e-EF1a	AK061464	eEF1a for eEF1a rev	AGCGTGTGATTGAGAGGTTC ACTTCCACAGGGCAATATCG	56°C	132 bp

Perossidasi OsPOX	X66125	POX1 for POX1 rev	ATAAACCAGAGCCGTTGTGC CCAGTCCAAGGAAAATGACC	55°C	101 bp
Perossidasi OsPOX	X66125	POX2 for POX2 rev	AAATGCGGACCTTTTGTACG GGCACGTCATTTTCGTGTAG	55°C	85 bp
Perossidasi OsPOX	X66125	POX3 for POX3 rev	TGCGTCTTCTGATGAGCCTA CATGGCATGATAAGCTGGAA	55°C	97 bp
Perossidasi OsPOX	X66125	POX4 for POX4 rev	CGTACGCTTGTATGCCAATG CGAGCATGCCACTCTTGTAG	56°C	84 bp
Perossidasi OsPOX	X66125	POX5 for POX5 rev	GCGTCTGATTGCACTGTGTT CCAAAGCTAGCCTTTTGACG	56°C	97 bp
BOWMAN-BIRK PROTEINASE INHIBITOR (BBPI)	U76004	BBPI1 for BBPI1 rev	GGTCCTGCTGCACGATAAAA ATGGATCTCTTACACGGATGAC	57°C	80 bp
BOWMAN-BIRK PROTEINASE INHIBITOR (BBPI)	U76004	BBPI2 for BBPI2 rev	GCGATGCGTACAGTAGAGAAG TTGTAAC TACGTGAGACTGCG	57°C	82 bp
BOWMAN-BIRK PROTEINASE INHIBITOR (BBPI)	U76004	BBPI3 for BBPI3 rev	CGTCACCATCACCGATCAC TTGCTCGATCGTTCTGGAGT	57°C	99 bp
BOWMAN-BIRK PROTEINASE INHIBITOR (BBPI)	U76004	BBPI4 for BBPI4 rev	CCTCCACGTGCTCTTATCCT AGTGATGGGTCGAGTGGTTA	57°C	114 bp
BOWMAN-BIRK PROTEINASE INHIBITOR (BBPI)	U76004	BBPI5 for BBPI5 rev	TGATCTACCCGCCACTGTA GAGAACCAGTCACTGCAGAC	56°C	137 bp

*T.A.= temperatura di annealing

PRIMERS PER MSP

Questi primers sono stati progettati utilizzando il programma METHPRIMER, in cui è stata inserita la sequenza da amplificare senza variare le impostazioni di default.

GENE CODIFICANTE	CODICE NCBI- PHYTOZOME	PRIMERS	SEQUENZA	T.A.*	LUNGHEZZA AMPLIFICATO
BOWMAN-BIRK PROTEINASE INHIBITOR (BBPI) -9145 bp a – 9004 bp dall'ATG	U76004	BBPI850M for BBPI850 M rev	ATTTCGGGTTTTTTTTGTACGTC TCCAAC TACTAACAATCCTTACAC G	55°C	142 bp
		BBPI850 U for BBPI850 U rev	ATTTGGGTTTTTTTTGTATGTTGA TCCAAC TACTAACAATCCTTACAC AC	52°C	142 bp
BOWMAN-BIRK PROTEINASE INHIBITOR (BBPI) -2175 bp a – 1933 bp dall'ATG	U76004	BBPI7800 M for BBPI7800 M rev	TGGATACGATAACGTTTAGTACGG CCGAAAATCAAAATAAACTCGTT	54°C	243 bp
		BBPI7800 U for BBPI7800 U rev	TTGGATATGATAATGTTTAGTATG G TCCAAAAATCAAAATAAACTCAT T	51°C	245 bp
Perossidasi OsPOX da - 6052bp a –5934 bp dall'ATG	X66125	POX4000 M for POX4000 M rev	ATTTAGCGTTATTAGATCGATTTC G AAAAAACTAAAACCCGCATACG	53°C	119 bp
		POX4000 U for POX4000 U rev	TTTAGTGTTATTAGATTGATTTTG A AAAAAACTAAAACCCACATACAAA	50°C	118 bp
Perossidasi OsPOX da -4209 bp a –4018 bp dall'ATG	X66125	POX5800 M for POX5800 M rev	TTTGGTAGTTTATTGTTGTTTGAT C ATACGAAACTCGTTATTACGAC	54°C	192 bp
		POX5800 U for POX5800U rev	TTTGGTAGTTTATTGTTGTTTGAT TG CCCATACAAAAC TCATTATTCACA AC	54°C	195 bp

*T.A.= temperatura di annealing

2.2.18 Primers per MSP in corrispondenza dell'ATG

Questi primers sono stati progettati utilizzando il programma METHPRIMER, in cui è stata inserita la sequenza da amplificare senza variare le impostazioni di default.

GENE CODIFICANTE	CODICE NCBI- PHYTOZOME	PRIMERS	SEQUENZA	T.A.*	LUNGHEZZA AMPLIFICATO
BOWMAN-BIRK PROTEINASE INHIBITOR (BBPI)	U76004	BBPI-ATG M for BBPI-ATG M rev	TTCGTTATTGTATCGTTGTAACGAC CTTAAAACCGAAATCCACCG	56°C	142 bp
		BBPI-ATG U for BBPI-ATG U rev	TGTTATTGTATTGTTGTAATGATGA TACACTTAAAACCAAAATCCACCAT	56°C	144 bp
Perossidasi OsPOX	X66125	POX-ATG M for POX-ATG M rev	AGTAATTTTTTGTAAGTTATAACGG GACGCTCTTAATAATAACCAACG	62- 50°C	201 bp
		POX-ATG U for POX-ATG U rev	AGTAATTTTTTGTAAGTTATAATGG AACACTCTTAATAATAACCAACACC	62- 50°C	201 bp

*T.A.= temperatura di annealing

VERIFICA DEI PRIMERS

I primers ottenuti sono stati sottoposti a verifiche circa la loro reale capacità di appaiamento mediante l'utilizzo del programma simulatore di PCR, AmplifX dal quale si ottengono informazioni sulla loro specificità. Inoltre è stata verificata l'omologia di sequenza di ciascun primer FOR e del corrispondente amplificato con il gene di interesse mediante il programma BLAST.

2.2.19 Estrazione del DNA genomico da foglie di riso

Una quantità pari ad 1 gr di foglie di riso è stata pestellata in un mortaio e pestello raffreddati in N₂ liquido continuando a pestellare ulteriormente avendo cura di non fare sciogliere il campione. E' stato aggiunto 10% polivinil-pirrolidone PVP (w/w) continuando a pestellare fino ad ottenere una

polvere finissima. Il PVP ha lo scopo di favorire la rottura della parete vegetale.

Sotto cappa sono stati aggiunti 20 ml di una soluzione EB (di lisi) così composta: TRIS HCl 100 mM pH 8; EDTA 50 mM; NaCl 500 mM. A tale soluzione sono stati aggiunti inoltre 16 µl di β-mercaptoetanololo, agente riducente dei ponti di solfuro. Tale poltiglia è stata trasferita in un tubo Falcon da 50 ml con l'aiuto di un pipettatore ed è stata vortexata vigorosamente per circa 15 secondi.

Sono stati aggiunti 1,5 ml di SDS 20%, detergente anionico che favorisce la deproteinizzazione, ed agitando a fondo, evitando anche di produrre troppe bolle. Il campione è stato posto nel bagnetto termostato a 65°C per 10 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 7,5 ml di potassio acetato 5M, il tutto è stato miscelato e posto in ghiaccio per 20 minuti. In questa fase il pH viene neutralizzato e le proteine tendono a precipitare.

Il campione è stato centrifugato a 9000 rpm a 4°C per 45 minuti ed il supernatante trasferito, attraverso un imbuto di carta MIRACLOTH, in un altro tubo falcon in cui sono stati precedentemente versati 15 ml di isopropanolo. E' stata eseguita un'operazione di inversione molto delicata al fine di far precipitare gli acidi nucleici.

Quindi il campione è stato incubato per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente centrifugato a 9000 rpm a 4°C per 45 minuti. Il supernatante è stato eliminato, il pellet è stato fatto asciugare sotto cappa e risospeso in 300 µl di TRIS-HCl 10 mM pH8 ed EDTA 1 mM (TE). Il campione è stato eseguito in eppendorf da 1,5 ml.

Al campione sono stati aggiunti 2 µl di Rnase A 10 mg/ml ed è stato posto ad incubare nel bagnetto a 37°C per 1h per fare degradare l'RNA.

Sono state eseguite le precipitazioni in fenolo basico:cloroformio:isoamil alcol 25:24:1 come è qui di seguito descritto. Dalla soluzione precedentemente preparata di fenolo:cloroformio:isoamil alcol, sono stati prelevati 300 µl dalla fase inferiore (volume 1:1 con il campione) e trasferiti nel campione, vortexando per 5 secondi e poi centrifugare a 13500 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente. In questo step si sfruttano le proprietà dei reagenti utilizzati: il fenolo ha la capacità di denaturare le proteine favorendo la loro precipitazione oltre che essere un solvente dei lipidi e delle molecole di RNA; il cloroformio denatura le proteine e rimuove i lipidi; l'isoamil alcol evita la formazione di schiuma durante il procedimento. Al termine della centrifugata si avevano tre fasi: superiore, contenente gli acidi nucleici, in questo caso DNA; interfase con proteine denaturate; fase inferiore con proteine denaturate.

E' stata prelevata la fase superiore, trasferita in un'altra eppendorf da 1,5 ml ed aggiunto un uguale volume di soluzione fenolo:cloroformio:isoamil alcol. E' stata ripetuta la Vortexata per 5 secondi e la centrifugata a 13500 rpm, a temperatura ambiente e trasferendo la fase superiore in un'altra

eppendorf da 1,5 ml.

E' stato aggiunto un ugual volume di cloroformio al campione, poi vortexato e centrifugare a 13500 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente. La fase superiore è stata trasferita in un'altra eppendorf.

Al termine di questa fase il DNA è decontaminato dall'RNA.

Al DNA è stato aggiunto del Na acetato 3M a pH 5.2 in quantità pari ad 1/10 del volume e 2 volumi di etanolo freddo. Dopo aver miscelato per fare precipitare il DNA, il campione è stato posto a -20°C over night.

Quindi il campione è stato centrifugato per 1h a 13500 rpm a temperatura ambiente ed il supernatante è stato eliminato. Il pellet di DNA è stato lavato con 500 µl di etanolo 70% e centrifugato nuovamente per 5 minuti a 13500 rpm a temperatura ambiente. Il supernatante è stato eliminato ed il pellet asciugato in savant. Infine è stato risospeso in 50 µl di acqua sterile.

Al fine di verificare la bontà del campione, caricare 1 µl del campione puro ed 1µl della sua diluizione 1:10 su un gel di agarosio allo 0,8%. Il risultato deve mostrare una banda unica sopra la banda più alta del marker scelto.

2.2.20 Conversione con bisolfito di sodio

La conversione dei campioni di DNA genomico usando il bisolfito è stata eseguita usando il QIAGEN EPITECT BISULFITE KIT. Questo kit offre l'opportunità di convertire campioni di DNA con varia concentrazione dando un'elevata efficienza di conversione e minima degradazione del campione. Sono stati eseguiti due diversi protocolli in relazione alla concentrazione dei campioni, entrambi forniti dalla casa produttrice: quelli con concentrazione superiore a 150 ng/µl hanno subito il seguente trattamento: in una eppendorf da 250 µl sono stati messi 1,5 µg di DNA genomico, Rnase free water fino ad un volume di 20 µl, Bisulfite mix 85 µl e 35 µl di DNA Protect Buffer al fine di limitare la degradazione del materiale. Nel momento in cui si aggiunge l'ultimo reagente la reazione fino ad allora incolore assumerà una colorazione bluastro e ciò significa che il pH della reazione è corretto (pH 5). Il volume finale della reazione è 140 µl.

Nel caso di campioni con concentrazione inferiore a 150 ng/µl la composizione della reazione di partenza è leggermente diversa: 750 ng di DNA genomico, Rnase free water fino a raggiungere un volume di 40 µl, Bisulfite mix 85 µl e 15 µl di DNA Protect Buffer.

Infine, le reazioni sono state poste nel termociclatore ed è stato impostato il seguente programma:

STEP	TEMPO (minuti)	TEMPERATURA (°C)
DENATURAZIONE	5	95
INCUBAZIONE	25	60
DENATURAZIONE	5	95
INCUBAZIONE	85	60
DENATURAZIONE	5	95
INCUBAZIONE	175	60
MANTENIMENTO	indefinito	20

Durante il trattamento nel termociclatore si ha la conversione della citosina non metilata in citosina solfonato mediante l'aggiunta dello ione idrogeno solfito e successiva conversione in uracile solfonato.

Dopo un rapido spin down del campione, esso è stato trasferito in un'eppendorf da 1,5 ml a cui sono stati aggiunti 560 µl di Buffer di legame (BL) il quale favorisce l'interazione del DNA convertito con la membrana con cui verrà in contatto nello step successivo. Dopo aver vortexato e centrifugato velocemente la soluzione è stata trasferita nella Epitect Spin columns con relativo collection tube, è stata eseguita una centrifugata per un minuto a 13500 rpm ed il lisato è stato scartato. In questa fase il DNA convertito si è legato alla membrana di silice presente nella colonnina mentre il resto è stato eliminato.

Sono stati aggiunti 500 µl di Buffer di lavaggio (BW) contenente in massima parte etanolo per rimuovere efficacemente ogni residuo di bisolfito di sodio e le molecole che hanno interagito aspecificamente con la membrana. Il campione è stato centrifugato per un minuto a 13500 rpm ed il lisato è stato scartato.

Sono stati aggiunti 500 µl di Buffer di Desulfonazione (BD) per rimuovere il gruppo solfonato ed il campione è stato incubato per 15 minuti a temperatura ambiente. In questo passaggio l'uracile solfonato viene convertito in uracile mediante perdita del gruppo idrogeno solfito.

Dopo una centrifugata di un minuto a 13500 rpm e lo scarto del relativo lisato sono stati eseguiti due lavaggi con 500 µl di BW. Il campione è stato nuovamente centrifugato a 13500 rpm per un minuto, scartando il lisato.

La colonnina è stata trasferita in un altro collection tube e centrifugata a 13500 rpm per un minuto per rimuovere eventuali residui.

La colonnina è stata posta in un'eppendorf da 1,5 ml sul blocco riscaldante a 56°C per 5 minuti con il tappo aperto al fine di fare evaporare ogni residuo liquido.

L'eluizione è stata eseguita trasferendo la colonnina in una nuova eppendorf da 1,5 ml e pipettando al centro della membrana 20 µl di Buffer di Eluizione (EB). Tale campione è pronto per la MSP.

2.2.21 METHYLATION SPECIFIC PCR (MSP)

Al fine di appurare la presenza della metilazione su una citosina specifica, sono state allestite per ogni campione due MSP: in una mix sono stati aggiunti i primers che si appaiano se la citosina è metilata, COPPIA M (M PAIR), nell'altra mix sono stati aggiunti i primers che si appaiano se la stessa citosina non è metilata e quindi convertita in uracile, COPPIA U (U PAIR). Poiché si devono amplificare delle zone ricche in CG si è preferito utilizzare un enzima HOT START per template ricchi in CG.

Quindi è stato usato l'enzima MyTaq HS DNA Polymerase della BIOLINE con specifico MyTaq Reaction Buffer 5X contenente dNTP mix, MgCl₂ ed enhancer per favorire l'amplificazione. Le reazioni sono state allestite con suggerito dalla casa produttrice:

5 µl di Reaction Buffer 5X

1 µl di primer FOR 10 µM

1 µl di primer REV 10 µM

0,2 µl di enzima MyTaq HS DNA Polymerase

30 ng di DNA convertito

H₂O sterile per arrivare ad un volume di 25 µl.

Nel termociclatore è stato impostato il seguente programma:

STEP	TEMPERATURA (°C)	TEMPO	CICLI
DENATURAZIONE INIZIALE	95	1 minuto	1
DENATURAZIONE	95	15 secondi	30
ANNEALING	T.A	15 secondi	
ESTENSIONE	72	10 secondi	
ESTENSIONE FINALE	72	2 minuti	

Il risultato delle MSP è stato verificato caricando 10 µl della reazione di PCR su un gel di agarosio all'1,2%.

2.2.22 PCR TOUCHDOWN

Nel caso in cui non sia chiara la giusta temperatura di annealing della coppia dei primers utilizzati, dopo aver preparato la reazione di PCR nello stesso modo illustrato sopra, è stato imposto nel termociclatore il seguente programma:

STEP	TEMPERATURA(°C)	TEMPO (secondi)	CICLI
DENATURAZIONE INIZIALE	95	60	1
DENATURAZIONE	95	15	10
ANNEALING	60-51	15	
ESTENSIONE	72	10	
DENATURAZIONE	95	15	20
ANNEALING	50	15	
ESTENSIONE	72	10	

Durante questo trattamento, nel momento in cui i primers si appaiano alla giusta temperatura di annealing, la PCR viene eseguita normalmente.

2.2.23 Crosslinking dei campioni da sottoporre alla ChIP

I campioni fogliari delle piante sono stati messi in tubo Falcon da 50 ml e risciacquati due volte con H₂O sterile. Successivamente sono stati trasferiti e tagliati in piccoli pezzetti in delle Piastre Petri in cui sono stati versati 37 ml di formaldeide 1% e poi incubati sotto vuoto per 15 minuti a temperatura ambiente. In questa fase la formaldeide penetra nelle cellule e fissa tutto ciò che interagisce con il DNA. Finita l'incubazione sono stati aggiunti 2,5 ml di glicina 5M filtrosterilizzata e dopo aver omogenizzato la soluzione è stata messa ad incubare sotto vuoto per altri 5 minuti. Questa fase ha lo scopo di bloccare l'azione della formaldeide che altrimenti

fisserebbe troppo il campione rendendolo inutilizzabile.

La soluzione di formaldeide e glicina è stata eliminata risciacquando per 3 volte i campioni con H₂O sterile. Dopo averli scolati, sono stati congelati in N₂ liquido e conservati nel – 80°C fino al loro utilizzo.

2.2.24 Estrazione della cromatina

Per l'estrazione della cromatina è stato seguito il protocollo pubblicato da Gendrel et al. (2005).

I campioni crosslinkati sono stati pestellati in N₂ liquido con mortaio e pestello fino ad ottenere una finissima polvere che è stata trasferita in un tubo Falcon da 50 ml. Sono stati aggiunti 5 volumi di Extraction Buffer 1 raffreddato a 4°C e costituito da: 20 ml saccarosio 2M, 1 ml TRIS-HCl 1M pH 8, 1 ml di MgCl₂ 1M, 35 µl di β-mercaptoetanololo 14,3 M, 50 µl PMSF 0,2M, 2 pasticche di cocktail di inibitori delle proteasi ed H₂O sterile fino ad un volume di 100 ml. Il tubo Falcon è stato invertito fino a che la polvere non si è risospesa, successivamente è stato posto in ghiaccio per 5 minuti.

La soluzione è stata filtrata attraverso due fogli di carta Miracloth in un nuovo tubo Falcon, posta in ghiaccio e centrifugata a 3000 g a 4°C per 20 minuti.

Il supernatante è stato rimosso ed il pellet è stato risospeso in 1 ml di Extraction Buffer 2 raffreddato a 4°C e costituito da: 1,25 ml saccarosio 2M, 100 µl di TRIS-HCl 1M pH 8, 100 µl di MgCl₂ 1M, 0,5 ml di TRITON X-100 20%, 3,5 µl di β-mercaptoetanololo 14,3 M, 5 µl di PMSF 0,2M, 1 pasticca di cocktail di inibitori delle proteasi ed H₂O sterile fino ad un volume di 10 ml. La risospensione è stata trasferita in un'eppendorf da 1,5 ml e centrifugata a 12000 g a 4°C per 10 minuti. In questa fase si forma un pellet biancastro contenente i nuclei.

Il supernatante è stato eliminato ed il pellet è stato risospeso in 300 µl di Extraction Buffer 3 raffreddato a 4°C composto da: 8,5 ml di saccarosio 2M, 100 µl di TRIS-HCl 1M pH 8, 75 µl di TRITON X-100 20%, 20 µl di MgCl₂ 1M, 3,5 µl di β-mercaptoetanololo 14,3 M, 5 µl di PMSF 0,2M, una pasticca di cocktail di inibitore delle proteasi ed H₂O sterile fino ad un volume di 10 ml. La risospensione così ottenuta è stata trasferita in un'altra eppendorf da 1,5 ml in cui era stato precedentemente trasferito l' Extraction Buffer 3 in quantità di 300 µl, al fine di far stratificare la risospensione sul buffer. Poi l'eppendorf con il campione è stata centrifugata a 16000 g a 4°C per 1 h. Il supernatante è stato eliminato mentre il pellet è stato risospeso con 500 µl di Nuclei Lysis Buffer o Sonication buffer ottenuto unendo i seguenti reagenti: 0,5 ml di TRIS-HCl 1M pH 8, 200

μl di EDTA 0,5 M, 0,5 ml di SDS 20%, una pasticca di cocktail di inibitori delle proteasi ed H₂O sterile fino a raggiungere un volume di 10 ml.

Dopo la risospensione, dal momento che erano presenti dei detriti, è stata eseguita una breve centrifugata ed il supernatante è stato trasferito in un nuova eppendorf per essere sonicato. La sonicazione è stata così eseguita: 5 trattamenti da 20 secondi ad una potenza del 30% con un intervallo di 1 minuto tra un trattamento e l'altro. Lo scopo di questo trattamento è quello di ottenere dei frammenti di cromatina di dimensione tra 100 e 500 bp.

2.2.25 Immunoprecipitazione

Dopo aver stimato la concentrazione utilizzando il QUBIT, il passo successivo è stato quello di utilizzare per l'immunoprecipitazione la stessa quantità dei campioni tenendo come riferimento la concentrazione più bassa.

Ad ogni campione è stata aggiunta una quantità di ChIP Dilution Buffer al fine di avere un volume finale 10 volte maggiore rispetto a quello iniziale. Tale buffer è così composto: 1,1 ml di TRITON X-100 al 20%, 48 μl di EDTA 0,5 M, 334 μl di TRIS-HCl 1M a pH8, 668 μl di NaCl 5M e supplemento di H₂O sterile fino ad un volume di 20 ml.

Dopo aver prelevato 50 μl di beads per campione, tali beads sono state lavate per 3 volte con 500 μl di ChIP Dilution Buffer, centrifugate a 2500 rpm a 4 °C per un minuto ed il supernatante è stato scartato. Infine è stato aggiunto 1 ml di ChIP Dilution Buffer, 10 μl di BSA (10mg/ml) ed 1 μl di salmon sperm (1mg/ml) e le beads sono state messe in agitazione per 1h a 4°C al fine di saturare i siti aspecifici delle beads. Dopo l'incubazione è stata eseguita una centrifugata a 2500 rpm a 4°C per un minuto ed il supernatante è stato eliminato. Sul pellet costituito dalle beads è stato messo il campione, poi incubato per 2 h a 4°C in agitazione. Durante questa fase il campione viene “chiarificato”, cioè si lega alle beads tutto ciò che c'è di aspecifico nel campione.

Dopo l'incubazione, il campione è stato centrifugato a 5000 rpm per 1 minuto a 4°C ed il supernatante è stato suddiviso in 4 aliquote da 500 μl: INPUT, parte del campione che non ha subito l'immuno-precipitazione e che contiene la cromatina sonicata; ACETILAZIONE, parte del campione che è stato fatto immunoprecipitare con l'anticorpo anti acetilazione lisina 9 istone H3; TRIMETILAZIONE, parte del campione che è stato fatto immunoprecipitare con l'anticorpo anti trimetilazione della lisina 4 dell'istone H3; NO Ab, campione che ha subito lo stesso procedimento di quelli immunoprecipitati ma in assenza di anticorpo.

L'INPUT ed il surplus di campione (se presente) sono stati immediatamente congelati in N₂ liquido

e poi conservati nel -80°C.

Ai campioni ACETILAZIONE, TRIMETILAZIONE e NO Ab, sono stati aggiunti 5µl di BSA 10mg/ml, 2,5 µl di salmon sperm (1mg/ml) e 2,5 µl di anticorpo specifico (dil 1:200) tranne nel NO Ab. Dopo aver vortexato e centrifugato molto velocemente, i campioni sono messi ad incubare in agitazione a 4°C over night per fare interagire l'anticorpo con il complesso istone-DNA.

Sono stati preparati 50µl di beads per ogni campione come descritto sopra e successivamente i campioni incubati sono stati trasferiti nelle eppendorf contenenti le beads ed incubati a 4°C per 3h in agitazione. In questa fase gli anticorpi si legano alle beads.

Dopo una centrifugata a 3000 rpm per un minuto a 4°C, il pellet così ottenuto è stato sottoposto a dei lavaggi:

2 lavaggi con 500 µl di LOW SALT BUFFER costituito da NaCl 150 mM, SDS 0,1%, TRITON X-100 1%, EDTA 2mM, TRIS-HCl 20 mM pH 8, 10 minuti di incubazione a 4°C in movimento. Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 4°C, 2500 rpm per un minuto ed il supernatante è stato eliminato.

2 lavaggi con 500 µl di HIGH SALT BUFFER costituito da NaCl 500 mM, SDS 0,1%, TRITON X-100 1%, EDTA 2mM, TRIS-HCl 20 mM pH 8, 10 minuti di incubazione a 4°C in movimento. Successivamente centrifugare i campioni sono stati centrifugati a 4°C, 2500 rpm per un minuto ed il supernatante è stato eliminato.

1 lavaggio intenso e rapido con 500 µl di LiCl wash buffer composto da LiCl 0,25 M, NP-40 1%, DOC 1%, EDTA 1mM, TRIS-HCl 10 mM pH 8. I campioni sono stati centrifugati immediatamente a 2500 rpm per un minuto a 4°C ed il supernatante è stato eliminato.

2 lavaggi con 500 µl di TE intensi e rapidi centrifugando subito a 2500 rpm per un minuto a 4°C. Il supernatante è stato eliminato .

Per eseguire l'eluizione in ogni eppendorf sono stati trasferiti 150 µl di Elution Buffer (1 ml di SDS20%, 0,168g di NaHCO₃ ed H₂O sterile fino ad un volume di 20 ml) e successivamente è stata eseguita l'incubazione nel bagnetto a 65°C per 5 minuti. Poi i campioni sono stati velocemente vortexati e rimessi nel bagnetto a 65°C per altri 5 minuti.

I campioni sono stati centrifugati a temperatura ambiente a 13500 rpm per un minuto ed il supernatante contenente gli immunocomplessi è stato trasferito in una nuova eppendorf da 1,5 ml.

L'eluizione è stata ripetuta nuovamente al fine di avere un volume finale del supernatante di 300 µl.

Per fare dissociare gli immunocomplessi è stato eseguito un processo chiamato decrosslinking.

2.2.26 Decrosslinking

Una volta ottenuti i campioni, è stato ripreso anche l'INPUT dal -80°C e si è eseguito un trattamento con 1 µl di RNase 10 mg/ml e 20 µl di NaCl 5 M per 500 µl di campione nel bagnetto termostato a 65°C over night. In questa fase ogni contaminazione da RNA è stata eliminata.

E' stata eseguita un'incubazione con 1 µl di proteinase K (20 mg/ml), 6 µl di EDTA 0,5 M, TRIS-HCl 1 M a pH 6.5, nel bagnetto a 42°C per 2 h. In questa fase gli anticorpi e gli istoni sono stati degradati.

Sono state eseguite 2 precipitazioni in Fenolo:cloroformio:isoamil alcol (25:24:1) in rapporto 1:1 con il campione (come nell'estrazione del DNA). La fase superiore è sempre stata recuperata dopo una centrifugata di 5 minuti a 13500 rpm ed infine sono stati aggiunti 1/10 di volume di Na acetato 5M (pH5.2), 2 volumi di etanolo e 1 µl di glicogeno carrier (20 mg/ml). Poi i campioni sono stati messi a precipitare nel -20°C over night (vedi estrazione DNA).

Nell'ultima fase i campioni sono stati centrifugati per 1h, il pellet è stato lavato con etanolo 70% ed infine risospeso in 100 µl di H₂O sterile i campioni INPUT e 50 µl tutti gli altri.

2.2.27 REAL TIME PCR

Per eseguire la real time PCR è stato usato il termociclatore della BIO RAD CFX 96 ed il reagente SsoAdvanced SYBR Green Supermix della BIO RAD. Questo reagente è un cocktail di componenti pronto per l'uso, quindi l'operatore deve aggiungere lo stampo, i primers ed H₂O fino al volume desiderato. Per la costituzione della mix è stato seguito il protocollo fornito dalla casa produttrice.

Prima di analizzare tutti i campioni è stato necessario standardizzare i primers, cioè testarli al fine di appurare la loro qualità altrimenti sono stati riprogettati.

2.2.27.1 Standardizzazione dei primers

Sono state preparate le diluizioni di un campione da usare come stampo in questa fase preliminare:

S1: campione puro

S2: dil. 1:4 di S1

S3: dil. 1:4 di S2

S4: dil. 1:4 di S3

S5: dil. 1:4 di S4

S6: H₂O sterile per avere il cosiddetto BIANCO

Dal momento che ogni campione è stato caricato in triplicato, è stato necessario preparare una mix con tutti i reagenti nel seguente modo:

REAGENTI	MIX SINGOLA	MIX PER TRIPLICATO	MIX PER LE DILUIZIONI
SYBR Green 2X	7,5 µl	26,25 µl	170,62 µl
Primer FOR (0,5µM)	0,75 µl	2,62 µl	17,07 µl
Primer REV (0,5µM)	0,75 µl	2,62 µl	17,07 µl
campione	1,5 µl		
H ₂ O sterile	4,5 µl	15,75 µl	102,37 µl
VOLUME FINALE	15 µl	47,25 µl	307,13 µl

È stato necessario prima preparare la mix per le diluizioni in eppendorf da 1,5 ml, poi suddivisa in 6 eppendorf da 0,5 ml in un volume di 47,25 µl a cui è stato aggiunto 5,25 µl di campione. La mix così ottenuta è stata caricata in triplicato su una piastra per real time, poi coperta dall'apposita pellicola e caricata sul termociclatore.

Il programma impostato è stato il seguente:

STEP	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (sec)	CICLI
DENATURAZIONE INIZIALE	95°C	30	1
DENATURAZIONE	95°C	5	40
ANNEALING/ESTENSIONE		30	
CURVA DI MELTING	65-95 (incremento di 0,5)	5	1

Alla fine della corsa è stato utilizzato il software CFX MANAGER per l'analisi dei risultati: quando la fluorescenza di ogni campione supera la soglia di threshold, viene graficato ed alla fine il software ha estrapolato la miglior retta sulla base di tutti i campioni. Per considerare i primers di buon livello, tale retta deve avere un valore di $R^2 \geq 0,98$ ed un valore dell'efficienza del $100\% \pm 10\%$.

Inoltre un altro fattore da considerare vista la aspecificità della molecola intercalante SYBR green, è la curva di Melting che deve mostrare un unico picco.

Dopo aver appurato la bontà dei primers, è stato possibile procedere con l'analisi di REAL TIME PCR.

2.2.27.2 Allestimento della reazione per la REAL TIME PCR

Per eseguire la real time sui campioni, è stato sempre necessario preparare la mix con tutti i reagenti nello stesso metodo usato per il triplicato a cui si è aggiunto l'opportuna quantità di stampo diluito 1:4 rispetto al campione puro per poi procedere alla carica della piastra. Per i campioni ottenuti con la ChIP si usa lo stampo puro.

È importante per unire successivamente i risultati, caricare in ogni piastra dello stesso esperimento anche un calibratore con una coppia di primers che danno sicuramente un amplificato.

Dopo averla coperta con l'apposita pellicola la piastra è stata posizionata nel termociclatore ed è stato impostato il programma descritto sopra.

Il risultato finale è stato ottenuto con l'opzione GENE EXPRESSION che permette di avere un grafico riassuntivo di tutti i dati.

2.2.28 Analisi statistica dei dati ottenuti con la REAL TIME PCR

I dati dei grafici sono stati oggetto di analisi statistica mediante il programma GRAPHPAD che permette di eseguire l'analisi della varianza (ANOVA) ed un Tukey post-test al fine di conoscere la significatività statistica dei risultati ottenuti dall'esperimento di espressione genica.

I dati di REAL TIME ottenuti dalla ChIP, sono stati analizzati in relazione all'INPUT, preso come riferimento utilizzando la formula del $\Delta C(t)$.

2.2.29 Calcolo della concentrazione del DNA e dell'RNA mediante QUBIT

Per stimare la concentrazione di un campione sia che si tratti di DNA che RNA, è stato necessario preparare una mix di un volume finale di 200 μ l contenente 1 μ l di DYE, colorante specifico che lega il campione in questione, 1 μ l di campione e 198 μ l di BUFFER 1X.

Dopo aver acceso lo strumento, è stata selezionata la tipologia di campione da leggere es. DNA, RNA, proteine.

Dopo aver tarato lo strumento usando delle soluzioni standard per avere i range di concentrazione entro cui deve posizionarsi la concentrazione del campione, l'eppendorf contenente il campione di interesse è stata posizionata nell'alloggiamento ed è stata selezionata la quantità di campione presente es. 1µl, poi sul display è stato possibile visualizzare la concentrazione in un'unità di misura a scelta.

2.2.30 Estrazione dei protoplasti da foglie di *Oryza sativa*

Sono state prelevate le foglie da 5 piante di *Oryza sativa* e tagliate con un bisturi sterile ottenendo diversi segmenti. Ad ogni segmento sono stati fatti dei tagli perpendicolari alla direzione delle nervature, adagiandolo su una piastra Petri contenente il buffer costituito da MES 20 mM pH 5.7 il quale è agente tampone usato per mantenere il pH leggermente acido, condizione ottimale per questa procedura, KCl 20 mM, CaCl₂ 10 mM, mannitolo 0,4 M, BSA 0,1%, ed enzimi idrolitici quali Cellulase R10 1,25% e Macerozyme R10 0,3%. Il trasferimento è stato eseguito con l'aiuto di pinze piatte avendo cura di non ferire ulteriormente il frammento foliare e cercando di immergerlo totalmente nella soluzione. Dopo che le foglie sono state tagliate e posizionate nella piastra Petri, la sua superficie è stata coperta con dell'alluminio e posizionata nella pompa da vuoto per 20 minuti al fine di fare penetrare nei tessuti gli enzimi.

La piastra coperta è stata poi trasferita nell'incubatore a 24 °C per 3:30 h assicurandosi che la temperatura venga mantenuta e che il buio sia totale. In questa fase è avvenuta l'azione di degradazione della parete vegetale da parte degli enzimi e la condizione di buio favorisce il distaccamento degli strati più esterni della foglia.

Dopo tale incubazione nella piastra si è formato un medium che deve essere trasferito, attraverso un foglio di carta miracloth, in un tubo falcon. La piastra deve essere ulteriormente lavata con 2 ml di un buffer di lavaggio e di mantenimento così composto: NaCl 154 mM, CaCl₂ 125 mM, KCl 5 mM, MES 2 mM pH 5.7.

Il campione è stato centrifugato a 500 g per 3 minuti essendo estremamente delicato ed il supernatante è stato eliminato. Il pellet, estremamente smuovibile, è stato risospeso con 5 ml di buffer di lavaggio e mantenimento mediante un movimento delicato del tubo falcon.

Il campione è stato centrifugato a 500 g per 3 minuti, eliminando il supernatante ed risospendendo il

pellet in 1,5 ml di buffer di lavaggio e mantenimento.

A questo punto i protoplasti sono stati estratti, infatti è stato possibile osservare la presenza di un pulviscolo nella soluzione. È molto importante utilizzarli entro poche ore dall'estrazione vista la sua delicatezza.

2.2.31 Immunolabeling

I protoplasti estratti e risospesi nel buffer di lavaggio e mantenimento sono stati sottoposti ad una blanda centrifugata per 3 minuti a 700 rpm a temperatura ambiente ed il supernatante è stato eliminato. Il pellet contenente i protoplasti è stato lavato con del PBS 1X e nuovamente sottoposto a centrifugata per 3 minuti per 700 rpm, scartando il supernatante. I protoplasti sono stati incubati con l'anticorpo primario anti-5metil citosina (prodotto in mouse) dil. 1:200 e 1% triton X-100. Tale incubazione è stata protratta over night in movimento sul blocco oscillante.

Al termine dell'incubazione il campione è stato centrifugato per 3 minuti a 700 rpm a temperatura ambiente ed il supernatante è stato scartato. E' seguito un lavaggio in PBS 1X ed un'altra centrifugata a 700 rpm per 3 minuti con scarto del supernatante.

Il campione è stato sottoposto all'incubazione con l'anticorpo secondario goat-anti mouse dil. 1:400 e 1% TritonX-100. Tale anticorpo è coniugato con la FITC e permetterà la visualizzazione dei campioni al microscopio confocale. L'incubazione è stata eseguita a 37°C in movimento per 1 h. Dopo una centrifugata di 3 minuti a 700 rpm, il supernatante è stato scartato ed il pellet è stato lavato con PBS 1X. Questo passaggio è stato ripetuto.

Dopo aver eliminato il supernatante, è stata eseguita un'incubazione con il DAPI 0,2 µg/µl per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo aver nuovamente centrifugato e lavato il pellet, esso è stato risospeso in 20 µl di PBS1X. Il vetrino è stato preparato al momento dell'osservazione al microscopio. I vetrini sono stati visualizzati con un obiettivo 40X. L'analisi delle immagini è stata poi eseguita utilizzando il software IMAGEJ.

2.2.32 Estrazione delle proteine totali dalle foglie di piante di riso

Per eseguire un'analisi di proteomica sulle foglie di *Oryza sativa*, è stata eseguita un'estrazione delle proteine totali utilizzando il protocollo descritto da Zhao *et al.*, 2005. Le foglie sono state finemente pestellate con l'aiuto di un mortaio e pestello in presenza di azoto liquido, quindi è stata prelevata una quantità pari a 500 mg di polvere, utilizzata come materiale di partenza per l'estrazione. In seguito sono è aggiunto il buffer di lisi freddo composto da 10% TCA in acetone, 10

mM DTT (1:4:w/v). Dopo aver mixato bene e a lungo, è stata eseguita un'incubazione a -20°C per 2 h. E' seguita una centrifugata di 13500 rpm per 15 minuti a 4°C ed il pellet contenente le proteine è stato lavato con il buffer di lavaggio freddo composto da: acetone, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 2 mM EDTA. Successivamente è stata eseguita un'altra centrifugata di 15 minuti a 13500 rpm a 4°C, è stato eliminato il supernatante ed il pellet è stato seccato in Savant. A questo punto i campioni sono pronti per la risospensione con il buffer di carica su gel e le successive analisi.

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Acido salicilico

Essendo organismi sessili, le piante hanno evoluto diverse strategie di difesa per far fronte agli stress a cui possono essere sottoposte (Pechinka and Scheid, 2012). Infatti hanno sviluppato un meccanismo di difesa inducibile dai patogeni, chiamato resistenza sistemica acquisita o SAR, il quale è caratterizzato dall'accumulo del fitormone Acido Salicilico, SA (Akagi et al., 2014), tuttavia non è sempre indotto esclusivamente dall'accumulo di tale fitormone (Jung et al., 2009).

Inoltre, analogamente ai monociti e macrofagi presenti nei mammiferi, anche le piante hanno sviluppato la capacità di rispondere rapidamente agli stress. Tale condizione, che rende efficace la risposta di difesa, è chiamata PRIMING o sensibilizzazione (Conrath et al., 2002).

In questi anni numerosi ricercatori hanno cercato di spiegare come avviene questa attivazione parziale o totale delle difese ed ancora oggi il fenomeno non è del tutto chiaro, però sono state avanzate delle ipotesi che contemplano un accumulo di trascritti o di proteine inattive nelle cellule primed che rendono più rapida ed intensa la risposta ad uno stress successivo, favorendo la sopravvivenza (Beckers and Conrath, 2007). In uno studio, Hanan (1992) ha evidenziato che semi di frumento e prezzemolo resi primed utilizzando l'acido salicilico mostravano una spiccata attività antiossidante ed un incremento della tolleranza allo stress. Anche Hamada e Al-Hakimi (2001) hanno potuto osservare una maggiore tolleranza allo stress salino nei semi di frumento in seguito a trattamenti con SA. Nel 2006, Al-Hakimi ha dimostrato gli effetti benefici dell'acido salicilico in piante di soia i cui semi erano stati imbibiti con una soluzione 0,6 M di SA. Tali effetti si esprimevano inibendo gli effetti dello stress (Al-Hakimi, 2006). Inoltre, Daw e colleghi (2008) si sono occupati dello studio degli effetti benefici che SA induce sulla pianta del riso in risposta ad infezioni fungine, infatti dal loro studio emerge che la severità della malattia ed i suoi effetti sulla pianta sono molto attenuati se tali piante venivano sottoposte a dei trattamenti utilizzando delle soluzioni di acido salicilico, 5-10 mM.

Anche in questa tesi si è cercato di analizzare gli effetti benefici di tale fitormone, utilizzandolo per dei trattamenti al fine di incrementare la difesa delle piante inducendo il priming.

Dopo un pretrattamento di *Oryza sativa* con SA è stata eseguita l'analisi di espressione genica per individuare quali potessero essere i geni coinvolti nel meccanismo del priming indotti in riso. L'attenzione è stata posta sui geni che da letteratura risultavano essere comunemente indotti da

stress di natura biotica. Dopo un'attenta ricerca bibliografica sono stati selezionati geni appartenenti a diverse famiglie e codificanti per proteine con diversi ruoli nella risposta agli stress al fine di avere una panoramica finale più completa ed esaustiva. Tra questi geni figurano diverse famiglie di fattori di trascrizione:

- WRKY53: gene che codifica per una proteina appartenente alla famiglia WRKY con responsività all'elicitore oligosaccaridico, chitina. Il fattore di trascrizione WRKY codificato da tale gene appartiene al gruppo I in quanto mostra 2 motivi WRKY caratteristici ed uno Zn-finger caratterizzato dalla struttura C2-H2 (Chujo et al., 2009). Chujo e colleghi nel 2009 hanno dimostrato che sospensioni cellulari di *Oryza sativa* incrementano repentinamente l'espressione di tale gene in seguito a trattamenti con elicitori. La proteina tradotta agisce come fattore di trascrizione, tuttavia il meccanismo molecolare che porta alla sua espressione non è ancora chiaro.
- WRKY71: gene che codifica per un fattore di trascrizione della famiglia WRKY appartenente al gruppo II in quanto mostra avere nella sua sequenza un solo dominio WRKY caratteristico ed uno Zn-finger con struttura C2-H2. Chujo e colleghi nel 2008 hanno dimostrato che WRKY71 agisce come repressore trascrizionale anche se studi eseguiti utilizzando i microarray hanno dimostrato che la over espressione di questo gene porta ad una up-regolazione di alcuni geni coinvolti nei meccanismi di difesa in risposta a patogeni fungini. Questi geni up-regolati sono stati identificati come chitinasi, perossidasi e PR5.
- WRKY76: gene che codifica per il fattore di trascrizione WRKY 76, appartenente al gruppo II della famiglia WRKY con un solo dominio caratteristico e uno Zn-finger avente struttura C2-H2 (Ross et al., 2007).
- WRKY62: gene che codifica per il fattore di trascrizione WRKY 62 appartenente al gruppo II della superfamiglia WRKY, quindi con un solo dominio caratteristico ed uno Zn-finger con struttura C2-H2 (Ross et al., 2007).
- JAMYB: gene individuato per la prima volta da Lee e colleghi nel 2001 che codifica per un fattore di trascrizione della famiglia MYB responsivo a trattamenti con il fitormone Jasmonato ed a ferita. Inoltre la sua espressione può essere indotta da interazioni compatibili

e non con ospiti fungini (Lee et al., 2001).

- NAC4: gene codificante per un fattore di trascrizione della famiglia NAC, coinvolto nella morte cellulare che si attua nella risposta di ipersensibilità (Kaneda et al., 2009). Tale proteina appartenente al gruppo I della famiglia NAC ed al sottogruppo 3 (Kanda et al., 2009). Non è coinvolta solamente nella morte cellulare ma anche in numerosi meccanismi della pianta, tra cui la difesa (Ross et al., 2007), lo sviluppo, la crescita (Kim et al., 2006) e la rigenerazione (Kaneda et al., 2009).
- ERF: gene che codifica per il fattore di trascrizione ERF922 incluso da Nagano e colleghi (2006) nel gruppo IX della superfamiglia AP2/ERF. Agisce direttamente come attivatore trascrizionale poiché riconosce e lega le GCC-box di geni coinvolti nella difesa (Liu et al., 2012). Sembra essere coinvolto nel pathway di ABA, ma agisce anche da mediatore tra i networks indotti da stress biotici ed abiotici mediante un meccanismo non ancora delucidato (Liu et al., 2012).

Inoltre è stata oggetto di studio l'espressione dei geni codificanti per proteine PR, coinvolte nella risposta di difesa:

- PR1a: gene che codifica per la proteina PR1 acida, appartenente al gruppo 1 delle proteine Pathogenesis Related (PR) caratterizzate da attività antifungina. Essendo coinvolta nel meccanismo di difesa a stress biotici, è perciò da considerarsi un ottimo marker del pathway del salicilico e quindi della SAR (Mitsuhara et al., 2008; Agrawal et al., 2001).
- PR1b: gene codificante per la proteina PR1 basica. Essa fa parte dello stesso gruppo di PR1a e risponde ai medesimi stimoli. Si può considerare un marker del pathway del salicilico e della SAR (Agrawal et al., 2001).
- PR4a: gene che codifica per la proteina Pathogenesis Related 4 acida (PR4a) appartenente alla classe della proteina PR4 caratterizzate da una spiccata attività antifungina anche se i membri di questa famiglia hanno ruoli importanti nelle interazioni compatibili ed incompatibili con ospiti fungini, nell'induzione in seguito a trattamento con fitormoni (Agrawal et al., 2003), ma anche in molti processi della vita della pianta (Kragh et al., 1996).

- PR4b: gene che codifica per la proteina Pathogenesis Related 4 basica (PR4b) appartenente alla stessa classe di PR4a e con le stesse caratteristiche funzionali (Wang et al., 2011).

Un'altra classe genica analizzata è quella dei trasduttori del segnale i quali trasferiscono il segnale a livello intracellulare:

- MAPK5: gene appartenente al gruppo A delle proteine chinasi attivate da mitogeno (MAPK) (Agrawal et al., 2002). Questo gene è stato individuato per la prima volta da Song e Goodman nel 2002 ed analisi genetiche hanno rivelato il suo coinvolgimento nelle risposte in seguito a trattamenti con induttori chimici e biologici. Esso codifica per un trasduttore intracellulare attivato in seguito a stress e che a sua volta attiva altre vie di segnalazione con dei meccanismi ancora non noti (Song and Goodman, 2002).
- NH1: gene omologo di NPR1 da *Arabidopsis thaliana*. Esso codifica per una proteina che regola la via di segnalazione innescata dal SA al fine di attivare dei fattori di trascrizione della famiglia TGA che favoriscano l'espressione dei geni di difesa nella SAR (Chern et al., 2012). La sua over espressione porta la pianta ad essere più responsiva verso i patogeni (Chern et al., 2012).

Infine sono stati oggetto di analisi anche alcuni geni codificanti per enzimi di difesa:

- CHITINASI: gene codificante per una endochitinasi coinvolta nei meccanismi di difesa contro patogeni fungini che risulta essere molto indotto in seguito a trattamento con SA ed ET. Tale enzima ha la funzione di formare nuovi elicitori, come gli N-acetil-oligosaccaridi partendo dalla parete fungina al fine di incrementare le risposte di difesa della pianta (Truong et al., 2003).
- lipo-ossigenasi (LOX): gene che codifica per un enzima che generalmente mostra il picco di espressione in seguito ad infezione fungina. Inoltre induce i pathways delle chitinasi e perossidasi al fine di instaurare una difesa adeguata (Schaffrath et al., 2000).
- BISAMT: gene che codifica per una metil transferasi appartenente alla famiglia delle Metil-

Transferasi dell'Acido Salicilico (SAMT), la quale trasferisce un gruppo metile dal donatore S-adenosyl-L-metionina al gruppo carbossilico dell'acido salicilico al fine di ottenere del metil-salicilato (Xu et al., 2005). Come altre molecole volatili, il metil estere risulta essere un composto secondario che la pianta rilascia in seguito a danni tissutali provocati da infezioni fungine o dalla masticazione degli insetti (Xu et al., 2005). La sua espressione viene indotta in seguito a trattamento con BTH, SA ed induttori chimici della SAR ma inaspettatamente il BTH induce delle risposte più precoci rispetto al trattamento con SA (Xu et al., 2005). Inoltre Xu e colleghi hanno anche dimostrato che l'induzione di questo gene è più rapida in seguito ad interazioni incompatibili con *M. grisea* rispetto a quelle compatibili. Inoltre è anche indotto dalla ferita che mima il danno prodotto da insetti poiché essa può essere la diretta conseguenza della presenza di insetti masticatori e funghi patogeni in seguito al quale avviene la produzione di composti volatili nella pianta (Xu et al., 2005);

E' stato analizzato anche l'andamento di un gene coinvolto nei primi momenti della difesa:

- CEBIP: gene che codifica per una proteina che riconosce e lega l'oligosaccaride chitina (Chitin Elicitor Binding Protein) studiata da Kaku e colleghi nel 2006, i quali dimostrarono la sua attivazione in seguito ad interazioni con patogeni e il suo coinvolgimento nell'attivare delle vie di segnalazione culminanti nell'induzione della difesa. Dal punto di vista strutturale, questa proteina ha dei domini transmembrana ma non possiede domini intracellulari, quindi è stato ipotizzato da Kaku e colleghi, che possa essere parte di un complesso proteico coinvolto nella trasduzione del segnale, che però ancora non è stato caratterizzato fino ad ora.

Come controllo interno è stato utilizzato il gene housekeeping codificante per l'actina. Tale gene è stato scelto come riferimento nell'analisi di RT-PCR poiché mostra un andamento costante nelle varie parti della pianta e nei vari stadi di crescita.

3.1.2 Analisi di espressione su piante

I semi di riso sono stati sottoposti ad un processo di sterilizzazione non aggressiva al fine di eliminare le muffe ed i microrganismi presenti sul rivestimento esterno mediante un lavaggio con H₂O₂ 10% e successivamente con EtOH 70%. In seguito ad alcuni risciacqui con acqua sterile i semi sono stati fatti imbibire in acqua over night; successivamente sono stati trasferiti in piastre

Petri sul cui fondo era stata posta della carta da filtro bagnata con acqua sterile e posti a 37°C per due giorni al fine di favorire la germinazione. Infine i coleptili germogliati sono stati trasferiti su appositi vassoi alveolari e fatti crescere per settimane in soluzione idroponica in una camera di crescita fino al loro trattamento. Tale trattamento è stato eseguito spruzzando sulla metà delle piante acido salicilico ad una concentrazione di 300 µM e 3 giorni dopo è stata eseguita l'infezione sulla metà delle piante. Quindi, in tutto erano presenti quattro condizioni sperimentali: piante di controllo (C), le quali non hanno subito alcun trattamento; piante infettate con *Fusarium culmorum* (F.c.), in cui l'infezione è stata eseguita appoggiando dei dischetti di terreno su cui è stato fatto crescere il fungo; piante che hanno subito esclusivamente il pre-trattamento con acido salicilico 300 µM (SA); piante che sono state pre-trattate con acido salicilico e poi infettate (SA+F.c.).

Per eseguire l'analisi di espressione genica, è stato estratto l'RNA dai campioni fogliari dalle piante a 48 ore dopo infezione (hours post infection: hpi) con *Fusarium culmorum*. La quantità e la qualità dell'RNA è stata verificata mediante letture spettrofotometriche a 260 nm e 260/280 nm, rispettivamente.

L'assenza di DNA contaminante è stata confermata mediante una PCR utilizzando primers specifici per il gene housekeeping actina e dopo aver verificato l'assenza di amplificato, è stata effettuata una retrotrascrizione utilizzando 1µg di RNA da ciascun campione.

La quantità di cDNA da usare come stampo nelle successive reazioni di PCR è stata normalizzata eseguendo delle reazioni di PCR con i primers per il gene housekeeping (actina). Il risultato dell'RT-PCR è riportato di seguito (FIG.34).

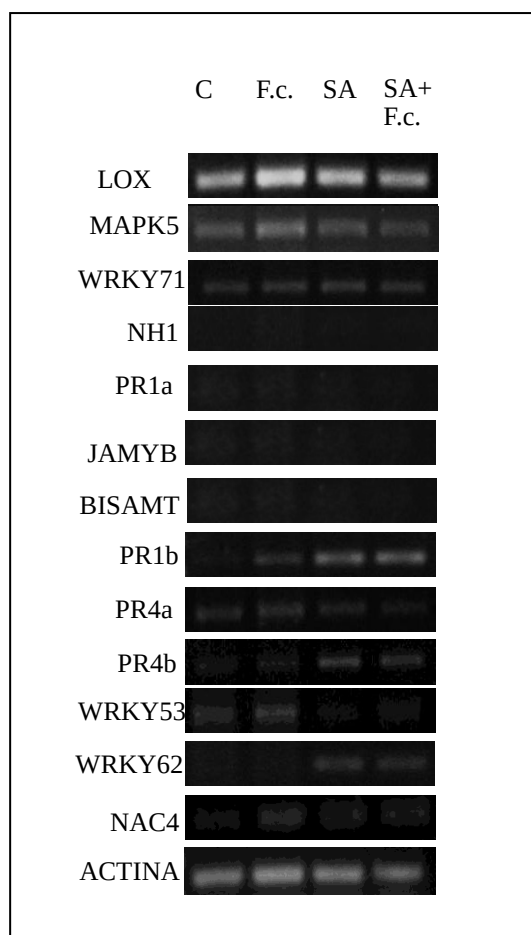


FIG.34. ANALISI DI RT-PCR CONDOTTE SU PIANTE DI ORYZA SATIVA DI 4 SETTIMANE. C= controllo; F.c.= infezione con disco di agar su cui era stato fatto crescere *Fusarium culmorum*; SA= trattamento spray con 300 μ M di SA; SA+F.c.= trattamento spray con 300 μ M di SA e infezione con disco di agar su cui era stato fatto crescere *Fusarium culmorum*. Geni analizzati: LOX, lipo-ossigenasi; MAPK5, proteina chinasi attivata da mitogeno 5; WRKY71, fattore di trascrizione della famiglia WRKY; NH1, omologo del gene NPR1; PR1a, proteina pathogenesis related 1a; JAMYB, fattore di trascrizione della famiglia MYB responsivo a JA; BISAMT, metil transferasi della famiglia SAMT; PR1b, proteina pathogenesis related 1b; PR4a, proteina pathogenesis related 4a; PR4b, proteina pathogenesis related 4b; WRKY53, fattore di trascrizione della famiglia WRKY; WRKY62, fattore di trascrizione della famiglia WRKY; NAC4, fattore di trascrizione della famiglia NAC. I cDNA sono stati standardizzati utilizzando l'ACTINA come standard interno.

Questa prima analisi preliminare ha permesso di evidenziare una risposta di alcuni geni al solo trattamento con salicilico. Tali geni sono PR1b, PR4a, PR4b, WRKY53, WRKY62 e NAC4, nei quali si evidenzia un aumento di espressione genica in seguito a trattamento con acido salicilico (SA) ma non in seguito ad infezione con *Fusarium culmorum* (F.c.). Inoltre, il trattamento combinato (SA+F.c.) induce un livello di espressione genica paragonabile a quello indotto dal solo

trattamento con acido salicilico. Tutto ciò porta a concludere che tale trattamento (SA 300 μ M) provoca un vero e proprio stress nella pianta e si rende necessario abbassare la concentrazione del trattamento al fine di trovare la concentrazione ottimale per indurre il priming che si configura come un pre-stress tale da non indurre un'attivazione completa del sistema di difesa, ma piuttosto determinare una preparazione delle risposte di difesa mediante l'accumulo di trascritti codificanti per proteine coinvolte nella difesa oppure l'accumulo delle proteine tradotte ma in uno stato inattivo (Tanou et al., 2012; Conrath, 2011). Per abbreviare i tempi sperimentali si è deciso di eseguire i successivi esperimenti su piante più giovani, i coleoptili.

3.1.3 Analisi di espressione su coleoptili

I semi di riso sono stati sterilizzati con H₂O₂ 10%, EtOH70% ed imbibiti over night in acqua sterile. Dopo due giorni di incubazione a 37°C, necessaria per favorire la germinazione, i coleoptili sono stati trasferiti sterilmente in vaschette contenenti agar, dopodichè le vaschette sono state sigillate per evitare la contaminazioni da muffe. Le vaschette con le piantine sono state trasferite in camera di crescita per 6 giorni. Il trattamento con acido salicilico è stato eseguito mediante immersione dei coleoptili per 5 secondi in una soluzione di acido salicilico ad una concentrazione di 100 μ M. Successivamente le vaschette sono state nuovamente sigillate e rimesse in cella per altri due giorni. I coleoptili di 8 giorni sono stati dunque infettati con delle spore di *Fusarium culmorum* ad una concentrazione di $3 \cdot 10^5$ spore/ml pipettate direttamente sul culmo della pianta. Quindi sono stati prelevati dei campioni fogliari sia prima dell'infezione che a 24-48-72h dall'infezione da cui è stato estratto l'RNA che è stato successivamente retrotrascritto. L'analisi di PCR semiquantitativa non ha portato risultati interessanti poiché i campioni non mostravano avere un pattern di espressione associabile al priming in quanto non è presente una variazione di intensità di espressione tra i vari campioni nonostante essi abbiano ricevuto trattamenti diversi. Dunque la tecnica dell'immersione utilizzata per indurre il priming in questo caso non è appropriata, inoltre anche l'infezione fungina eseguita pipettando direttamente le spore sul culmo non ha effetti sul coleoptile.

Quindi è stata allestita una nuova semina in cui i semi, dopo essere stati sterilizzati con H₂O₂ 10% e EtOH 70%, sono stati sottoposti ad un processo di osmopriming, cioè facendo imbibire i semi anziché in acqua, in una soluzione di salicilico 100 μ M per due ore. Successivamente è stato seguito il classico metodo della germinazione in piastre Petri a 37°C con successivo trasferimento in vaschette di agar. I coleoptili di 4 giorni sono stati infettati con 119000 spore di *Fusarium*

culmorum, e prelevati a 24-48-72 hpi. L'analisi semiquantitativa (FIG. 35) di questi campioni ha fatto emergere per alcuni geni un pattern di espressione differenziale compatibile con il priming in quanto i campioni doppio trattati (SA+ F.c) mostrano un livello di espressione maggiore rispetto sia ai campioni che hanno subito solo il pretrattamento con acido salicilico (SA), sia ai campioni che sono stati infettati con *Fusarium culmorum* (F.c.).

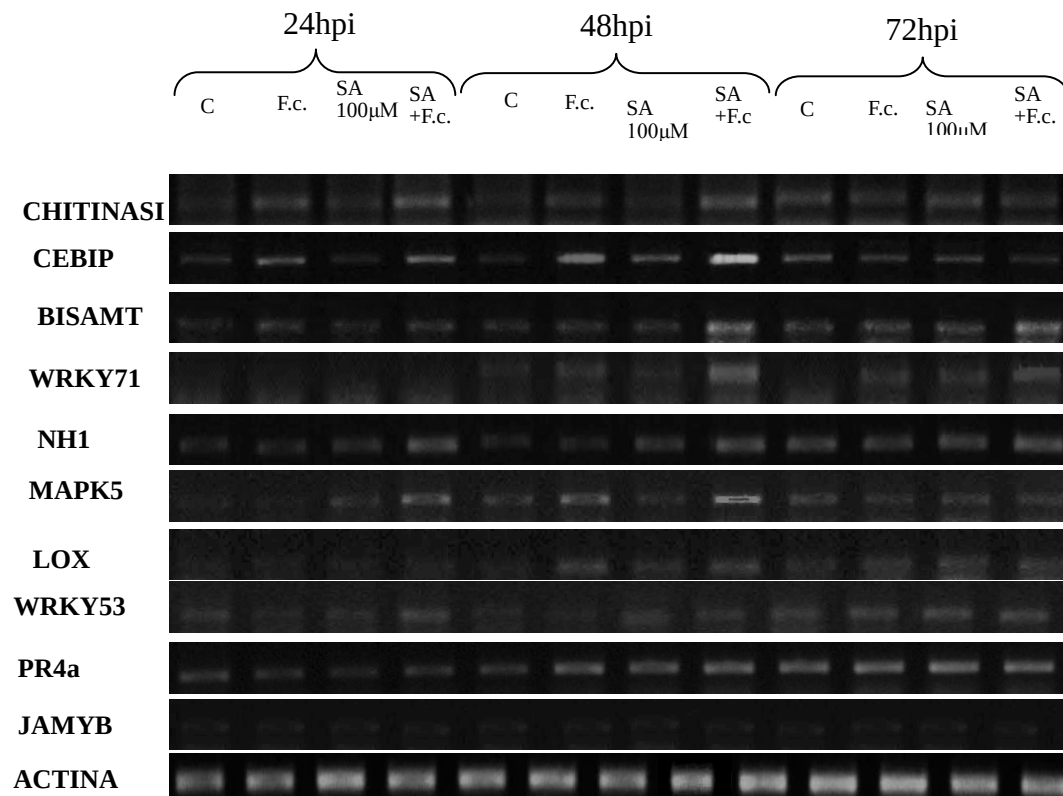


FIG.35. ANALISI DI RT-PCR SU COLEOPTILI DI 8 GIORNI. C= controllo; F.c.= infezione con spore di *Fusarium culmorum* (5×10^6 spore/ml); SA= trattamento spray con $300 \mu\text{M}$ di SA; SA+F.c.= trattamento spray con $100 \mu\text{M}$ di SA e infezione con spore di *Fusarium culmorum* ($5 \cdot 10^6$ spore/ml). Geni analizzati: CHITINASI, enzima che degrada la chitina; CEBIP, proteina di membrana che lega la chitina; BISAMT, metil transferasi della famiglia SAMT; WRKY71, fattore di trascrizione della famiglia SAMT; NH1, omologo di NPR1 da *Arabidopsis thaliana*; MAPK5, proteina chinasi attivata da mitogeno 5; LOX, lipo-ossigenasi; WRKY53, fattore di trascrizione della famiglia WRKY; PR4a, proteina pathogenesis related 4a; JAMYB, fattore di trascrizione della famiglia MYB indotto da jasmonato. I cDNA sono stati standardizzati utilizzando l'ACTINA come standard interno.

Sulla base di questi risultati è possibile concludere che geni come CHITINASI, CEBIP, MAPK5 e NH1 mostrano un effetto priming a 24 hpi e/o a 48 hpi, mentre tale effetto tende a diminuire a 72 hpi che è in linea con il fatto che il priming innesca una risposta precoce, rapida ed intensa. I geni

BISAMT e WRKY 71 mostrano avere invece un andamento compatibile con il priming a 48/72 hpi. Tutti questi geni risultano da letteratura essere coinvolti nel pathway del salicilico il quale viene innescato durante l'induzione del priming indotto con basse concentrazioni dello stesso (100 μ M). In seguito, tale pathway induce l'attivazione della SAR. Quindi, i geni analizzati in questo studio permettono di ricostruire un ipotetico pathway di trasduzione del segnale innescato dallo stress biotico. Infatti il gene CEBIP codifica per una proteina recettrice di membrana la quale riconosce e lega molecole associate al patogeno (Kaku et al., 2006), quindi è plausibile pensare che la sua espressione è stata notevolmente incrementata nella condizione di priming indotto con acido salicilico prima e con l'infezione dopo. Il gene CHITINASI codifica per una proteina coinvolta nella risposta contro i patogeni fungini (Truong et al., 2003), quindi il priming rende tale gene maggiormente espresso in modo da potenziare la difesa. Il gene codificante per la MAPK5 risulta in queste condizioni essere maggiormente espresso poiché la proteina codificata è un trasduttore del segnale coinvolto nel pathway di difesa del SA (Song and Goodman, 2002). Anche il gene codificante per NH1 risulta essere notevolmente espresso nella condizione di priming. Esso infatti è una molecola chiave nel pathway del SA che porta all'attivazione di fattori di trascrizione e quindi anche di geni di difesa (Chern et al., 2012). Il gene codificante per BISAMT ha un andamento compatibile con il priming e ciò è in accordo con il fatto che tale gene viene espresso in seguito ad interazioni fungine incompatibili come meccanismo di difesa per indurre l'attivazione della SAR (Xu et al., 2005). Un ultimo gene che risulta avere un pattern di espressione compatibile con il priming è WRKY 71 codificante per l'omonimo fattore di trascrizione, il quale viene attivato come risultato finale dell'attivazione del pathway del SA, inducendo così l'espressione dei geni di difesa (Chujo et al., 2008). Il pathway ipotetico che si potrebbe innescare sulla base delle funzioni delle proteine codificate dai geni presi in analisi, vedrebbe l'enzima chitinasi degradare la parete dei patogeni fungini, liberando molecole di chitina la quale viene riconosciuta dal recettore di membrana codificato dal gene CEBIP. Tale recettore attiva a valle una cascata di segnalazione che può coinvolgere vari trasduttori del segnale come MAPK5 e NH1. La cascata di segnalazione raggiunge il nucleo attivando varie famiglie di fattori di trascrizione, tra cui la famiglia WRKY la quale a sua volta induce l'espressione dei geni correlati alla difesa tra cui è possibile individuare il gene codificante per BISAMT.

Sulla base di questi risultati è possibile affermare che il priming innesca una difesa molto più potente rispetto ai classici meccanismi di difesa della pianta, permettendone un'attivazione su vari livelli, incrementando l'espressione dei geni codificanti per proteine coinvolte nella difesa, recettori, trasduttori, molecole segnale, fattori di trascrizione. Tutto ciò si traduce in una maggiore possibilità di sopravvivenza della pianta in risposta allo stress.

Nel nostro studio, geni come LOX, WRKY 53 e PR4a non sembrano essere coinvolti in tale meccanismo di difesa nonostante in letteratura emergesse un loro ruolo nella difesa in seguito a stress biotici o a trattamento con acido salicilico (Schaffrath *et al.*, 2000; Chujo *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Non deve invece stupire l'assenza di espressione del gene JAMYB il quale è coinvolto nel pathway di segnalazione del jasmonato e che è stato selezionato come un controllo negativo dell'esperimento.

3.1.4 Effetti fisiologici del SA sulla crescita

Durante questi esperimenti è stato possibile notare anche un effetto fisiologico del salicilico sulla crescita dei coleoptili. Infatti essi sembrano essere più tardivi nello sviluppo nei primi giorni di vita rispetto ai semi imbibiti solo con acqua (FIG.36), anche se con il passare dei giorni le differenze di dimensione si attenuano fino a scomparire del tutto.

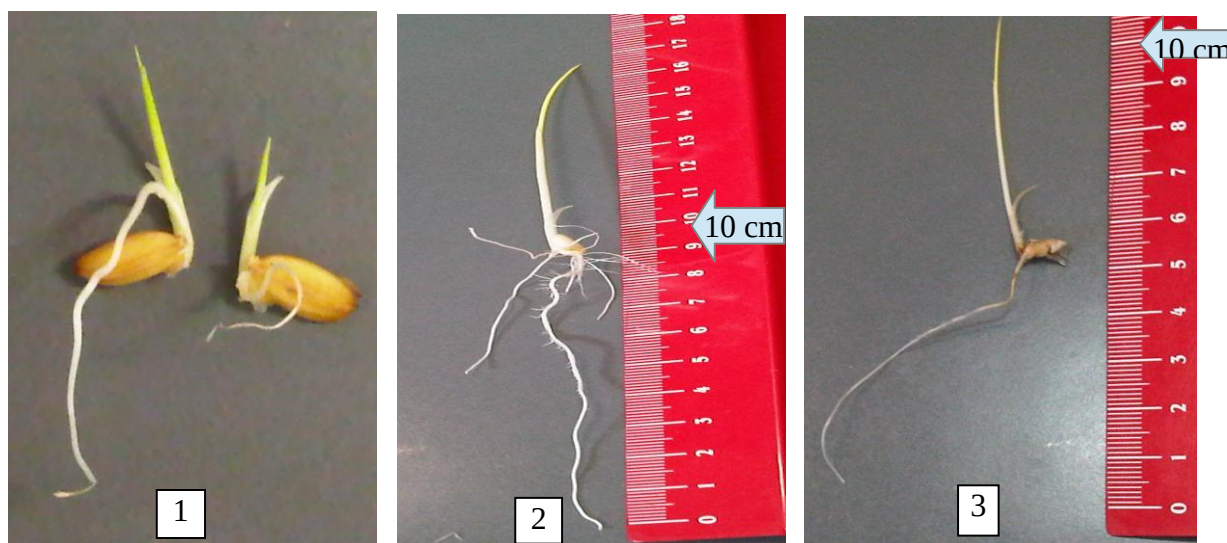


FIG.36. EFFETTI DEL SA SULLA CRESCITA. 1: coleoptile imbibito in acqua (sinistra) e coleoptile imbibito con SA (destra). 2: dimensione dei coleptili imbibiti con acqua. 3: dimensione dei coleptili imbibiti con SA.

3.1.5 Rilevazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)

L'acido salicilico è noto anche per indurre delle risposte che culminano in una produzione di specie reattive dell'ossigeno, come per esempio la risposta di ipersensibilità. Perciò è stata verificata la relazione tra trattamento con acido salicilico e conseguente produzione di ROS. Piante di quattro

settimane cresciute in coltura idroponica sono state sottoposte a trattamenti spray utilizzando due differenti concentrazioni di SA: 100 μ M così da indurre in priming e 5 mM, concentrazione a cui si induce lo stress; piante di controllo sono state spruzzate invece con acqua sterile. A distanza di 24 h dopo il trattamento spray, le piante (tranne quelle di controllo) sono state infiltrate utilizzando dei lipooligosaccaridi (LOS) ad una concentrazione di 50 μ g/ml per mimare l'infezione batterica. I campioni fogliari sono stati sottoposti ad un trattamento di colorazione utilizzando la 2,7 diclorofluoresceina diacetato (2,7 DCFH₂-DA). Tale molecola penetra nella cellula dove subisce una deacetilazione in seguito all'azione di esterasi e successivamente viene ossidata dall'H₂O₂ per ottenere la 2,7 diclorofluoresceina (2,7 DCF), molecola fluorescente eccitabile a 488 nm. La sua emissione è visualizzabile nel verde (502/540 nm).

Per la rilevazione sono stati preparati in totale 6 campioni, prelevati 24 ore dopo aver eseguito l'infiltrazione: controllo trattato con acqua, campione trattato con acido salicilico ad una concentrazione di 100 μ M ed un altro trattato alla concentrazione di 5 mM. Entrambi questi ultimi campioni sono stati poi infiltrati e successivamente colorati con la molecola 2,7 DCFH₂-DA. Di ogni campione è stato preparato anche il corrispondente campione negativo non colorato. Le immagini sottostanti (FIG. 37) mostrano i risultati di questo esperimento in cui oltre all'emissione della 2,7 DCFH₂-DA, è stata rilevata anche l'emissione della clorofilla ad una lunghezza d'onda di 680 nm (autofluorescenza).

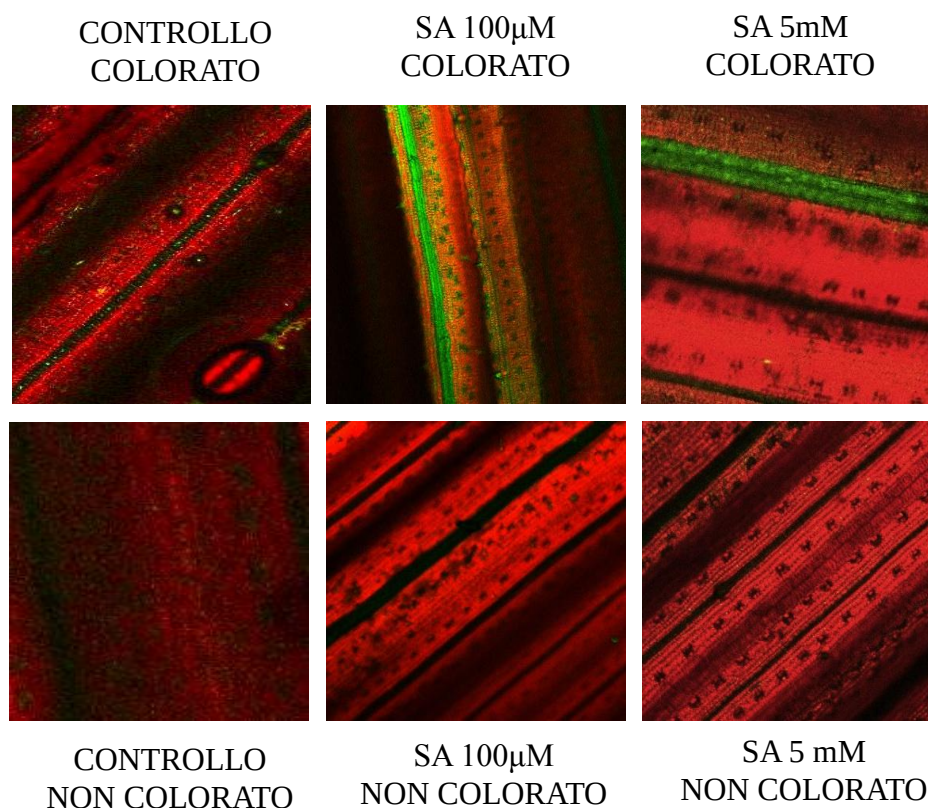


FIG.37. VISUALIZZAZIONE AL MICROSCOPIO CONFOCALE DELLE SEZIONI FOGLIARI. CONTROLLO COLORATO: campione infiltrato con acqua sterile e trattato con 2,7 DCFH2-DA. CONTROLLO NON COLORATO: campione infiltrato con acqua sterile e non trattato con 2,7 DCFH2-DA. SA 100 µM COLORATO: campione pre-trattato con acido salicilico (100 µM), infiltrato con LOS e trattato con 2,7 DCFH2-DA. SA 100 µM NON COLORATO: campione pre-trattato con acido salicilico (100 µM), infiltrato con LOS e non trattato con 2,7 DCFH2-DA. SA 5mM COLORATO: campione pre-trattato con acido salicilico (5 mM), infiltrato con LOS e trattato con 2,7 DCFH2-DA. SA 5mM NON COLORATO: campione pre-trattato con acido salicilico (5 mM), infiltrato con LOS e non trattato con 2,7 DCFH2-DA.

Come è possibile osservare nella Fig. 37, nei campioni non colorati è visibile esclusivamente la presenza della clorofilla, mentre l'emissione nel verde non è presente poiché non essendo prodotte le specie reattive dell'ossigeno (ROS), non si innescano le reazioni che portano alla formazione della 2,7 DCF. È possibile osservare una colorazione verde nei campioni colorati compreso il controllo. Questa condizione si spiega perché la pianta del riso mostra avere un elevato accumulo di SA endogeno (Chen et al., 1997; Silverman et al., 1995; Ganesan and Thomas, 2000) e quindi è possibile che ci sia una lieve ma costante presenza di bassi livelli di H_2O_2 . Tuttavia è possibile individuare un'intensa colorazione nel verde sia nei campioni trattati con SA100µM, concentrazione a cui si instaura il priming, ma anche con SA 5 mM, concentrazione a cui si induce lo stress. Sembra essere presente una maggiore fluorescenza verde nei campioni pretrattati con acido salicilico 100µM (SA 100µM) e successivamente infiltrati con LOS e ciò è plausibile perché il pretrattamento ha incrementato i meccanismi di difesa della pianta che sono culminati in seguito

all'infiltrazione che costituisce lo stress vero e proprio. In questo caso si ha la reazione di una pianta primed. Nei campioni pretrattati con acido salicilico a concentrazione di 5 mM, è stato indotto un vero e proprio stress a cui se ne aggiunge un altro, l'infiltrazione con i LOS. La difesa finale della pianta induce la produzione di specie reattive dell'ossigeno, ma in minore quantità rispetto alle piante primed. In particolar modo, mentre nel campione primed (SA 100 μ M), poi stressato con i LOS si genera una risposta in parte già innescata dal pretrattamento con acido salicilico, nel campione trattato con acido salicilico ad una concentrazione tale da indurre lo stress (SA 5mM), si ha probabilmente l'attivazione completa della difesa in risposta a tale trattamento a cui segue un'altra risposta di difesa in seguito ad infiltrazione con i LOS. Quindi potrebbero avvenire nella pianta due risposte di difesa indipendenti, quindi meno intense. Tutto ciò fa comprendere l'importanza della concentrazione da utilizzare per indurre il priming, altrimenti non può avvenire la preparazione della pianta allo stress, bensì all'attivazione di una risposta di difesa.

Sulla base di tutto ciò non solo è possibile affermare che il SA induce accumulo dei ROS e nello specifico di H₂O₂, ma anche che il pretrattamento associato ad infiltrazione favorisce ugualmente accumulo di H₂O₂, ma in tempi più precoci.

3.1.6 Conclusione

In *Oryza sativa* l'acido salicilico riveste un ruolo fondamentale nella difesa poiché è la molecola chiave di un pathway che permette una risposta adeguata agli stress di natura biotica, inoltre è da considerarsi un ottimo induttore di priming poiché utilizzandolo nei pretrattamenti su piante giovani è possibile incrementare il loro meccanismo di difesa al fine di avere una risposta più rapida ed efficace nel momento in cui entreranno in contatto con lo stress, favorendo la loro sopravvivenza.

3.2 Acido jasmonico

Lo scopo della seconda parte di questa tesi è stato l'induzione del priming per mezzo di un altro fitormone vegetale avente un ruolo cruciale nella difesa, l'acido jasmonico (JA), utilizzando sempre come pianta modello la monocotiledone *Oryza sativa*. L'acido jasmonico viene sintetizzato mediante il pathway dei lipidi ottodecanoidi, simile al pathway degli eicosanoidi dei mammiferi, (Rakwal et al., 2002). Tale pathway (FIG. 38) vede come molecola di partenza l'acido linolenico il quale subisce l'azione di una lipossigenasi per dare l'acido 13-idroperossilinenico, substrato dell'allene ossido sintasi per ottenere l'acido 12,13-epossi-ottadecatrienoico. Tale acido funge da substrato per la reazione successiva ad opera dell'allene ossido ciclastasi per ottenere il ciclopentenone o acido 12-osso-fitodienoico (OPDA) il quale viene ridotto dalla 12-osso-PDA reductasi in 10,11-diidro-PDA. In seguito alla β -ossidazione si ottiene l'acido jasmonico ed il relativo metil-estere, il metil-jasmonato (Me-JA) (Tao et al., 2003). Sia l'OPDA, il precursore dell'acido jasmonico, che l'acido jasmonico stesso sono delle molecole che portano all'espressione di geni codificanti per proteine coinvolte nella difesa (Reymond et al., 1998; Weber, 2002; Rakwal et al., 2002).

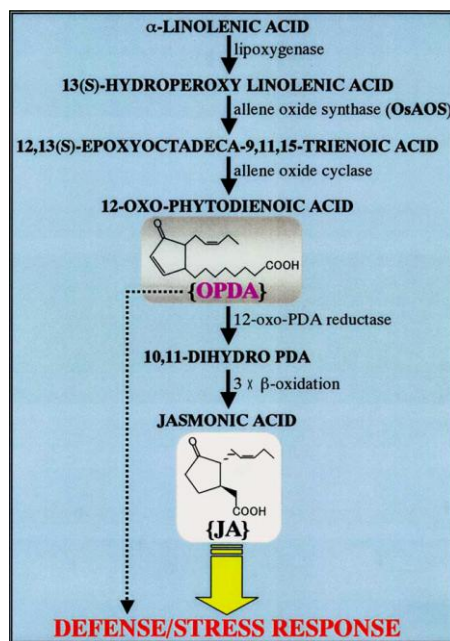


FIG.38. Biosintesi del Jasmonato.

Tale fitormone è noto in quanto molecola centrale di un pathway che può far sviluppare delle risposte di difesa sia dirette che indirette verso gli stress di natura abiotica (Lou et al., 2005; Schmeltz et al., 2003). Nella pianta selvatica di tabacco, l'applicazione esogena del metil-jasmonato, induce il rilascio di composti volatili (Halitschke et al., 2000), i quali sono tossici per gli erbivori. Inoltre, una soppressione dell'espressione del gene codificante per la lipossigenasi coinvolta nella biosintesi del JA, generalmente responsiva a ferita ed attacco di erbivori, induce un minore rilascio di sostanze volatili, rendendo la pianta più suscettibile allo stress (Halitschke and Baldwin, 2003; Lou et al., 2005). L'applicazione esogena di JA in piante di riso induce l'espressione di inibitori di proteasi, proteine PR, fitoalessine (Tamogamia et al., 1997; Rakwal and Komatsu, 2000; Rakwal et al., 2001; Kim et al., 2003).

In questo lavoro di tesi sono state condotte delle analisi di RT-PCR semiquantitativa e di qPCR su specifici geni, per valutare l'effetto dell'applicazione esogena del jasmonato sull'induzione del fenomeno del priming nel riso.

Dopo aver eseguito un'approfondita ricerca bibliografica, l'attenzione è stata posta sull'analisi dell'espressione genica di geni comunemente noti in letteratura per essere indotti in seguito a ferita e, in quanto tali, possibilmente indotti dal JA.

Al fine di poter ipotizzare una via di segnalazione che, a partire dal JA, porti all'attivazione dell'espressione di geni di difesa, sono state prese in considerazione varie classi di geni fra cui quelli codificanti per fattori di trascrizione, per trasduttori del segnale intracellulare e per proteine di difesa, come indicato nel sottostante elenco.

Gene codificante per il fattore di trascrizione:

- JAMYB: gene individuato per la prima volta da Lee e colleghi nel 2001, che codifica per un fattore di trascrizione della famiglia MYB responsivo a trattamenti con il fitormone Jasmonato ed a ferita. Inoltre la sua espressione può essere indotta sia da interazioni compatibili in cui il patogeno fungino colonizza l'ospite che incompatibili in cui il patogeno fungino non colonizza l'ospite (Lee et al., 2001).

Geni codificanti per trasduttori del segnale intracellulare:

- MAPK5: gene appartenente al gruppo A delle proteine chinasi attivate da mitogeno (MAPK) (Agrawal et al., 2002). Questo gene è stato individuato per la prima volta da Song e Goodman nel 2002 ed analisi genetiche hanno rivelato il suo coinvolgimento nelle risposte in seguito a trattamenti con induttori chimici e biologici. Esso codifica per un trasduttore intracellulare

attivato in seguito a stress e che a sua volta attiva altre vie di segnalazione con dei meccanismi ancora non noti (Song and Goodman, 2002).

- NH1: gene omologo di NPR1 da *Arabidopsis thaliana*. Esso codifica per una proteina che regola la via di segnalazione innescata dal SA al fine di attivare dei fattori di trascrizione della famiglia TGA che favoriscano l'espressione dei geni di difesa nella SAR (Chern et al., 2012). La sua overespressione porta la pianta ad essere più responsiva verso i patogeni (Chern et al., 2012).

Geni codificanti per proteine di difesa:

- PR1a e PR1b: geni che codificano per proteine appartenenti al gruppo 1 delle proteine Pathogenesis-Related (PR) caratterizzate da attività antifungina. In particolare, PR1a è una proteina acida e PR1b è una proteina basica. Entrambe sono coinvolte nel meccanismo di difesa a stress biotici e perciò sono da considerarsi ottimi markers del pathway del salicilico e quindi della SAR (Mitsuhara et al., 2008; Agrawal et al., 2001). Inoltre in un lavoro di Agrawal del 2000 è emerso che il gene PR1b può essere indotto anche da JA con un meccanismo non ancora chiaro. Quindi solo il gene PR1a è stato scelto come controllo negativo.
- PR10: gene codificante per una proteina di difesa appartenente alla famiglia 10 delle PR. Il gene PR10 sembra essere indotto in seguito a trattamenti con JA e cantaridina in modo dose e luce-dipendente (Rakwal et al., 2001). Inoltre risulta essere espresso solamente nella parte aerea della pianta (Rakwal et al., 2001).

Geni codificanti per proteine di difesa:

- Inibitore di proteasi appartenente alla famiglia Bowman-Birk (BBPI): gene codificante per una proteina inibitrice delle proteinasi, appartenente alla famiglia delle PR6, con un ruolo cruciale negli stress indotti da nematodi, microrganismi ed erbivori (Rakwal et al., 2001). L'espressione di tale gene viene indotta in seguito a trattamento con JA (1-100µM), ferita, kinetina ed acido abscissico (ABA) e sembra essere dose e luce – dipendente (Rakwal et al., 2001).
- Perossidasi (POX): gene codificante per una perossidasi (famiglia PR9), coinvolta non solo nei

meccanismi di difesa della pianta ma anche nella crescita e nello sviluppo (Chittoor et al., 1999). Tale gene risulta essere indotto da JA e SA in una maniera tempo e luce-dipendente (Agrawal et al., 2002).

- Lipossigenasi (LOX-JA): gene codificante per il primo enzima che agisce nel pathway della biosintesi del JA (Tao et al., 2003; Rakwal et al., 2002). Tale gene risulta essere indotto da JA, metil-JA, ferita ed infezioni (Tao et al., 2003).

La prima parte del lavoro ha riguardato la standardizzazione delle condizioni ottimali (dose di JA e tempi di trattamento) per l'induzione del priming nel riso, dato che in letteratura non sono presenti informazioni in tal senso.

3.2.1 Induzione del priming utilizzando una concentrazione di metil-jasmonato di 100 μ M

Piante di riso allo stadio di quarta foglia, cresciute come descritto nella sezione di Materiali e Metodi (paragrafo) sono state sottoposte a trattamento spray con metil-jasmonato ad una concentrazione di 100 μ M (con lo scopo di indurre il priming), mentre altre hanno subito lo stesso trattamento ma con acqua sterile (piante di controllo). Dopo 24h da tale trattamento, metà delle piante sia trattate con Me-JA che di controllo sono state ferite mediante pressione con una pinza ed abrasione con il carborundum al fine di mimare l'azione masticatoria di erbivori ed insetti. Complessivamente sono state prodotte quattro condizioni sperimentali: piante di controllo (C) le quali hanno subito il trattamento spray con acqua sterile; piante ferite (W), piante pre-trattate con Me-Ja (J), piante pre-trattate e successivamente ferite (J+W). I campioni fogliari sono stati prelevati a 3-6-24-48 ore dopo la ferita (hpw) e processati come descritto nella sezione di Materiali e Metodi (paragrafo). L'espressione dei geni di interesse è stata analizzata mediante RT-PCR semiquantitativa (FIG. 39).

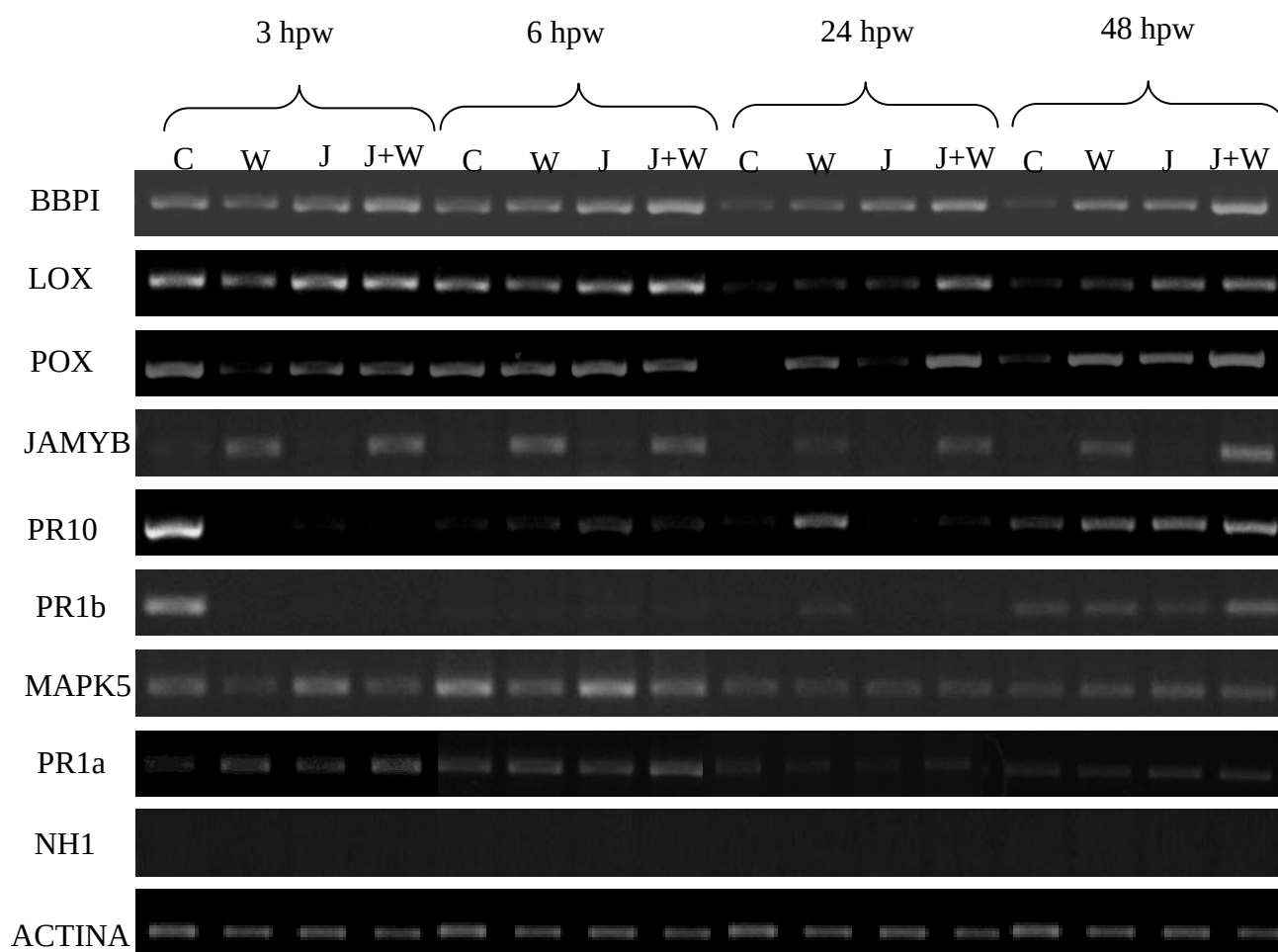


FIG.39.RISULTATI RT-PCR UTILIZZANDO ME-JA 100μM. C= piante di controllo; W= piante ferite; J= piante pre-trattate con Me-Ja 100μM; J+W= piante pre-trattate con Me-Ja 100μM e ferite. Geni analizzati: BBPI, inibitore delle proteasi della famiglia Bowman-Birk; LOX, lipo-ossigenasi; POX, perossidasi; JAMYB, fattore di trascrizione della famiglia MYB indotto da JA; PR: pathogenesis related 1a, 1b, 10; MAPK5: proteina chinasi attivata da mitogeno 5; NH1: non-expressor of PR1; ACTINA: controllo interno.

Sulla base di questi risultati è possibile individuare un pattern di espressione compatibile con il priming solo per alcuni geni. In particolare BBPI, POX e LOX hanno a 24 e 48 hpw il tipico andamento associabile con tale fenomeno in quanto il campione doppio trattato (J+W) mostra un'espressione maggiore rispetto al campione ferito (W), mentre nei campioni di controllo (C) e nei trattati con Me-JA (J), è presente un'espressione più bassa.

Invece JAMYB sembra essere semplicemente indotto da ferita senza ottenere alcun beneficio dal pretrattamento con Me-JA.

I geni PR10, PR1b, MAPK5 e NH1 mostrano avere un pattern di espressione non compatibile con quello del priming poiché il pretrattamento con Me-JA non ha effetto di potenziamento del sistema

di difesa della pianta in seguito a stress da ferita. Infine il gene PR1a non viene indotto in nessuna delle condizioni sperimentali e ciò concorda con quanto riportato in letteratura dove PR1a è indicato come marcatore della via del salicilico; questo gene in effetti è stato appositamente scelto come controllo negativo dell'esperimento.

Sulla base di questi risultati è possibile affermare che le condizioni di trattamento utilizzate hanno consentito l'induzione del priming, anche se i geni responsivi al fenomeno mostrano un discreto livello di espressione già in seguito al solo pre-trattamento. Il fenomeno del priming, invece, non dovrebbe attivare la risposta di difesa, ma solo rendere la pianta più pronta alla risposta in caso di necessità (Conrath, 2006). Quindi, nel tentativo di rendere il pattern di espressione genica più compatibile con la definizione di priming si è deciso di ripetere nuovamente l'esperimento trattando le piante con una concentrazione inferiore di Me-JA.

3.2.2 Induzione del priming utilizzando Me-JA 10 μ M

Piante di riso di 4 settimane cresciute in idroponica con le stesse modalità seguite per l'esperimento precedente, sono state pre-trattate con una soluzione di Me-JA 10 μ M e 24 h dopo il trattamento sono state ferite utilizzando la stessa metodica descritta precedentemente. I campioni fogliari sono stati prelevati a 3-6-24-48 ore dopo la ferita ed utilizzati per l'analisi di RT-PCR semiquantitativa, secondo quanto prima descritto (Par. , Mat e Met) (FIG. 40).

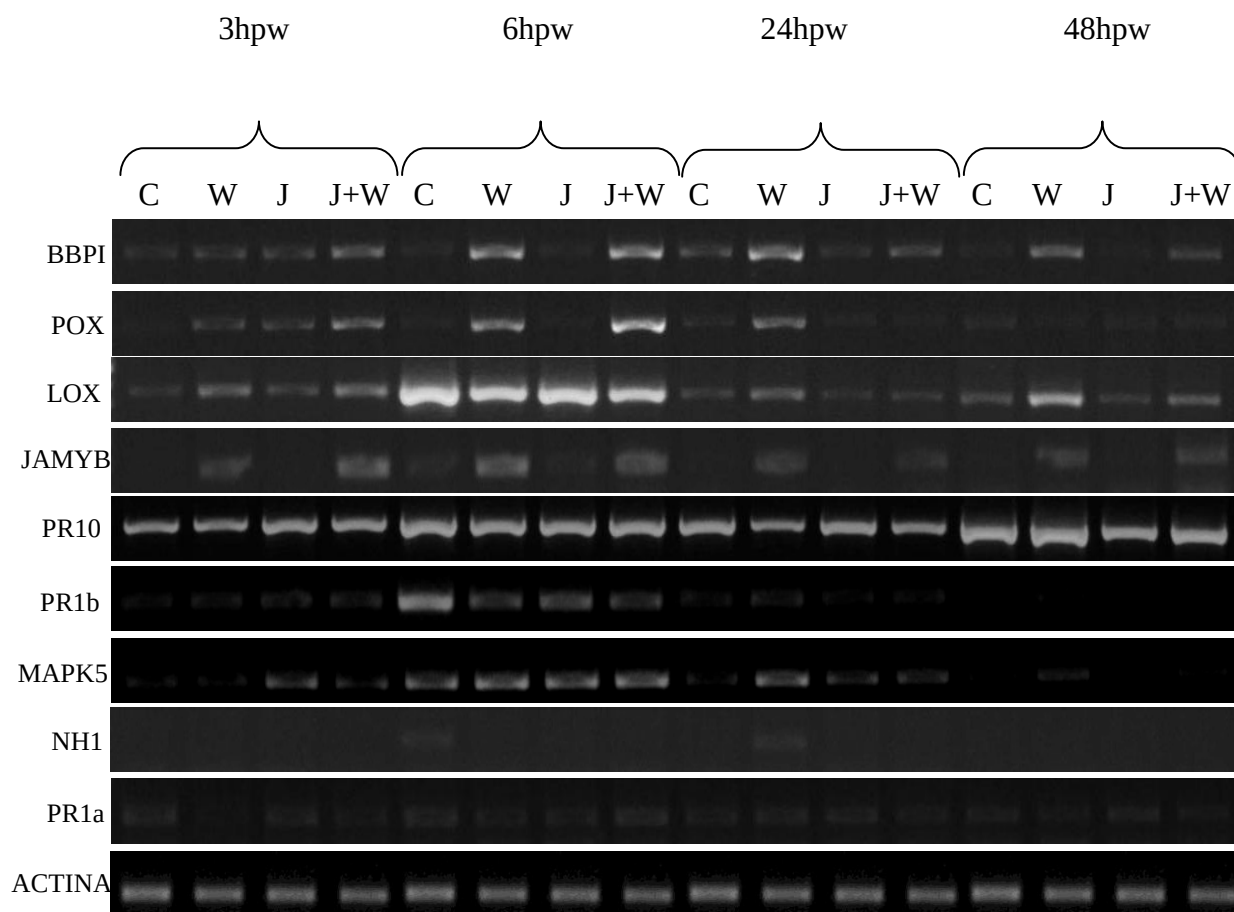


FIG.40.RISULTATI RT-PCR UTILIZZANDO ME-JA 10 μ M. C= piante di controllo; W= piante ferite; J= piante pre-trattate con Me-Ja 10 μ M; J+W= piante pre-trattate con Me-Ja 10 μ M e ferite. Geni analizzati: BBPI, inibitore delle proteasi della famiglia Bowman-Birk; LOX, lipo-ossigenasi; POX, perossidasi; JAMYB, fattore di trascrizione della famiglia MYB indotto da JA; PR: pathogenesis related 10, 1a, 1b; MAPK5: proteina chinasi attivata da mitogeno 5; NH1: non-expressor of PR1; ACTINA: controllo interno.

I risultati ottenuti confermano un andamento compatibile con il priming per i geni BBPI, POX e LOX, anche se la diminuzione della dose di Me-JA, ha portato ad una anticipazione del fenomeno che risulta evidente a 3 e 6 hpw (solo a 3 hpw per LOX). In queste condizioni di trattamento si è inoltre riusciti ad abbassare fortemente il livello di espressione di questi geni nei campioni pretrattati, avvicinandoci maggiormente alle condizioni di priming. L'espressione di questi geni nei campioni feriti (W) è abbastanza elevata (in particolare a 6 h per BBPI e POX) ma comunque inferiore rispetto a quella dei campioni J+W. Un altro gene che sembra dare un risultato interessante è JAMYB, il cui pattern di espressione vede sia il campione ferito (W) che il doppio trattato (J+W) avere sempre una maggiore espressione rispetto al controllo (C) e al pretrattato (J); tuttavia la differenza di espressione fra i due non è tale includere JAMYB fra i geni coinvolti nel fenomeno del priming.

Anche per quanto riguarda gli altri geni non è presente un andamento compatibile con il fenomeno del priming poiché i livelli di espressione sono generalmente paragonabili fra i quattro campioni e, talvolta, l'espressione del controllo o dei singoli trattamenti risulta maggiore di quella del trattamento combinato. Tutto ciò è in disaccordo con il tipico andamento di espressione associabile al priming in quanto sembra che lo stress avrebbe effetto inibitorio sulla loro espressione. Infine, anche in questa condizione è possibile notare un'assenza di espressione del gene responsivo a SA, PR1a.

Questo risultato porta a concludere che il pre-trattamento con Me-JA, alla concentrazione di 10 μ M conferma i risultati ottenuti pretrattando le piante con Me-JA 100 μ M, anche se il pattern di espressione dei geni coinvolti nel fenomeno del priming è maggiormente rispondente alla fisiologia del fenomeno.

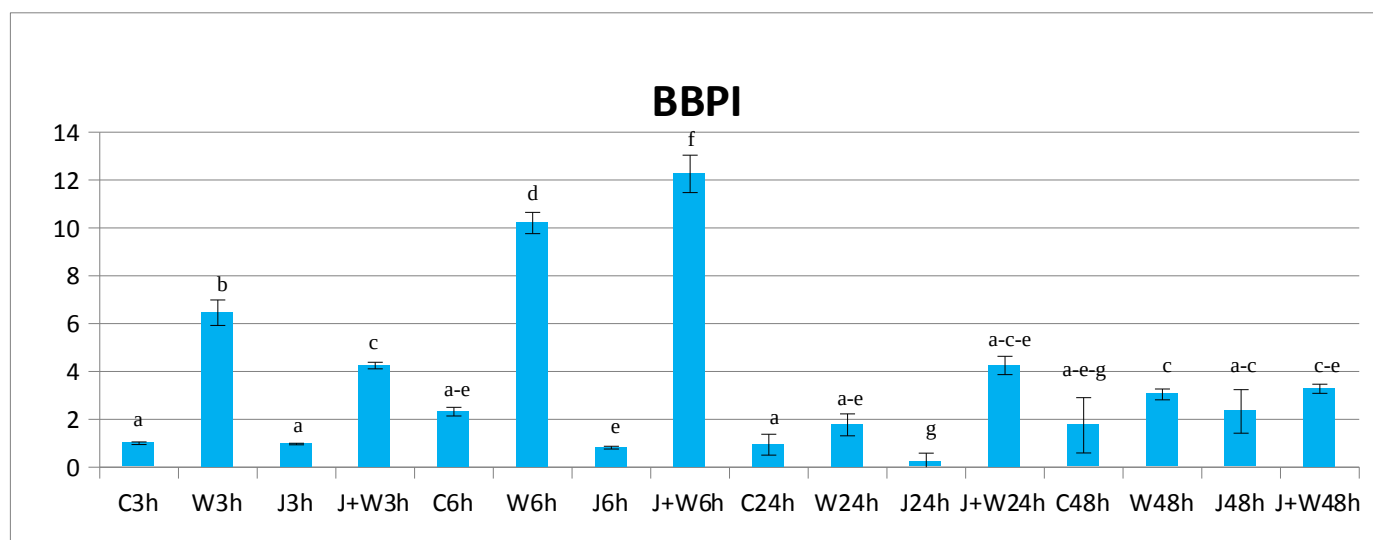
3.2.3 Validazione dei risultati mediante REAL TIME PCR

Per verificare l'attendibilità dei risultati ottenuti mediante RT-PCR semiquantitativa i livelli di espressione dei geni apparentemente coinvolti nel priming sono stati analizzati mediante REAL TIME PCR, tecnica che permette una maggiore sensibilità e precisione nell'analisi di espressione genica.

In queste analisi di qPCR, il gene codificante per il fattore di elongazione 1a degli eucarioti, eEF1a, è stato utilizzato come standard interno o normalizzatore. Le reazioni di qPCR sono state allestite come descritto nella sezione di Materiali e Metodi (paragrafo) utilizzando il SYBR Green per la rilevazione della fluorescenza. Essendo il SYBR GREEN un intercalante aspecifico, per tutti i campioni è stata sempre analizzata la curva di Melting per appurare la specificità degli ampliconi.

I geni oggetto di indagine sono stati quelli che nell'analisi di RT-PCR relativa al trattamento con Me-JA 10 μ M sembravano essere coinvolti nel priming e quindi BBPI, POX, LOX. In questa prima fase di analisi si è deciso di analizzare anche il gene JAMYB per essere sicuri che il suo pattern di espressione fosse realmente incompatibile con il priming (FIG. 40).

3.2.3.1 Analisi di REAL TIME PCR del gene BBPI



Anova-Tukey post test. $P < 0,05$

FIG 41. Risultati di q-PCR relativi al gene BBPI.

L'analisi di REAL TIME PCR ha permesso di evidenziare e confermare il ruolo di BBPI nel priming (FIG. 41). Tuttavia, mentre l'analisi di RT-PCR aveva evidenziato per BBPI un andamento compatibile con il priming a 3 e 6 hpw, la qPCR ha consentito di confermare il coinvolgimento di BBPI nel priming a 6 e 24 hpw, dove il livello di espressione del campione J+W è significativamente maggiore degli altri. In particolare, a 3h il campione di controllo (C3h) e quello trattato solo con Me-JA (J3h) hanno un basso livello di espressione e senza differenze significative, il che significa che il trattamento con Me-JA non influenza il livello di espressione costitutiva del gene; il campione ferito (W3h) invece, mostra un livello di espressione significativamente maggiore rispetto agli altri, indice del fatto che è la ferita ad indurre maggiormente l'espressione di questo gene a 3 hpw.

A 6h è possibile osservare un andamento compatibile con il priming perchè i campioni di controllo (C6h) e pre-trattato (J6h) hanno una bassa espressione mentre il campione ferito (W6h) mostra averne una maggiore. Tuttavia il picco massimo è raggiunto dal campione doppio trattato (J+W6h). Questo pattern è compatibile con il priming ed è in accordo con quello ottenuto nell'analisi di RT-PCR.

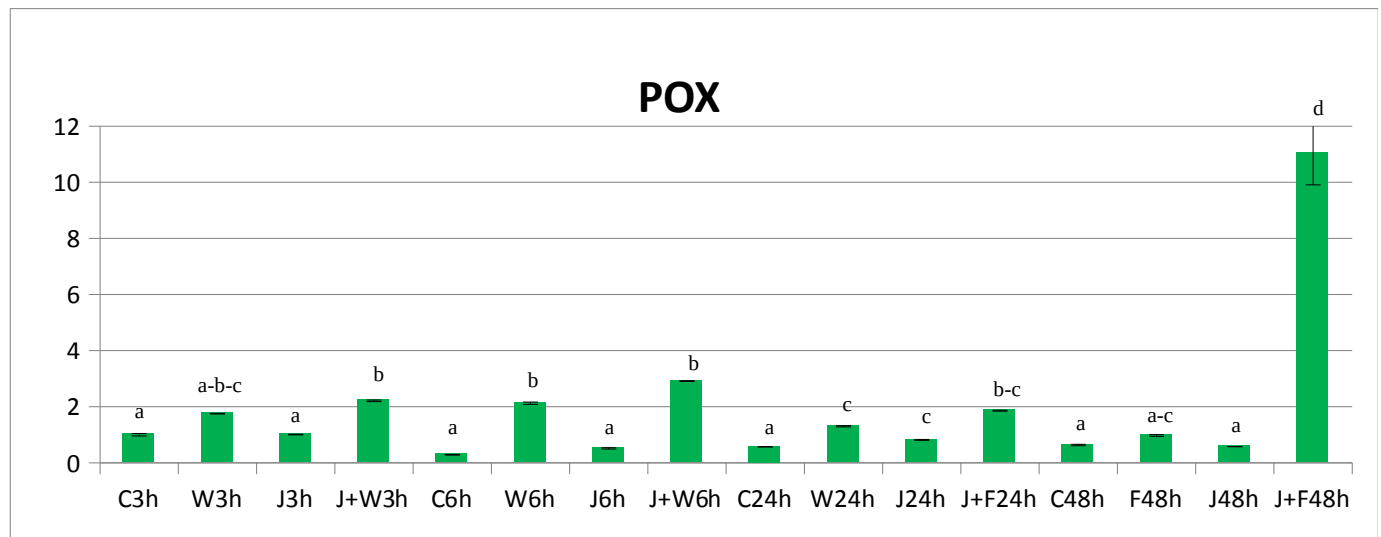
A 24h è presente un pattern analogo a quello di 6h ma con un valore di intensità delle espressioni significativamente inferiore rispetto al tempo precedente. Tuttavia, anche in questo set di campioni,

il doppio trattato (J+W24h) ha un livello di espressione più elevato rispetto al resto dei campioni (C24h, W24h e J24h). Questo risultato non è concorde con l'andamento ottenuto nell'RT-PCR in cui a 24hpw l'effetto del priming sembrava già terminato.

A 48h l'espressione di tutti i campioni tende ad uniformarsi e non è possibile osservare un pattern particolarmente interessante. Ciò è stato rilevato anche nelle analisi di RT-PCR.

Tutto ciò consente di affermare che il coinvolgimento di BBPI nel priming è massimo a 6h e diminuisce entro le 24 dopo la ferita.

3.2.3.2 Analisi di REAL TIME PCR del gene POX



Anova-Tukey post test. $P < 0,05$

FIG42. Risultati di q-PCR relativi al gene POX.

L'analisi di REAL TIME PCR ha permesso di confermare il coinvolgimento del gene POX nel meccanismo del priming (FIG. 42), ma, anche in questo caso, i tempi in cui si vede il massimo effetto sulla difesa della pianta sono posticipati rispetto a quanto evidenziato con la RT-PCR semiquantitativa. Nei primi tempi di analisi (3 e 6 hpw) il campione ferito (W) e il doppio trattato (J+W) mostrano un livello di espressione maggiore rispetto agli altri campioni, con l'espressione del doppio trattato leggermente superiore rispetto a quella del ferito, in analogia con quanto evidenziato nell'analisi di RT-PCR. Tuttavia dall'analisi statistica, risulta che la loro differenza di espressione non è statisticamente significativa.

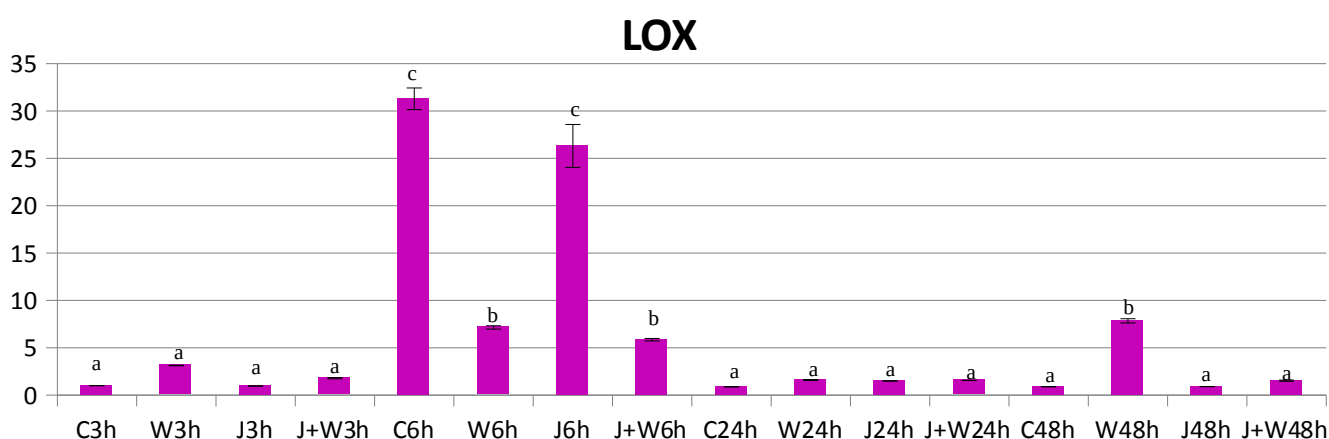
Anche a 24 hpw è presente un picco di espressione maggiore nel doppio trattato (J+W24h) che, però, si traduce ancora una volta in una differenza non statisticamente significativa rispetto ai

campioni W24h e J24h. L'analisi di RT-PCR aveva evidenziato un picco di espressione a carico del campione ferito, che non è stata confermata in qPCR.

A 48 hpw è invece presente un importante picco di espressione del doppio trattato (J+W48h) il quale sottolinea la presenza di una condizione di priming che nell'analisi di RT-PCR non è stata individuata.

I valori di espressione genica e l'analisi statistica concordano nel fatto che soprattutto a 48h è presente un andamento compatibile con il priming per quanto riguarda il gene POX.

3.2.3.3 Analisi di REAL TIME PCR del gene LOX



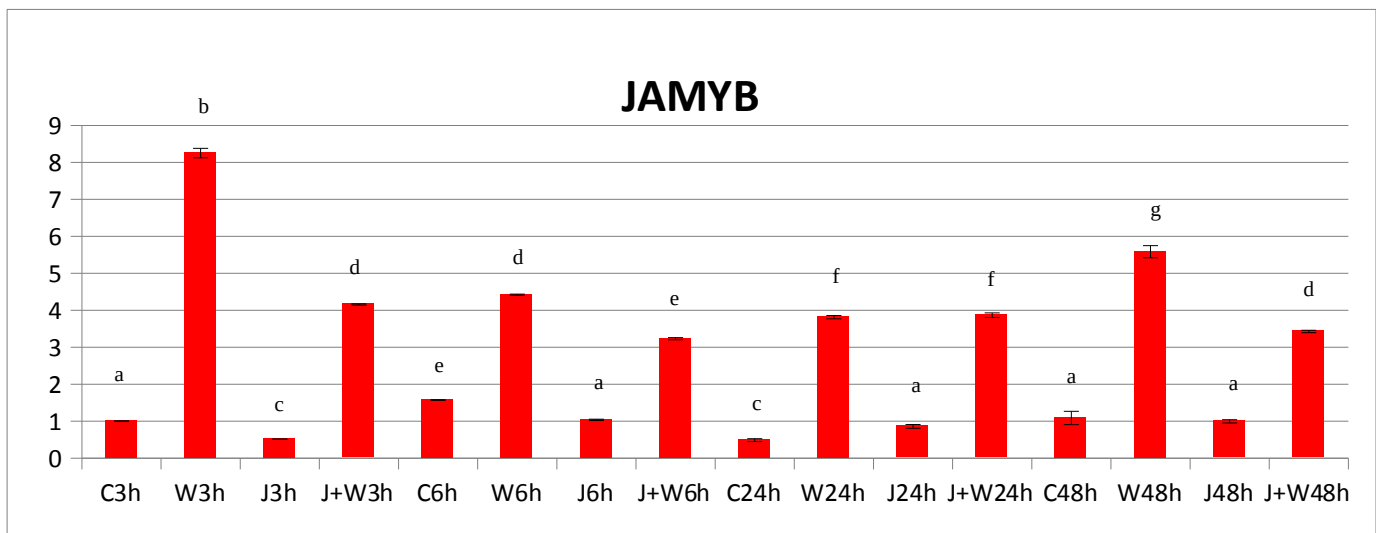
Anova-Tukey post test. $P < 0,05$

FIG.43. Risultati di q-PCR relativi al gene LOX.

L'analisi di REAL TIME ha evidenziato che, a differenza di quanto debolmente evidenziato con l'RT-PCR, il gene LOX non è coinvolto nel meccanismo del priming poiché non è mai presente un pattern di espressione compatibile con esso (FIG. 43). Infatti a 3 hpw il picco maggiore di espressione è raggiunto dal campione ferito (W3h), anche se l'analisi statistica non indica una differenza significativa rispetto al set di campioni di cui esso fa parte. A 6 hpw sembra che il pretrattamento con Me-JA e soprattutto la ferita inibiscano l'espressione costitutiva di tale gene facendone decrescere l'espressione. A 24 hpw si ha un'espressione molto bassa e pressoché identica in tutti i campioni; mentre a 48 hpw tale gene è responsivo esclusivamente alla ferita. Questo risultato in parte concorda con i dati ottenuti dall'RT-PCR in cui tale gene sembra essere indotto da

ferita (in particolare a 48 hpw), ma l'andamento compatibile con il priming debolmente individuato a 3 hpw con l'RT-PCR, non è stato confermato. Tutto ciò fa concludere che il gene LOX non sia coinvolto nel meccanismo del priming.

3.2.3.4 Analisi di REAL TIME PCR del gene JAMYB



Anova-Tukey post test. $P < 0,05$

FIG44. Risultati di q-PCR relativi al gene JAMYB.

L'analisi di REAL TIME PCR ha evidenziato che il gene JAMYB non è coinvolto nel meccanismo del priming (FIG. 44), ma è semplicemente indotto da ferita, e ciò concorda con i dati provenienti dalla letteratura (Lee et al., 2001). Infatti nei primi due tempi di analisi 3hpw e 6hpw, è presente un picco maggiore di espressione nei campioni feriti (W3h e W6h) rispetto ai rispettivi doppio trattati (J+W3h, J+W6h). A 24hpw invece sembra che il campione ferito (W24h) e doppio trattato (J+W24h) abbiano la stessa intensità di espressione. A 48 hpw si ristabilisce la condizione iniziale in cui il campione ferito (W48h) ha maggiore espressione rispetto gli altri del set (C48h, W48h, J48h).

Il pretrattamento con metil-jasmonato non rende tale gene “primed”, anzi sembra che esso possa avere un effetto inibitorio sull'espressione che invece nella ferita è sempre molto intensa. Questi risultati chiariscono quelli ottenuti dall'analisi di RT-PCR in cui in tutti i quattro tempi di analisi era stato possibile osservare un discreto livello di espressione a carico dei campioni ferito e doppio trattato senza però riuscire a comprendere se ci fosse una effettiva differenza di espressione fra i due.

3.2.3.5 Conclusioni dell'analisi della REAL TIME PCR

La REAL TIME PCR è una tecnica molto sensibile e precisa che permette di avere una descrizione molto chiara circa il livello di espressione genica, cosa che non si può ottenere con la semplice analisi di RT-PCR semiquantitativa in quanto meno sensibile. Tuttavia, poiché quest'ultima è una analisi molto veloce e poco costosa, si è preferito realizzare uno screening iniziale di un gran numero di geni utilizzando questa tecnica per poi validare i risultati dei geni più interessanti con la qPCR.

In seguito a queste analisi si evince che è stato possibile indurre il priming con Me-JA ad una concentrazione di 10 μ M in piante di riso di 4 settimane. Tale pre-stress è stato associato ad uno stress abiotico come la ferita perché fisiologicamente essa induce il pathway del JA che culmina con l'espressione dei geni di difesa ad esso responsivi. Tra i geni indagati, quelli che risultano essere coinvolti nel priming sono BBPI e POX, codificanti rispettivamente per una proteina inibitrice di proteasi della famiglia Bowman-Birk ed una perossidasi. Entrambe queste proteine partecipano attivamente nella difesa della pianta: la prima, avente dimensioni che oscillano tra gli 8-20 KDa (Rakwal et al., 2001), blocca le proteasi del patogeno per impedire la sua proliferazione nell'ospite. Inoltre vista la sua funzione anticarcinogenica ed anti-infiammatoria dimostrata da Kennedy (1998), è plausibile pensare ad un suo potenziale utilizzo anche in medicina (Rakwal et al., 2001). La seconda, POX, essendo un'ossidoreduttasi, ha molteplici ruoli nella pianta ed, infatti è coinvolta nel metabolismo delle auxine, nella biosintesi dell'etilene, nei processi mediati dalla luce, nella crescita, nello sviluppo, nella senescenza e non ultima nella difesa (Agrawal et al., 2002).

E' possibile osservare che l'andamento dell'espressione dei due geni nei campioni doppio trattati (J+W) è differente: per quanto riguarda BBPI, l'espressione raggiunge un massimo a 6 hpw per poi diminuire a 24 hpw, tempo in cui è osservabile un livello di espressione paragonabile al primo tempo di analisi, mentre a 48 hpw ha un livello di espressione ancora più basso (FIG.).

Invece è possibile osservare un pattern diverso per quanto riguarda il gene POX in cui i tempi 3-6-24 hpw mostrano un'espressione paragonabile tra loro raggiungendo il picco massimo a 48 hpw (FIG.45).

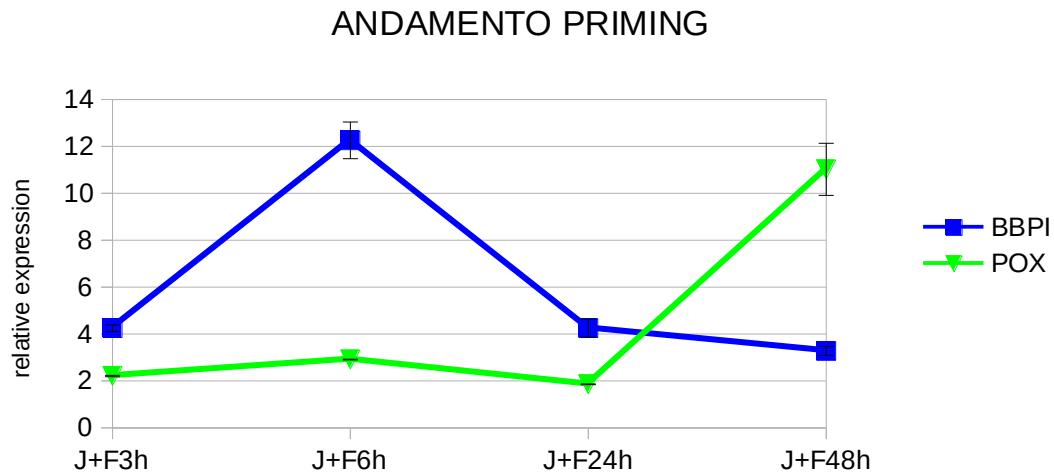


FIG.45. Andamento priming nei campioni doppio trattati per i geni BBPI e POX. Il gene eEF1a è stato utilizzato come controllo interno.

3.3 Analisi epigenetiche

La fase successiva di questa tesi è stata quella di eseguire delle analisi di natura epigenetica sui promotori dei due geni BBPI e POX risultati essere, sulla base dalle analisi precedenti, coinvolti nel priming al fine di investigare che tipo di modifiche epigenetiche possono essere associate nella condizione fisiologica del priming.

Quindi è stata eseguita un'analisi *in silico* dei due promotori al fine di identificare i putativi siti di legame e riconoscimento da parte di specifici fattori di trascrizione in una regione a monte del sito di start della trascrizione (ATG) (da -10000 bp a +1).

3.3.1 Analisi *in silico* del promotore di BBPI e POX

Mediante l'ausilio del database PLACE è stato possibile individuare nelle regioni promotrici dei geni di interesse le sequenze consenso riconosciute da diverse famiglie dei fattori di trascrizione (Tabelle 1-2).

BBPI

Cis-acting elements	signal sequence	strand	responsiveness	associated Tfs	copy number
E-box	CANNTG	(+)/(-)	oxidative stress	bHLH	89
DOF core	AAAG	(+)/(-)	oxidative stress	Dof	93
G-box	CACGTG	(+)/(-)	oxidative stress	bZIP	16
MYC CONSENSUS	CANNTG	(+)/(-)	oxidative stress	bHLH	89
MYC ATRD22	CACATG	(+)/(-)	oxidative stress	MYC	7
MYB core	CNGTTR	(+)/(-)	oxidative stress	MYB	25
BIHD1OS	TGTCA	(+)/(-)	wounding	Binding site of BELL homeodomain transcription factor	19
WRKY71OS	TGAC	(+)/(-)	wounding	WRKY	62
TAAAG motif	TAAAG	(+)/(-)	oxidative stress	Dof	17
ASF1MOTIFCAMV	TGACG	(+)/(-)	Me-ja		13

Tabella 1

POX					
Cis-acting elements	signal sequence	strand	responsiveness	associated Tfs	copy number
E-box	CANNTG	(+)/(-)	oxidative stress	bHLH	118
DOF core	AAAG	(+)/(-)	oxidative stress	Dof	83
G-box	CACGTG	(+)/(-)	oxidative stress	bZIP	2
MYC CONSENSUS	CANNTG	(+)/(-)	oxidative stress	bHLH	118
MYC ATRD22	CACATG	(+)/(-)	oxidative stress	MYC	8
MYB core	CNGTTR	(+)/(-)	oxidative stress	MYB	39
BIHD1OS	TGTCA	(+)/(-)	wounding	Binding site of BELL homeodomain transcription factor	31
WRKY71OS	TGAC	(+)/(-)	wounding	WRKY	86
TAAAG motif	TAAAG	(+)/(-)	oxidative stress	Dof	11
ASF1MOTIFCAMV	TGACG	(+)/(-)	Me-ja		14

Tabella 2

Sulla base di queste analisi *in silico* è evidente che nei promotori dei geni BBPI e POX sono presenti numerose sequenze consenso per fattori di trascrizione coinvolti nella difesa. In particolare è possibile osservare la presenza di siti riconosciuti sia da fattori di trascrizione associati allo stress in generale quali E-box, G-box, Dof core, MYB core e MYC CONSENSUS, che da quelli coinvolti nella risposta a Me-JA e a ferita come WRKY, BIHD1OS e ASF1MOTIFCAMV. Tutto ciò giustifica il loro stato “primed” in seguito a pre-trattamento con Me-JA associato allo stress della ferita.

3.3.2 Analisi della metilazione del DNA mediante Methylation Specific PCR (MSP)

L'epigenetica ha per oggetto lo studio dei cambiamenti del genoma senza mutazioni nella sequenza di DNA. Tali modifiche epigenetiche comprendono RNAi, modifiche istoniche e non ultima, la metilazione del DNA. Quest'ultima avviene a carico della citosina a cui si lega un gruppo metile formando la 5'-metilcitosina, la quale viene mantenuta nella cellula poiché svolge delle funzioni di regolazione nei vari stadi di crescita della pianta (Zhang et al., 2010).

Per studiare la presenza della metilazione a carico della citosina nel dinucleotide CG (che costituisce la forma di metilazione più frequente nel genoma) nella zona del promotore, i campioni di DNA estratti da tutti i campioni dei 4 tempi sperimentali sono stati oggetto di una conversione utilizzando il bisolfito di sodio. Tale reagente permette la conversione esclusivamente delle citosine non metilate in uracile, mentre quelle metilate non vengono convertite e restano 5'-metilcitosina. Questo processo è alla base di una PCR condotta con primers specifici che consentono di discriminare le citosine metilate da quelle che non lo sono.

La conversione dei campioni è stata eseguita come illustrato in Materiali e Metodi (paragrafo)

In effetti, una fase molto importante è la corretta progettazione dei primers, i quali devono chiarire in maniera inequivocabile la presenza o meno della metilazione a carico della citosina. Le sequenze promotrici sono state analizzate mediante il software METHPRIMER il quale evidenzia le regioni ricche in CG (con un rapporto maggiore a 0.6), poiché sono i siti in cui si ha maggiore probabilità di trovare la condizione di metilazione. Tale software, elabora due coppie di primers che amplificano la stessa regione: la prima, chiamata Methylated PAIR (M PAIR) si appaia allo stampo, ed amplifica solo se la citosina in esame è nella forma metilata, la seconda, Unmethylated PAIR (U PAIR) si appaia allo stampo in presenza di una citosina non metilata che quindi dopo la conversione con bisolfito di sodio è stata convertita in uracile. Le coppie di primers fornite dal software sono state utilizzate per simulare delle PCR, tramite specifici programmi al computer, per appurarne la qualità poiché la difficoltà in questo tipo di elaborazione dei primers è quello di ottenere dei primers forward che si appaiano ad una regione in cui è presente una citosina da analizzare. Quindi, a seconda di quale primer forward (M oppure U) si appaia è possibile dedurre se la citosina in esame sia metilata o meno. Inoltre non tutte le sequenze sono analizzabili perché i primers e le sequenze da analizzare sono ricche di dinucleotidi CG che possono determinare la presenza di strutture di complementarietà interne, i cosiddetti hairpin. Inoltre, un'altra difficoltà è che essendo molto lunghi (circa 25 nucleotidi), perchè devono aumentare il ΔG abbassando così la probabilità di

complementarsi su se stessi, tendono ad avere delle temperature di Melting alte. Quindi anche quelle di annealing sono molto elevate e talvolta troppo diverse tra il forward e reverse.

L'analisi in silico mediante il software METHPRIMER ha evidenziato due regioni interessanti nel promotore di BBPI per lo studio della metilazione del DNA: una si estende da -9544 a -8856 bp dall'ATG, e l'altra da -2666 a -2276 bp dall'ATG, l'altra. La medesima analisi condotta sul promotore di POX ha posto l'attenzione su due regioni: una da -6300 a -5700 bp dall'ATG, e l'altra da -4366 a -4056 bp dall'ATG.

In seguito alla PCR, gli amplificati sono stati analizzati su gel di agarosio 1,2% (FIG.46).

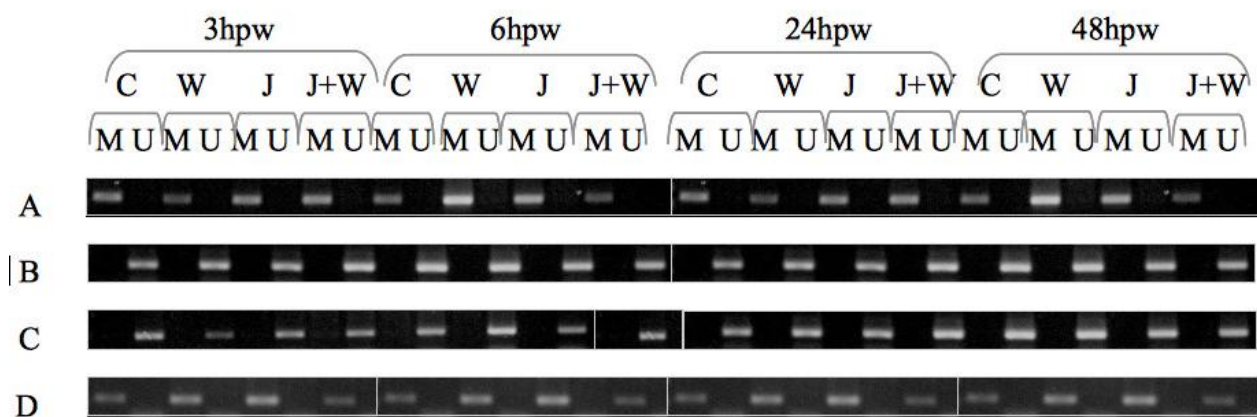


FIG.46. Risultati MSP. C= controllo; W= ferita; J= trattamento spray 10 μ M; J+W= trattamento spray 10 μ M e ferita; M= metilato; U= non metilato. Pannello A: zona del promotore di BBPI da -2666 a -2276 bp dall'ATG; pannello B: zona del promotore di BBPI da -9544 a -8856 bp dall'ATG; pannello C: zona dl promotore di POX da -4366 a -4056 bp dall'ATG; pannello D: zona del promotore di POX da -6300 a -5700 bp dall'ATG. A e C: zone prossimali all'ATG. B e D: zone distali all'ATG.

Da questa analisi è emerso che la metilazione è presente esclusivamente nel sito più prossimale all'ATG (pannello A) nel promotore di BBPI e nel sito più distale nel promotore di POX (pannello D). La metilazione invece non è presente nel sito più distale dall'ATG (pannello B) nel promotore di BBPI e nel sito più prossimale all'ATG nel promotore di POX (pannello C).

Questo risultato non ha permesso di evidenziare una correlazione diretta tra la presenza di

metilazione del DNA ed espressione genica in quanto non è presente una variazione di metilazione tra i campioni ai vari tempi, correlabile con l'andamento dell'espressione genica evidenziato con la qPCR. Quindi non sembra essere presente un "effetto epigenetico" indotto dalla metilazione del DNA per influenzare l'andamento dell'espressione genica nel priming. Tuttavia da letteratura emerge una cooperazione tra le modifiche epigenetiche come la metilazione del DNA e le modifiche istoniche che rendono possibile l'espressione genica (Li et al., 2008).

Tutto ciò sembra essere in netto contrasto con le conoscenze relative al mondo animale in cui la metilazione, che è poco frequente nel genoma, è spesso associata alla repressione genica ed inoltre è del tutto assente nelle isole CG. Nel mondo vegetale invece non solo è molto più diffusa, ma non è necessariamente associata alla repressione genica, poiché il suo effetto si esplica in relazione ad altre modifiche epigenetiche presenti (Li et al., 2008).

A questo punto per avere una visuale più completa del meccanismo del priming anche dal punto di vista epigenetico è stato necessario ed opportuno abbinare lo studio della metilazione del DNA con altre modifiche epigenetiche quali le modifiche istoniche.

3.3.3 Analisi delle modifiche istoniche

Le modifiche istoniche, fino ad oggi ben studiate, creano un codice riconosciuto dai fattori di trascrizione che rendono la cromatina più o meno accessibile all'apparato trascrizionale, modulando l'espressione genica in base alle condizioni in cui l'organismo viene a trovarsi. Al giorno d'oggi se ne conoscono di molti tipi come l'acetilazione, la metilazione, l'ubiquitinazione, la fosforilazione ognuno a carico di vari amminoacidi presenti principalmente nelle code degli istoni H3 e H4. In passato queste modifiche sono state oggetto di uno studio molto approfondito che ha permesso di ottenere un pattern di distribuzione sia lungo il promotore che nel corpo del gene in vari tipi di piante (Li et al., 2012). Inoltre da numerosi studi emerge un legame non ancora ben chiaro nelle piante tra tali modifiche e la metilazione del DNA. Da un lavoro di Li e colleghi (2008), si evidenzia una compartecipazione di entrambe le modifiche epigenetiche (metilazione del DNA e modifiche istoniche) all'espressione genica ma in una maniera ancora oggi non chiara. Inoltre Luna e colleghi (2014) hanno evidenziato una relazione tra il priming e le modifiche post-traduzionali degli istoni nei promotori dei geni di difesa coinvolti in questo processo.

Le modifiche epigenetiche analizzate in questa tesi sono state: l'acetilazione della lisina 9 dell'istone H3 e la trimetilazione della lisina 4 dell'istone H3. Entrambe le modifiche istoniche analizzate

hanno gli stessi effetti sia negli animali che nelle piante, ovvero sono entrambe legate ad un incremento dell'espressione genica; nello specifico l'acetilazione a carico della lisina 9 dell'istone H3 ha la funzione di rendere la cromatina più accessibile all'apparato trascrizionale favorendo l'espressione genica e quindi la sua presenza indica una zona trascrizionalmente attiva; la trimetilazione è una modifica a carico della lisina 4 dell'istone H3 che rende la zona genica in cui è presente fortemente trascritta. Quest'ultima è la modifica istonica che, rispetto alla mono- e alla dimetilazione, porta ad uno stato di intensa attività trascrizionale. Infatti, se la metilazione singola non ha grandi effetti sull'espressione genica, la dimetilazione permette la trascrizione ed è possibile trovarla anche in geni mediamente espressi, la trimetilazione è presente in geni con un livello di espressione estremamente elevata. Infatti se l'acetilazione è presente in geni potenzialmente attivi, la trimetilazione è presente in gene intensamente trascritti. Queste modifiche epigenetiche sono state analizzate da Lopez e colleghi (2011) in mutanti di *Arabidopsis thaliana* primed in modo tale da attivare l'espressione genica dei geni responsivi al SA. Anche in questo caso, i livelli di acetilazione e trimetilazione risultavano notevolmente incrementati, confermando una corrispondenza tra priming e modifiche epigenetiche.

Per analizzare la presenza di tali modifiche in modo da poterle correlare anche con i dati ottenuti dalla qPCR è stata eseguita la tecnica dell'immunoprecipitazione della cromatina, conosciuta anche con il nome di Chromatine ImmunoPrecipitation (ChIP).

Con tale tecnica le foglie delle piante da analizzare sono state sottoposte ad una fase di crosslinking al fine legare covalentemente tutte le proteine complessate con il DNA e quindi anche gli istoni. Successivamente la cromatina è stata isolata e sonicata come descritto nella sezione di Mat e Met (par. XXXX).

Dopo aver stimato la concentrazione di tutti i campioni ed averli chiarificati, è stata eseguita l'immunoprecipitazione su ognuno di essi utilizzando la stessa quantità.

Da ciascun campione sono state ottenute quattro aliquote le quali rappresentano i campioni da immunoprecipitare:

- INPUT, o controllo positivo, campione che non è stato immunoprecipitato ma subito congelato in N₂ liquido e conservato a -80°C fino alla fase del decrosslinking.
- ACETILAZIONE, campione che è stato fatto immunoprecipitare con l'anticorpo anti-lisina 9 dell'istone H3 (antiK9H3);
- METILAZIONE, campione che è stato fatto immunoprecipitare con l'anticorpo anti-trimetilazione della lisina 4 dell'istone H3 (anti 3metK4H3);
- NO ANTICORPO, o controllo negativo, campione che non è stato fatto immunoprecipitare in

assenza di anticorpi ma che ha subito gli stessi trattamenti dell'ACETILAZIONE e della METILAZIONE.

I campioni ACETILAZIONE, METILAZIONE e NO ANTICORPO sono stati messi ad incubare rispettivamente con l'anticorpo specifico ad una diluizione 1:200, tranne il NO ANTICORPO, come descritto nella sezione Materiali e Metodi (paragrafo). Tutti i campioni sono stati sottoposti alla fase di decrosslinking, decontaminati da RNA e proteine ed infine sono stati risospesi con H₂O sterile.

3.3.3.1 Progettazione dei primers per la ChIP

Al fine di avere una panoramica completa riguardo la distribuzione delle modifiche istoniche considerate, la zona di interesse scelta per l'analisi della ChIP è compresa fra -2000 bp a +500 bp per ciascun gene. I geni presi in considerazione sono: POX e BBPI.

Quindi la regione analizzata è a cavallo tra il promotore e la regione codificante. Questa scelta si è basata sul fatto che in letteratura è noto che il rimodellamento della cromatina che porta all'espressione genica può avvenire in una zona molto vasta e soprattutto si estende nell'intorno del sito di inizio della trascrizione (Li et al., 2008).

È stato opportuno ed utile suddividere le 2500 bp totali da analizzare in cinque regioni da 500 bp ognuna. Per ogni regione è stata elaborata una coppia di primers (POX1-2-3-4-5 e BBPI1-2-3-4-5), utilizzata nella q-PCR. I risultati ottenuti dalla qPCR sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante test ANOVA e Tukey post-test ($P < 0,05$).

3.3.3.2 Studio dell'andamento delle modifiche epigenetiche nel promotore e nel corpo dei geni primed BBPI E POX

Per comprendere a fondo i risultati provenienti dall'esperimento della ChIP, bisogna correlare le modifiche istoniche analizzate con l'andamento dell'espressione ottenuto in qPCR poiché l'espressione dei geni viene regolata a monte dalle modifiche epigenetiche che modulano l'accessibilità dell'apparato trascrizionale al DNA. Da qui emerge l'importanza dei dati ottenuti dalle analisi epigenetiche al fine di comprendere al meglio i risultati delle analisi geniche.

3.3.3.2.1 Analisi epigenetiche del gene POX

Dai risultati di qPCR è emerso che nei campioni analizzati a 3h dalla ferita è presente nel gene POX una condizione di priming poiché il campione pretrattato con Ja 10μM e successivamente ferito (J+W) mostra un'espressione maggiore rispetto agli altri campioni (FIG.47).

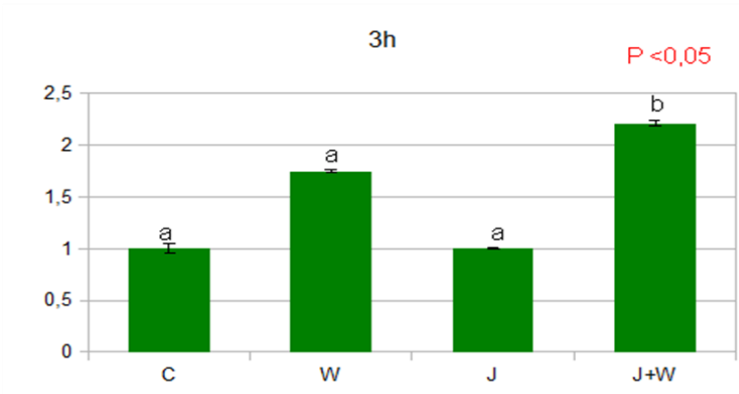


FIG.47. RISULTATI DI q-PCR RELATIVI AL GENE POX A 3h.

Tale stato fisiologico è supportato a livello epigenetico dal pattern sotto riportato (FIG.48).

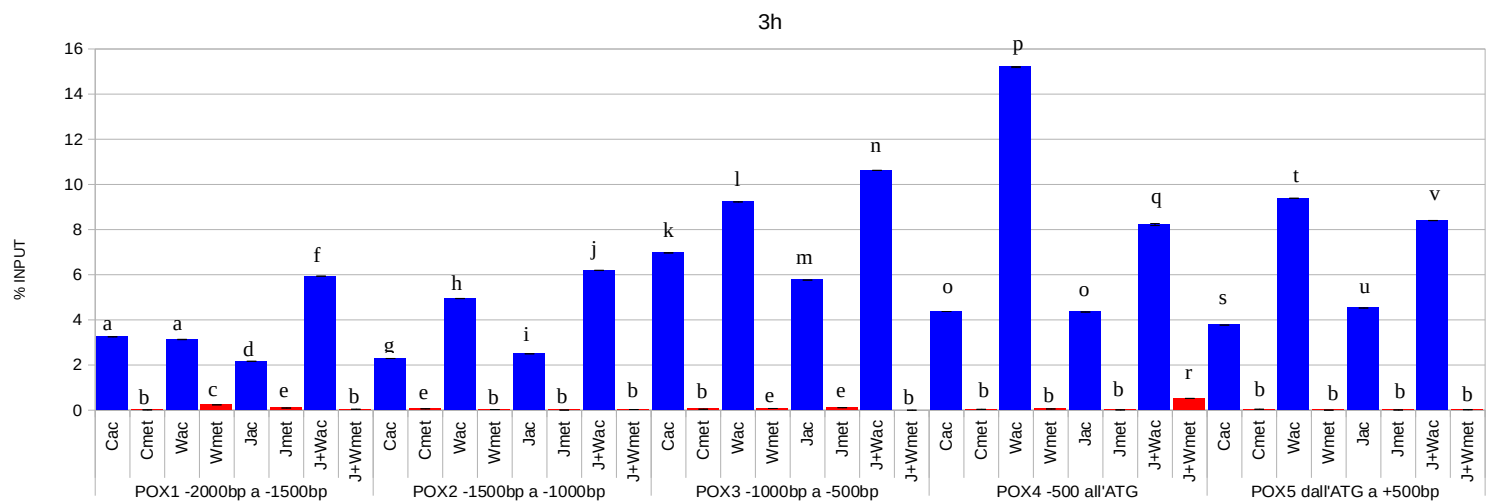


FIG.48. RISULTATI OTTENUTI DALLA Q-PCR SUI CAMPIONI OTTENUTI DALLA CHIP.

L'analisi mediante ChIP-PCR ha permesso di visualizzare l'andamento delle modifiche epigenetiche contro cui sono stati utilizzati degli anticorpi specifici. Nelle zone del promotore corrispondenti a POX1, POX2 e POX3 che si estendono complessivamente da -2000bp a -500bp è presente lo stesso andamento di acetilazione che vede un maggiore livello a carico del campione doppio trattato (J+Wac) e tale differenza risulta statisticamente significativa rispetto al livello di acetilazione degli altri campioni. Invece nelle ultime due zone considerate, POX4 e POX5 (che si estendono da -500bp a +500bp), è presente un andamento che vede una maggiore presenza di acetilazione a carico del campione ferito (Wac). Anche in questi casi la differenza risulta essere statisticamente significativa.

La trimetilazione mostra dei livelli molto bassi in tutti i campioni, ma le zone che mostrano avere dei livelli maggiori statisticamente significativi rispetto agli altri sono il campione ferito (Wmet) nella zona POX1, da -2000 bp a -1500bp, ed il campione doppio trattato (J+Wmet) nella zona POX4 da -500 all'ATG. In questo campione è presente un livello di trimetilazione maggiore tra tutti i campioni con una differenza statisticamente significativa.

Quindi, tale pattern delle modifiche istoniche si abbina con la maggiore espressione genica del campione doppio trattato evidenziata mediante qPCR ed è compatibile con la condizione di priming. Inoltre è interessante notare che è presente un incremento della trimetilazione in prossimità dell'ATG e ciò è in accordo con quanto riportato in letteratura (Li et al., 2008).

L'analisi di qPCR per il gene POX dei campioni a 6h ha evidenziato un pattern di espressione non compatibile con il priming poiché l'espressione del ferito e del doppio trattato è risultata essere molto simile e statisticamente non significativa (FIG.49).

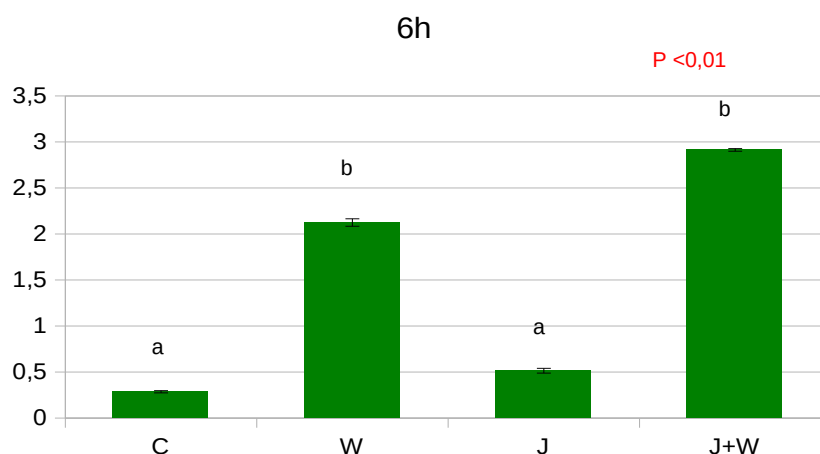


FIG.49. RISULTATI DI q-PCR RELATIVI AL GENE POX A 6h.

Tale condizione genica, è supportata dal punto di vista epigenetico dal seguente pattern (FIG.50).

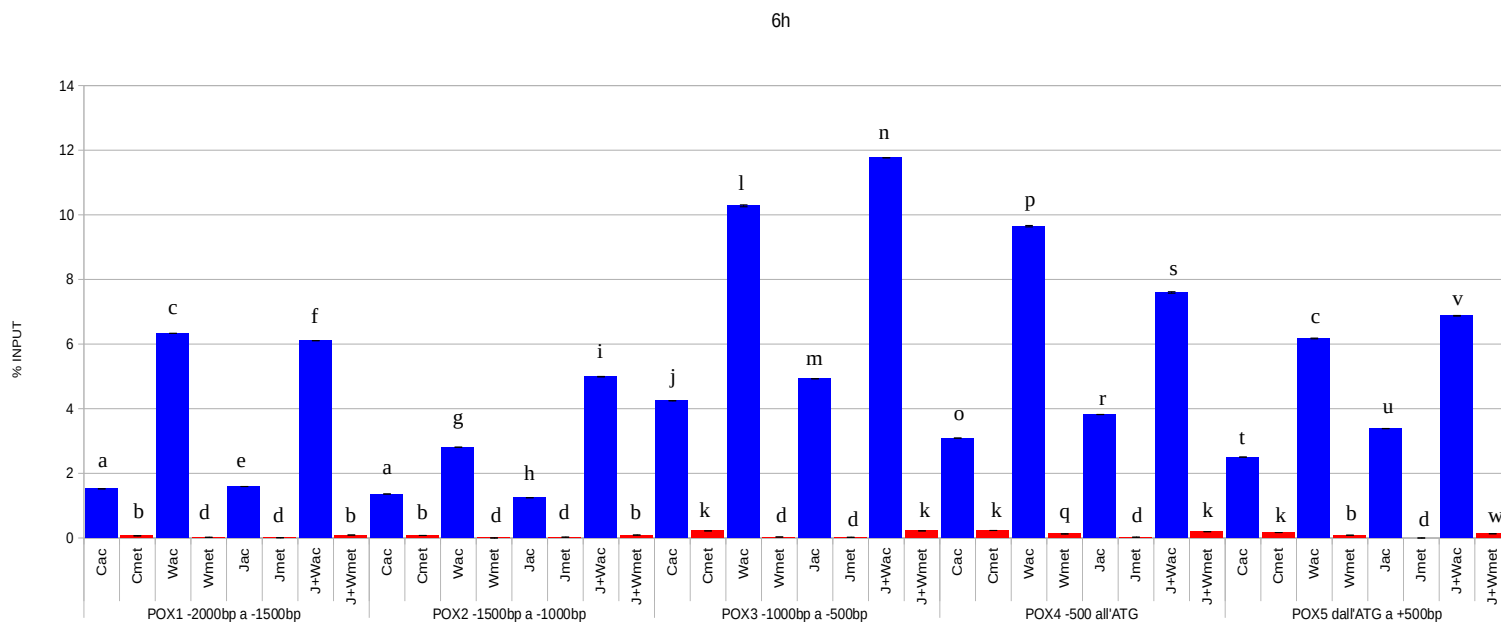


FIG.50. RISULTATI OTTENUTI DALLA q-PCR SUI CAMPIONI OTTENUTI DALLA ChIP

In questo pattern è possibile osservare un andamento simile per quanto riguarda l'acetilazione nelle zone del promotore POX1, da -2000bp a -1500bp, e POX4, da -500 all'ATG. In queste due zone essa risulta maggiormente presente nei campioni feriti Wac ad un livello statisticamente significativo. Anche nel campione doppio trattato è presente un discreto livello di acetilazione, inferiore rispetto a quello del campione ferito. Per quanto riguarda le zone POX2, POX3 e POX5 è possibile osservare una maggiore presenza di acetilazione del campione doppio trattato J+Wac. Tale livello di acetilazione è statisticamente significativo rispetto agli altri campioni del set. Anche il campione ferito in queste zone ha un buon livello di acetilazione, anche se inferiore rispetto al doppio trattato.

La trimetilazione risulta essere ancora poco presente in tutte le zone del promotore anche se essa risulta essere maggiormente presente nei campioni di controllo (Cmet) e doppio trattato (J+Wmet). Tali incrementi di trimetilazione sono statisticamente significativi. Anche in questo tempo è interessante notare come i livelli di trimetilazione si incrementino in corrispondenza dell'ATG per favorire l'espressione genica, come riportato in letteratura (Li et al., 2007).

A 24h dopo lo stress della ferita, l'andamento del gene POX mostra un pattern compatibile con il priming in quanto il campione doppio trattato ha un'espressione maggiore rispetto agli altri campioni (FIG.51).

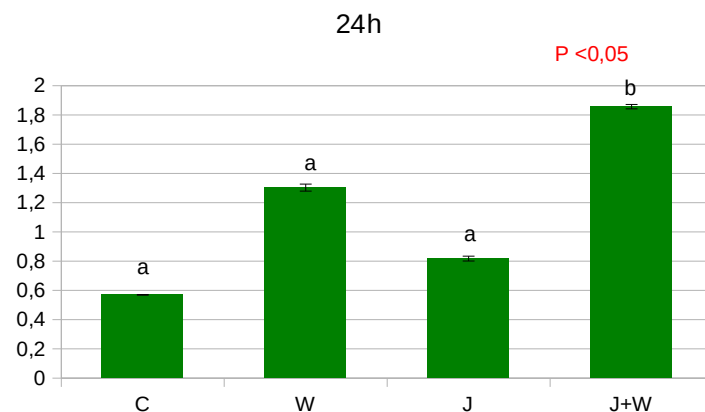


FIG.51. RISULTATI DI q-PCR RELATIVI AL GENE POX A 24h.

L'analisi di ChIP-PCR ha permesso di portare alla luce l'andamento delle modifiche istoniche corrispondente, sotto riportato (FIG.52).

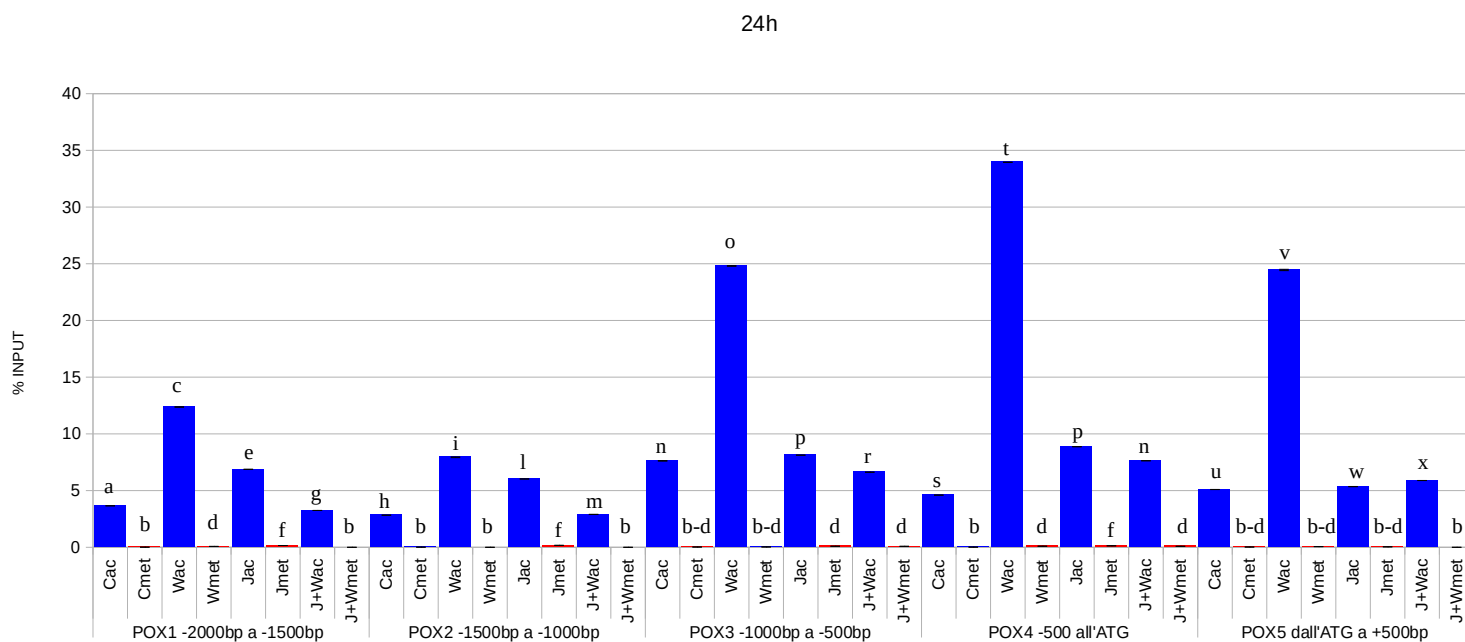


FIG.52. RISULTATI OTTENUTI DALLA q-PCR SUI CAMPIONI OTTENUTI DALLA ChIP

Sulla base di questi risultati è possibile affermare che, per quanto riguarda l'acetilazione, in tutte le zone analizzate è presente una maggiore presenza, statisticamente significativa, nei campioni feriti (Wac), mentre negli altri campioni del set è presente un livello, molto inferiore.

La trimetilazione è poco presente in tutte queste zone ma è possibile individuare una maggiore presenza, statisticamente significativa, nei campioni Jmet in tutte le zone e J+Wmet nelle zone POX3 e POX4. Infine nelle zone POX4 e POX5 è possibile osservare un aumento di trimetilazione anche a carico del campione ferito Wmet e questo concorda con quanto riportato in letteratura in cui è possibile osservare un incremento della trimetilazione in corrispondenza dell'ATG (Li et al., 2008).

L'ultimo tempo analizzato è quello relativo alle 48h dalla ferita. L'analisi di qPCR ha portato alla luce questi dati (FIG.53).

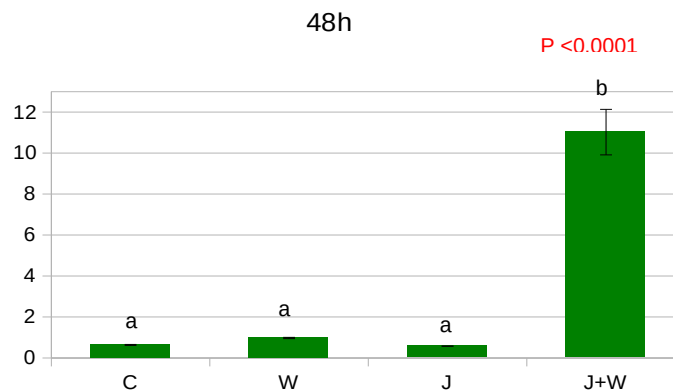


FIG.53. RISULTATI DI q-PCR RELATIVI AL GENE POX A 48h.

Sulla base di questo pattern di espressione genica è possibile affermare che esso è compatibile con il priming. Tutto ciò è supportato dal punto di vista epigenetico da un andamento delle modifiche istoniche presentato di seguito (FIG.54).

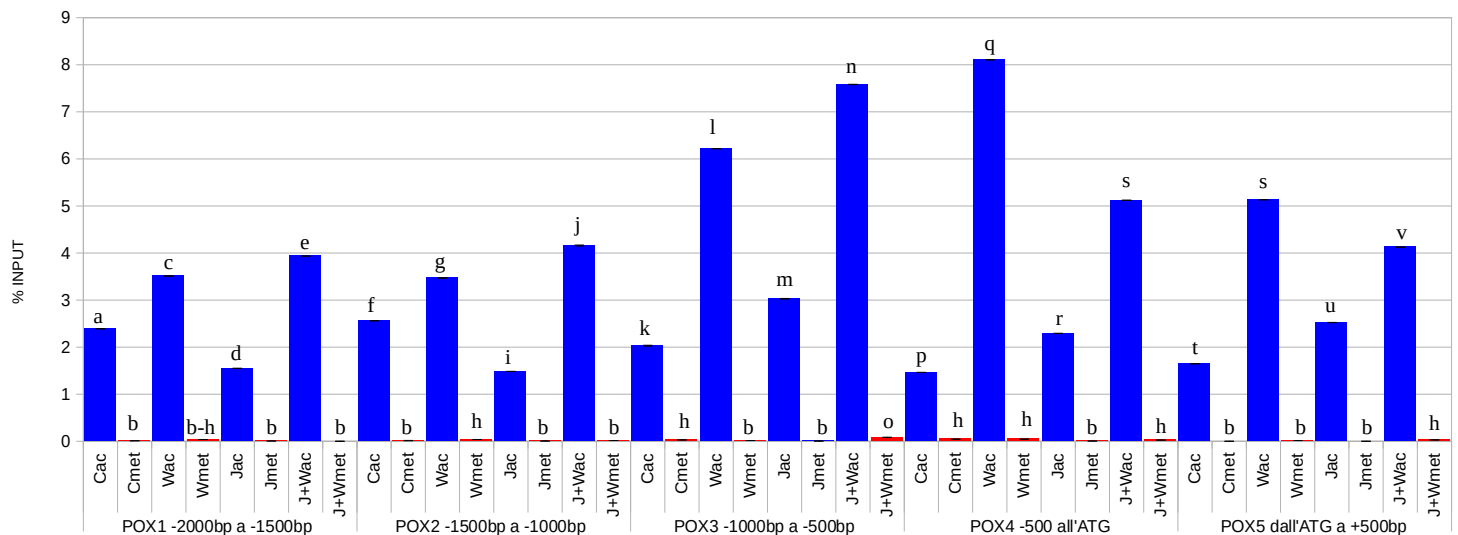


FIG.54. RISULTATI OTTENUTI DALLA q-PCR SUI CAMPIONI OTTENUTI DALLA ChIP

I risultati della ChIP-PCR hanno evidenziato che nelle zone POX1, POX2, POX3 che si estendono complessivamente da -2000bp a -500bp è presente una maggiore acetilazione nel campione doppio trattato J+Wac anche se è stato possibile rilevare la presenza di tale modifica anche nel campione ferito Wac. Tuttavia la maggiore presenza di acetilazione a carico dei campioni doppio trattati è statisticamente significativa. Invece le zone POX4 e POX5 mostrano un livello di acetilazione maggiore a carico dei campioni feriti Wac. Tale incremento è statisticamente significativo. Anche i campioni doppio-trattati mostrano un buon livello di acetilazione, ma inferiore a quello dei campioni feriti.

Anche in questo tempo di analisi la trimetilazione è presente a livelli molto bassi. Nelle zone POX1 e POX2 essa è presente maggiormente nei campioni feriti Wmet, con una differenza statisticamente significativa. Nella zona POX3 è maggiormente presente nel doppio trattato J+Wmet e tale incremento è statisticamente significativo. Nella zona di POX4 è presente in tutti i campioni ad un livello basso escluso il campione pretrattato Jmet ed in POX5 è presente una significativa presenza a carico del campione doppio trattato J+Wmet. In questo caso il livello massimo di trimetilazione non è presente in concomitanza dell'ATG, ma nelle zone prossimali ad esso e ciò concorda con quanto riportato in letteratura, poiché le modifiche in queste posizioni influenzano l'espressione genica (Li et al., 2008).

3.3.3.2.2 Analisi epigenetiche del gene BBPI

Le analisi di qPCR sui campioni a 3h hanno evidenziato dal punto di vista dell'espressione genica, l'assenza di un pattern di espressione associabile al priming (FIG.59).

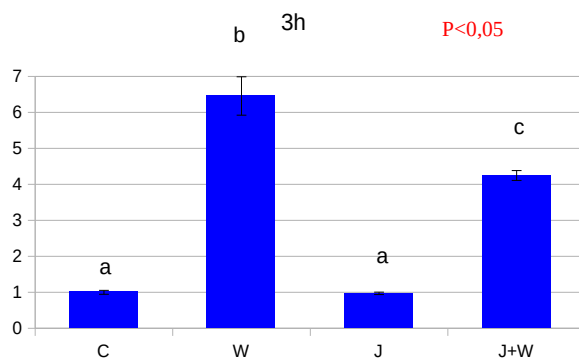


FIG.59. RISULTATI DI q-PCR RELATIVI AL GENE BBPI A 3h.

E' possibile osservare infatti che mentre l'espressione relativa al campione di controllo e trattato con JA hanno la stessa intensità, il campione ferito ha mostrato avere un'espressione molto più intensa di tutti gli altri, anche del doppio trattato. Tutto ciò è supportato dal punto di vista epigenetico da questo pattern (FIG.60).

3h

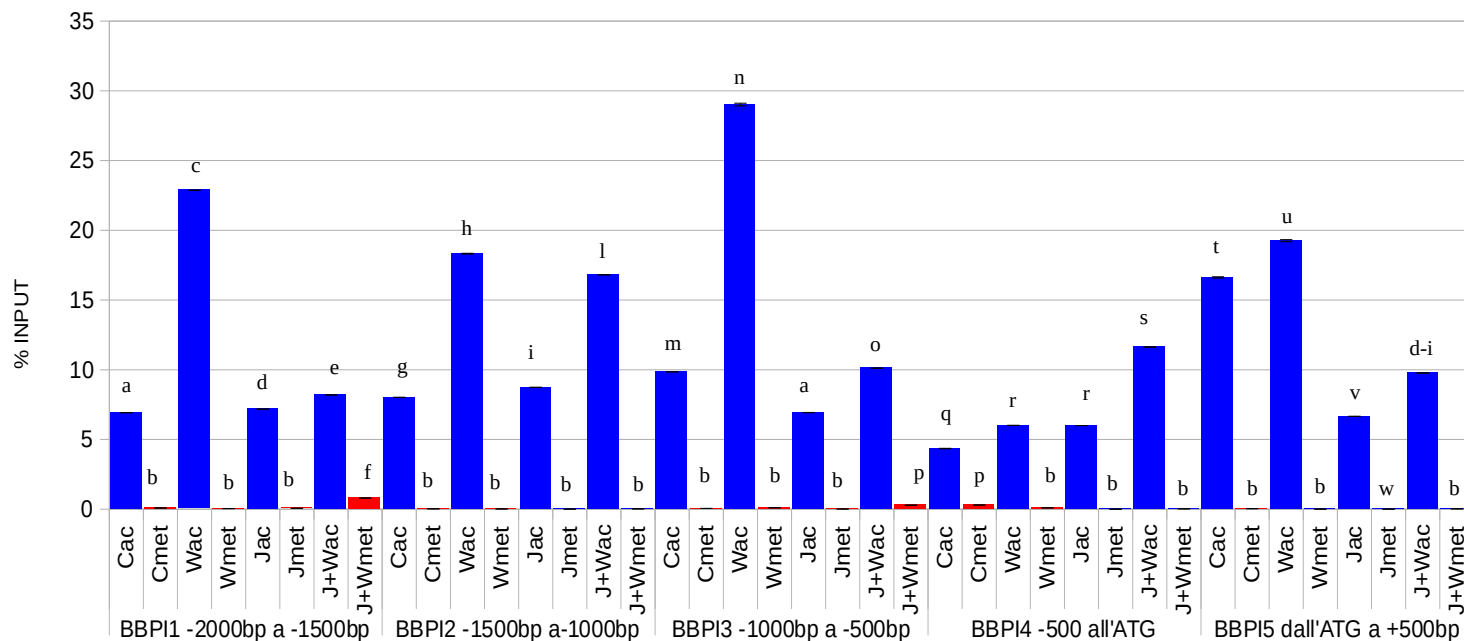


FIG.60. RISULTATI OTTENUTI DALLA q-PCR SUI CAMPIONI OTTENUTI DALLA ChIP

E' possibile osservare che nelle zone BBPI1, BBPI2, BBPI3 e BBPI5 è presente un picco statisticamente significativo di acetilazione a carico del campione ferito Wac; mentre nella zona BBPI4 tale picco statisticamente significativo è a carico del campione doppio trattato J+Wac.

La trimetilazione è presente a livelli molto bassi ma sono presenti dei livelli maggiori e statisticamente significativi a carico del campione doppio trattato J+Wmet nelle zone BBPI1 e BBPI3 e nel campione di controllo Cmet nella zona BBPI4. Nel resto dei campioni i livelli non mostrano avere differenze significative.

A 6hpw il pattern di espressione del gene BBPI sembra essere compatibile con il priming poiché nel campione doppio trattato è presente una maggiore espressione (FIG.61).

6h

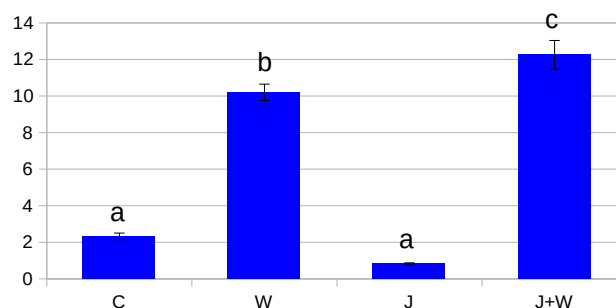


FIG.61. RISULTATI DI q-PCR RELATIVI AL GENE BBPI A 6h.

Questo pattern è supportato a livello epigenetico dal pattern di modifiche istoniche sotto riportato (FIG.62).

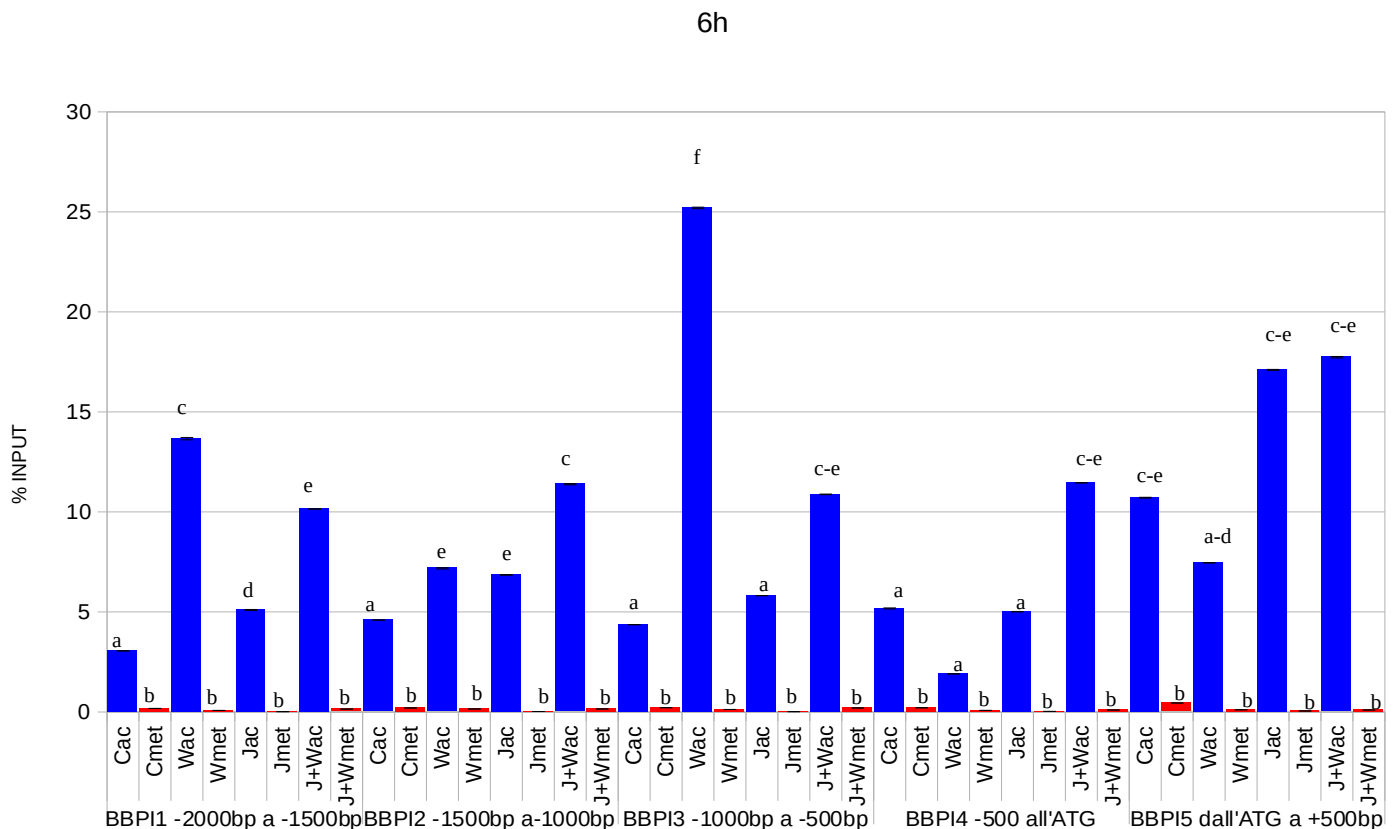


FIG.62.RISULTATI OTTENUTI DALLA q-PCR SUI CAMPIONI OTTENUTI DALLA ChIP

Nelle zone BBPI1 e BBPI3 è presente un livello di acetilazione maggiore e statisticamente significativo a carico dei campioni feriti Wac, mentre nelle zone BBPI2 e BBPI4 il livello maggiore è presente nei campioni doppio trattati J+Wac. Infine nella zona BBPI5 il picco è raggiunto dai campioni Jac e J+Wac.

Curiosamente i livelli di trimetilazione sono costanti in tutti i campioni senza avere delle differenze statisticamente significative. Questa condizione è giustificabile in quanto la trimetilazione è l'ultima delle modifiche che può subire la lisina 4 dell'istone H3 e quindi è plausibile pensare che invece siano presenti maggiori livelli di dimetilazione della stessa in quanto esse mostrano un andamento complementare (Tsuiji et al., 2006).

L'analisi di q-PCR ha evidenziato che la condizione di priming viene mantenuta anche a 24hpw come riporta il grafico sottostante (FIG.63).

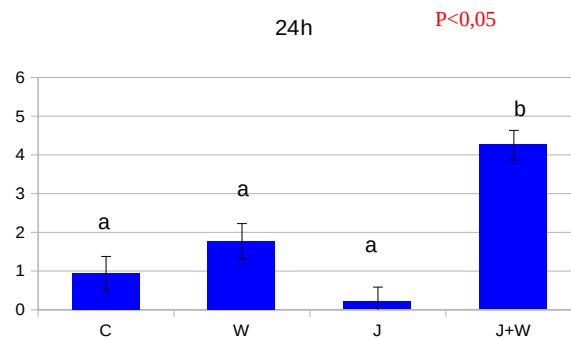


FIG.63. RISULTATI DI q-PCR RELATIVI AL GENE BBPI A 24h.

La situazione a livello epigenetico è sotto riportato (FIG.64).

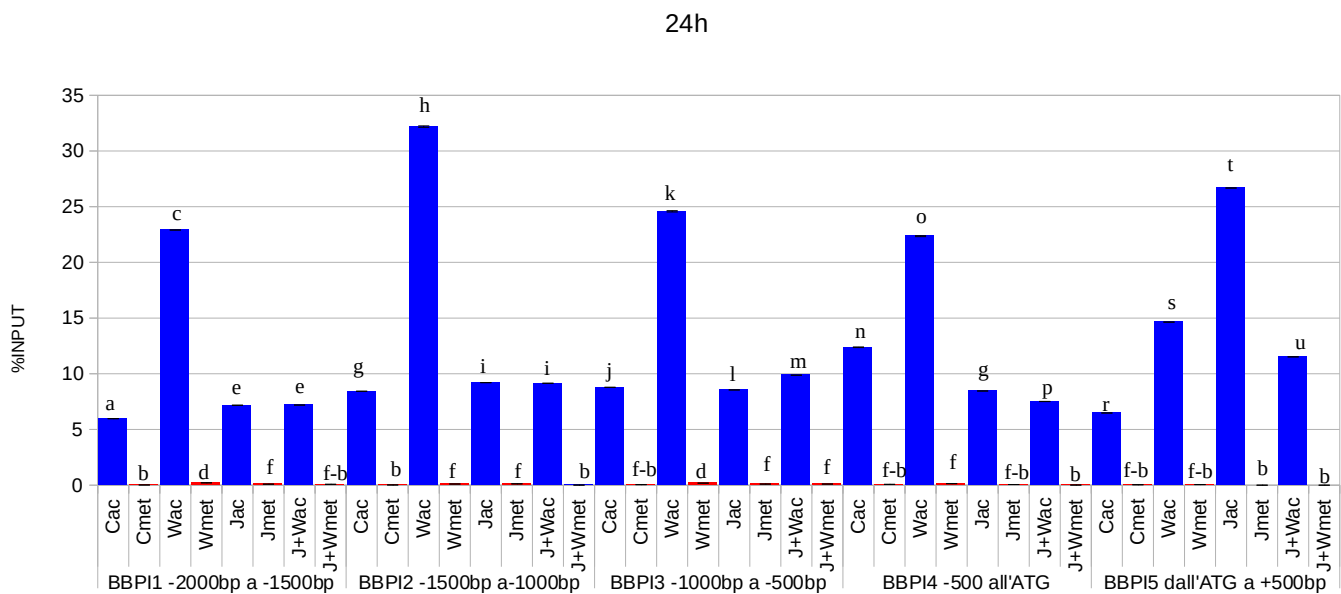


FIG.64.RISULTATI OTTENUTI DALLA q-PCR SUI CAMPIONI OTTENUTI DALLA ChIP

Nelle zone BBPI1, BBPI2, BBPI3 e BBPI4 che coprono tutta la zona del promotore analizzata fino all'ATG, è presente una maggiore presenza di acetilazione, statisticamente significativa, a carico dei campioni feriti Wac. Nella zona interna al gene BBPI5 invece il picco di acetilazione è presente a carico del campione pretrattato Jac. Tale incremento è statisticamente significativo.

La trimetilazione, presente a bassi livelli, mostra dei picchi statisticamente significativi nel campione ferito Wmet in tutte le zone analizzate.

Le analisi di q-PCR sui campioni a 48h hanno mostrato un decremento del fenomeno del priming, infatti a questo tempo di analisi sembra essere totalmente assente (FIG.65).

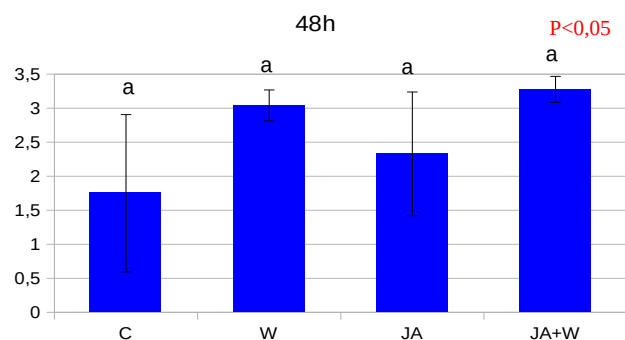


FIG.65. RISULTATI DI q-PCR RELATIVI AL GENE BBPI A 48h.

A livello epigenetico la ChIP-PCR ha rivelato il pattern sotto riportato (FIG.66).

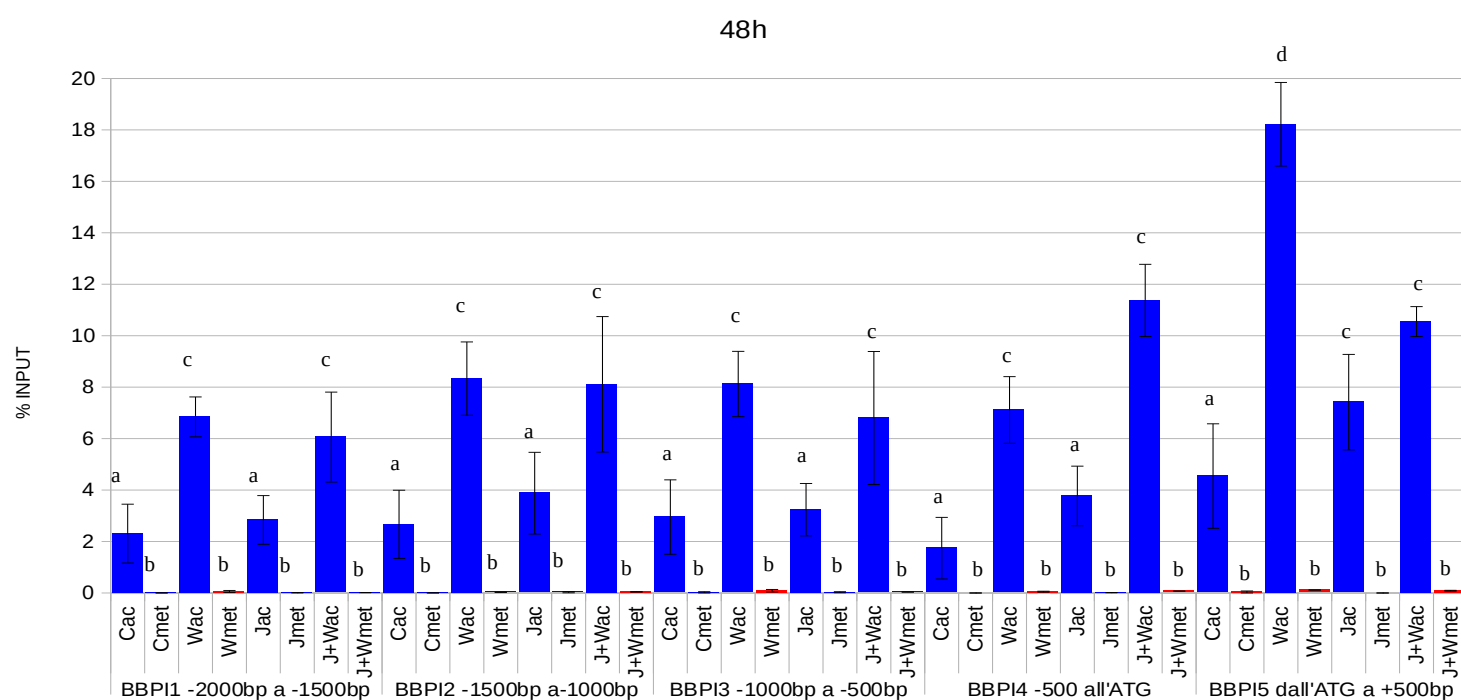


FIG.66.RISULTATI OTTENUTI DALLA q-PCR SUI CAMPIONI OTTENUTI DALLA ChIP

I livelli di acetilazione sono maggiormente presenti nei campioni feriti e doppio trattati nelle zone BBPI1, BBPI2, BBPI3, BBPI4. Entrambi questi campioni non hanno una differenza significativa tra loro, ma i campioni di controllo e pretrattato mostrano un livello significativamente inferiore in

tutte le zone. Nella zona BBPI5 l'acetilazione è maggiormente a carico del campione ferito.

La trimetilazione, sempre presente a livelli molto bassi in tutti i campioni, non mostra avere degli incrementi significativi.

I risultati appena descritti hanno permesso di avere una panoramica riguardo alcune delle modifiche istoniche note per indurre l'espressione genica. Perciò sono state prese in esame le zone del promotore di entrambi i geni BBPI e POX. Queste regioni promotrici si estendevano da -2000 bp all'ATG; inoltre si è voluto analizzare anche una parte del corpo di ciascun gene, fino a +500bp, in quanto da letteratura appare chiaro che le modifiche in questa zona vadano ad influenzare maggiormente l'espressione genica (Li et al., 2007; Li et al., 2008).

Sulla base di questi dati emerge una presenza predominante dell'acetilazione a carico della lisina 9 dell'istone H3 rispetto alla trimetilazione della lisina 4 dell'istone H3. Ciò è attendibile in quanto essa è una modifica post-traduzionale molto comune associata all'incremento dell'espressione genica (Hui et al., 2014). Questa modifica è possibile individuarla sia nei campioni relativi alla ferita, poiché hanno attivato il pathway di difesa che culmina con l'attivazione delle risposte di difesa, sia in alcuni casi nei campioni che hanno subito il pretrattamento con il metil-jasmonato e nei campioni doppio trattati J+W in cui è presente una condizione di priming. Per quanto riguarda la trimetilazione, essa risulta essere molto meno diffusa come modifica post-traduzionale in quanto è presente esclusivamente nei geni altamente trascritti. Quindi la sua assenza non è associabile ad assenza di espressione bensì ad un'espressione a livello moderati (Tsuiji et al., 2006). Infatti un'altra modifica associata a queste appena studiate è la dimetilazione della lisina 4 dell'istone H3 la quale avviene temporalmente prima della trimetilazione e la sua presenza è associata comunque ad un gene trascrizionalmente attivo (Tsuiji et al., 2006). La ChIP-PCR ha evidenziato la presenza della trimetilazione sia nei campioni pretrattati, in cui vengono innescate delle modifiche epigenetiche tali da rendere la pianta reattiva allo stress, sia nei campioni relativi alla ferita ed anche nei doppio trattati e meno frequentemente nei campioni di controllo.

Tutto ciò è plausibile perché il macchinario trascrizionale interagisce con la doppia elica di DNA a monte dell'ATG in una zona in cui le modifiche istoniche possano influenzare tale processo (Li et al., 2008). Quindi è possibile che tale macchinario interagisca in una zona che oscilla da circa -2000 bp all'ATG.

E' possibile generalizzare sul fatto che la modifica dell'acetilazione è molto più frequente rispetto alla trimetilazione, ma che entrambe hanno un effetto di induzione dell'espressione genica.

3.3.3.3 MSP in corrispondenza dell'ATG

Da uno studio eseguito da Li e colleghi nel 2008 è emerso che la metilazione del DNA può essere concomitante con la presenza di modifiche istoniche associate ad intensa attività trascrizionale come la di e tri-metilazione della lisina 4 dell'istone H3. Inoltre tale studio, ha evidenziato il livello molto elevato di metilazione del DNA di riso e che tale modifica può essere presente sia nel promotore che nella sequenza genica codificante.

Dopo aver progettato delle coppie di primers che si appaiassero nella zona dell'ATG è stato analizzato tale stato di metilazione mediante MSP.

Per quanto riguarda il gene BBPI, il quale mostra avere la metilazione a carico della citosina nella zona del promotore (-2400bp dall'ATG) analizzata nella precedente analisi di MSP, è stata individuata un'assenza di metilazione nella zona comprendente il sito di START della trascrizione (immagini non mostrate).

Questo risultato concorda con un altro lavoro di Li e colleghi del 2012 il quale ha evidenziato un decremento della metilazione in corrispondenza dell'ATG (FIG.67).

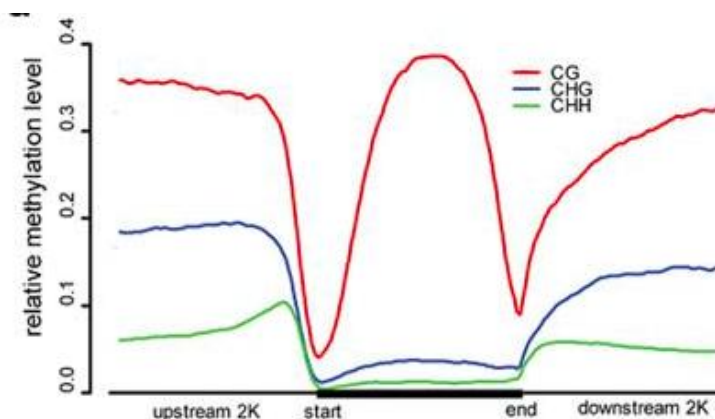


FIG.67. ANDAMENTO DELLA METILAZIONE IN CORRISPONDENZA DELL'ATG. (Adattato da Li et al., 2012).

Invece, per il gene POX non è stato possibile progettare dei primers con dei parametri accettabili da utilizzare nell'analisi di MSP.

3.4 Immunolabeling

La metilazione degli istoni è una modifica epigenetica che permette un controllo dell'espressione genica, inducendo oppure inibendo la trascrizione dei geni. Negli organismi superiori la metilazione della lisina 4 dell'istone H3 è normalmente correlata all'induzione dell'espressione genica in quanto favorisce l'accessibilità della cromatina (Litt et al., 2001), mentre risulta correlata nell'inibizione dell'espressione genica, in quanto la metilazione a carico della lisina 9 dell'istone H3 richiama i complessi proteici HP1/Swi6 per la formazione dell'eterocromatina (Bannister et al., 2001). Da un lavoro di Houben e colleghi del 2003, è emerso che il pattern di distribuzione della metilazione della lisina 9 dell'istone H3 varia in base alle dimensioni del genoma. In questo studio sono state analizzate varie specie di piante con genomi di dimensioni diverse: *Arabidopsis thaliana* ha un genoma di 170 Mbp (considerato dagli autori di piccole dimensioni) e mostra avere nelle cellule mitotiche il 15% di sequenze ripetitive relative alle metilazioni a carico della lisina 9 o della lisina 4, associate alle regioni eterocromatiche pericentromeriche, mentre *Vicia faba*, la quale possiede un genoma di 12810 Mbp (considerato dagli autori di grandi dimensioni) mostra avere nella stessa tipologia cellulare una distribuzione della metilazione uniforme sia nelle zone di eucromatina che di eterocromatina (Houben et al., 2003) (FIG.68). Inoltre, mentre in *Arabidopsis thaliana* è presente una distinzione netta tra la distribuzione di metilazione della lisina 4 dell'istone H3 associata ad aumentata espressione genica e della lisina 9 dell'istone H3 associata invece alla repressione genica, tutto ciò in *Vicia faba* non è presente, anzi risulta una omogenea distribuzione delle due modifiche lungo il genoma.

Il genoma del riso è quello di dimensioni inferiori tra i cereali ma è più vicino come dimensione a quello di *Vicia faba* mostrando un pattern di distribuzione molto simile a quello di quest'ultima (Houben et al., 2003).

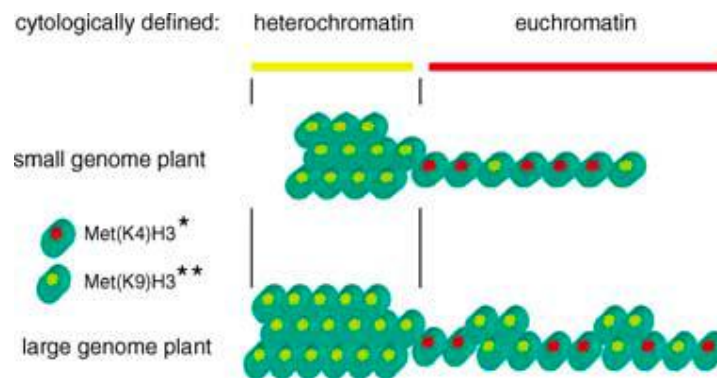


FIG.68.DISTRIBUZIONE DELLA METILAZIONE NEL GENOMA VEGETALE IN RELAZIONE ALLE DIMENSIONI. (Adattato da Houben et al., 2003)

★ = zone codificanti

★★ = zone non codificanti

In aggiunta a questa modifica epigenetica, il genoma può essere caratterizzato anche da altre tra cui la metilazione del DNA a carico della citosina in posizione 5' (5'-metilcitosina). Normalmente essa induce negli animali un silenziamento genico mediante il reclutamento di proteine la cui azione culmina con un maggiore compattamento della cromatina, inibendo così l'espressione genica. Nelle piante non è possibile fare una analogia generalizzazione in quanto la metilazione della citosina è presente anche nelle regioni trascrizionalmente attive (Li et al., 2008). Questa modifica può comportare sia un'attivazione che una repressione trascrizionale, in base alle modifiche istoniche con cui è associata (Li et al., 2012).

In questa tesi è stato oggetto di indagine lo studio della metilazione istonica mediante l'utilizzo della tecnica dell'immuno-precipitazione della cromatina (ChIP), la quale ha permesso di identificare delle modifiche istoniche associate a zone specifiche del genoma (promotore e corpo del gene). In aggiunta alla ChIP, si è cercato di comprendere la distribuzione della metilazione della citosina del DNA mediante l'approccio dell'immunolabeling. I risultati di questa analisi complementano quelli della MSP in cui il pattern di metilazione del DNA è stato analizzato in specifiche regioni della cromatina. Lo scopo è, in questo caso, verificare se fra i campioni di controllo e i trattati possa esserci una differenza nel livello di metilazione a carico della cromatina *in toto*.

Dal momento che in letteratura non è presente un protocollo *ad hoc* che permette di eseguire la tecnica dell'immunolabeling sulle foglie della pianta del riso, è stato opportuno adottare varie strategie al fine di capire quale fosse la più adatta. Tali strategie sono riportate di seguito.

3.4.1 Strategia 1: immunolabeling dei tessuti

In questa strategia sono stati utilizzati i frammenti di foglie di riso di due delle quattro condizioni sperimentali (controllo (C) e doppio trattamento con Me-JA 10 μ M seguito da ferita(J+W)), prelevati ai soliti quattro tempi di analisi (3-6-24-48 hpw). In questo caso sono stati analizzati solo due campioni per capire l'efficacia della strategia. Tali frammenti sono stati lavati in PBS 1 x ed incubati sotto vuoto over night con l'anticorpo primario anti-trimetilazione della lisina 4 dell'istone H3 da topo (dil. 1:50) in presenza di TRITON X-100 1%. Al termine dell'incubazione sono stati eseguiti alcuni lavaggi con PBS 1 x e successivamente i campioni sono stati incubati al buio con l'anticorpo secondario anti topo (dil. 1:100) coniugato con la fluoresceina isotiocianato (FITC). I campioni sono stati quindi lavati con PBS 1 x e, prima della visualizzazione al microscopio confocale, sono stati incubati per 15 minuti con 4',6-diamidino-2phenylindole (DAPI) ad una concentrazione di 0,2 μ g/ μ l per consentire la visualizzazione del nucleo. Dopo un ulteriore lavaggio in PBS 1 x i campioni sono stati montati sul vetrino.

La visualizzazione dei vetrini è stata eseguita utilizzando un microscopio confocale con cui è stato possibile ricevere sia il segnale della FITC (λ_{ex} 490 nm/ λ_{em} 525 nm) che del DAPI (λ_{ex} 350 nm/ λ_{em} 460 nm). Inoltre poiché è stato usato un microscopio confocale, è stato possibile analizzare le singole sezioni al fine di capire meglio dove si visualizzasse il segnale (FIG.69).

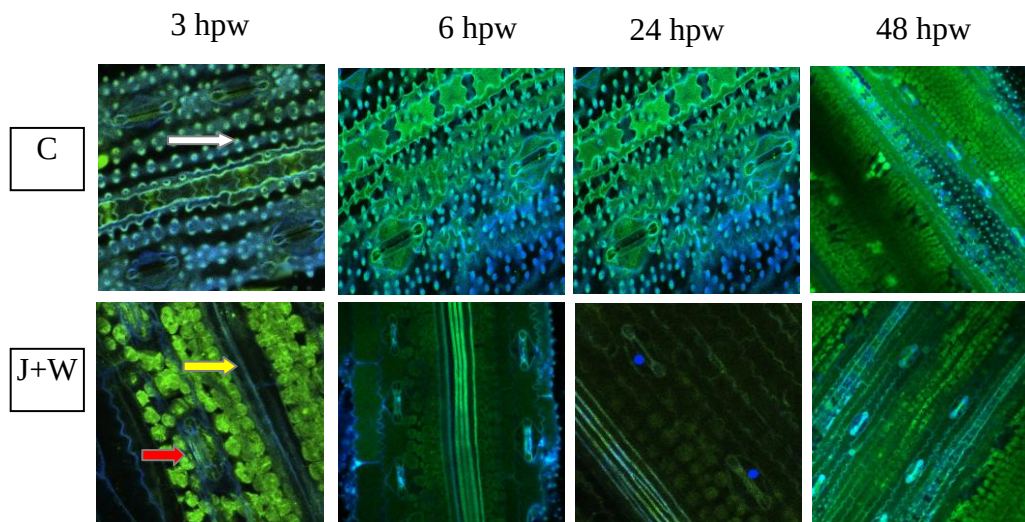


FIG.69. ANALISI DI SEZIONI DI FOGLIE DI *ORYZA SATIVA* AL MICROSCOPIO CONFOCALE. C= campione di controllo; J+W= campione pre-trattato con Me-Ja 10 μ M e ferito; hpw= ore dal trattamento della ferita. Blu: DAPI; Verde: FITC.

Dalle immagini derivate dalle sezioni di tessuto acquisite con il microscopio confocale è possibile comprendere meglio l'organizzazione tissutale della foglia di riso. In essa è stato possibile individuare molti tipi cellulari: le cellule di guardia che formano gli stomi (freccia rossa), le cellule sussidiarie ad esse associate per favorire il meccanismo di apertura e chiusura degli stomi, le cellule presenti nell'epidermide, situata sotto la cuticola, molto ricche di cloroplasti, le *silica cells* (freccia bianca) (<http://www-plb.ucdavis.edu/labs/rost/Rice/Leaves/dermal.html>), visualizzabili come puntini che sono caratteristici di piante che crescono in ambienti umidi o acquosi. Le *silica cells* favoriscono la sopravvivenza in tali condizioni poiché il composto del silicio svolge un ruolo importante della difesa della pianta verso tutti i tipi di stress (Epstein, 2009; Currie and Perry, 2007; Kim et al., 2014). Infine è stato possibile individuare anche dei vasi linfatici (freccia gialla). Inoltre è possibile osservare che in tutti i campioni analizzati gli stomi sono chiusi e ciò può essere imputabile sia al fatto che nel momento del prelievo le piante si trovavano nella fase luce del fotoperiodo, oppure che le piante si trovassero in una condizione di stress (trattamento con fitormone associato alla ferita): entrambe le condizioni generalmente provocano la chiusura degli stomi. Vista la complessità delle immagini ottenute in quanto sono presenti tanti tipi cellulari diversi, l'attenzione è stata posta soprattutto sugli stomi poiché essi sembrano mostrare una fluorescenza verde associata alla presenza di 5'metilcitosina che varia tra i campioni. Tutto questo è difficile individuarlo negli altri tipi cellulari. Inoltre sembra che il DAPI non sia penetrato correttamente e ciò porta ad ipotizzare che anche gli anticorpi potessero aver avuto problemi nell'ingresso dei tessuti.

Nonostante ciò è possibile ottenere alcune informazioni da queste immagini, ovvero che ci sia una clusterizzazione del segnale verde nei campioni doppio trattati a 3h nelle cellule formanti lo stoma come le cellule di guardia e quelle sussidiarie, concordando con la presenza di un maggior livello di metilazione associata all'espressione genica nei campioni primed e quindi stressati. Mentre nelle altre condizioni non è stato possibile osservare un incremento significativo della fluorescenza verde nei campioni doppio trattati rispetto a quelli di controllo.

Tutto ciò ha reso necessario lo sviluppo di una nuova strategia di trattamento dei campioni che permettesse un migliore ingresso dei reagenti. Tale strategia è riportata di seguito.

3.4.2 Strategia 2: degradazione enzimatica

I frammenti delle foglie sono stati sottoposti ad un trattamento con un cocktail di enzimi che attaccano la parete, favorendo una maggiore accessibilità dei coloranti nella cellula come illustrato da Oakeley et al., 1997. Al termine del trattamento i campioni sono stati lavati utilizzando PBS 1 x ed incubati con l'anticorpo primario e secondario utilizzando le stesse modalità descritte nella strategia 1.

Prima della visualizzazione i campioni sono stati incubati con DAPI.

Ancora una volta l'analisi al confocale ha permesso di visualizzare bene le cellule di guardia dove è stato possibile visualizzare i nuclei colorati con il DAPI. Relativamente all'anticorpo anti-5'-metilcitosina non è stato possibile osservare una buona visualizzazione in tutti i campioni (immagini non mostrate), tuttavia in quelli doppio-trattati sembra esserci una maggiore presenza di fluorescenza relativa alla 5'-metilcitosina.

Dal momento che non è stato possibile visualizzare correttamente la fluorescenza degli altri tipi cellulari, si è deciso di applicare questa tecnica di immunolabeling sui protoplasti. Infatti lo scopo è vedere la variazione di metilazione nei campioni a livello di tutte le cellule.

3.4.3 Strategia 3: estrazione dei protoplasti

I protoplasti relativi a ciascun campione sono stati incubati over night con Ab primario (dil. 1:200) in presenza di TRITON X100 1%. Dopo una breve centrifugata a 700 rpm, è stato rimosso il supernatante ed il pellet contenente i protoplasti è stato lavato con PBS 1 x e nuovamente centrifugato. Quindi è stata eseguita l'incubazione con l'Ab secondario coniugato con la tetrametilrodamina (TRITC)(dil 1:400) in presenza di TRITON X100 1% a 37°C per un'ora. Dopo due lavaggi con PBS 1 x, i campioni sono stati incubati per 15 minuti con DAPI a temperatura ambiente.

Sono stati preparati i vetrini da visualizzare al confocale dopo aver eseguito un breve lavaggio con PBS 1 x.

I protoplasti hanno un'organizzazione interna molto caratteristica in cui la maggior parte del volume è occupato dal vacuolo, mentre tutti gli organelli citoplasmatici sono addensati ad un polo. Infatti la sua visualizzazione in campo chiaro permette di vedere delle strutture a forma di lunette di colorazione verde che rappresentano tutti gli organelli ammassati (freccia rossa), di cui la maggior

parte è costituita dai cloroplasti, mentre la restante parte che non viene visualizzata in quanto trasparente, è costituita dal vacuolo (freccia nera)(FIG70).

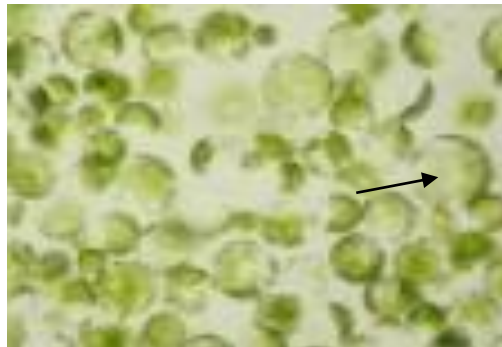


FIG70. VISUALIZZAZIONE DI PROTOPLASTI AL MICROSCOPIO OTTICO.

3.4.3.1 Visualizzazione al microscopio confocale

In questo caso per la visualizzazione al confocale è stata utilizzata una diversa lunghezza d'onda sia per l'eccitazione che per l'emissione dal momento che è stato utilizzato un altro fluorocromo, la TRITC ($\lambda_{\text{ex}} 557 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 576 \text{ nm}$), scelto per cercare di evitare una sovrapposizione del segnale relativo all'autofluorescenza dovuta alla clorofilla (680 nm) oppure a qualsiasi altro fluorocromo presente nella pianta.

Utilizzando il microscopio confocale è stato possibile acquisire varie immagini: l'immagine a contrasto (DIC) e l'immagine della rilevazione di ogni canale (DAPI e TRITC) separatamente. Infine è stato possibile ottenere il merge dei due canali (DAPI+TRITC) presentato nella figura 71.

Dalle immagini è possibile notare che la colorazione blu del DAPI tende quasi a coprire la parte in cui tendono ad addensarsi gli organelli. Ciò è possibile in quanto il DAPI lega il DNA che nel protoplasto è presente sia nel nucleo che nei plastidi e nei mitocondri.

Invece la fluorescenza rilevata dalla TRITC ci permette di individuare la 5'-metilcitosina presente nel nucleo poiché è noto da letteratura che gli altri organelli contenenti il DNA sono scarsamente metilati (Jaffè et al., 2008).

Quindi, dalla sovrapposizione delle due fluorescenze è possibile ottenere delle informazioni circa la localizzazione del nucleo ed il suo grado di metilazione (FIG.72).

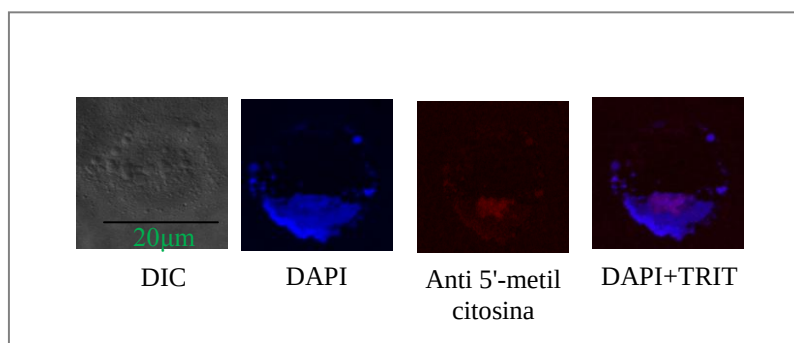


FIG.71. ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI AL CONFOCALE

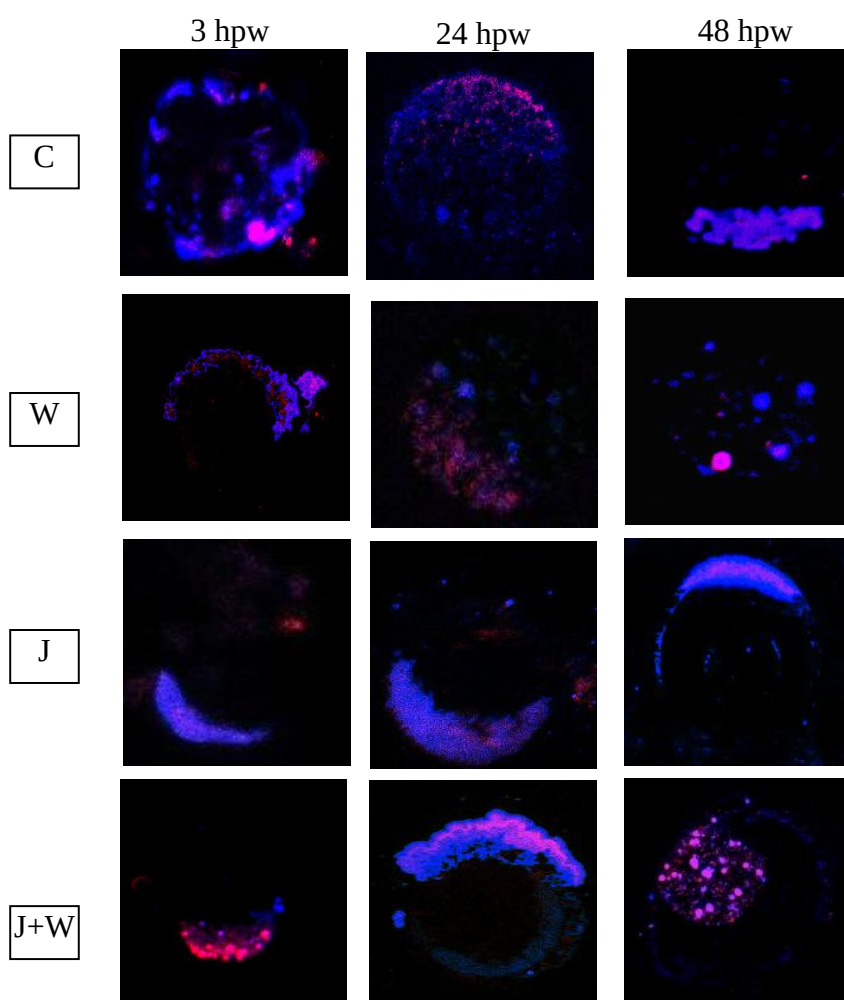


FIG.72. PROTOPLASTI AL MICROSCOPIO CONFOCALE. C= campione di controllo; W= campione ferito; J= campione pre-trattato con Me-Ja 10µM; J+W= campione pre-trattato con Me-Ja 10µM e ferito; hpw= ore dal trattamento della ferita. Blu: DAPI, DNA; rosso: TRITC, anti 5'-metilcitosina.

Dai campioni analizzati (FIG.72) è evidente il fatto che la fluorescenza relativa alla 5'-metilcitosina è presente anche nei campioni di controllo, ma ciò è accettabile in quanto i livelli di metilazione nelle piante sono molto elevati (Zhang et al., 2012; Sau et al., 2013), in particolar modo nella pianta del riso (Li et al., 2012) dove circa la metà dei geni mostrano essere metilati nel loro promotore o nella sequenza codificante (Li et al., 2008). Tuttavia è anche possibile osservare un netto incremento nei campioni PRIMED e/o feriti rispetto al set di campioni di cui fa parte. Questo dato è stato confermato anche mediante l'utilizzo di un software di analisi di immagine. Ciò significa che è presente una correlazione positiva tra lo stress e l'incremento della metilazione del DNA.

Da tutto ciò si evince che la tecnica di estrazione dei protoplasti rende il campione da analizzare molto più permeabile rispetto alle strategie riportate precedentemente. Tuttavia i protoplasti richiedono la massima delicatezza durante i trattamenti poiché ogni minimo stress potrebbe indurre la loro lisi ed inoltre devono essere utilizzati entro poche ore dalla loro estrazione e questo non ha reso possibile il prelievo delle 6h.

Sulla base delle immagini è possibile affermare che è presente un discreto livello di metilazione costante nelle cellule del riso che però viene incrementato dopo lo stress e quindi è presente una correlazione positiva tra questi fenomeni.

Poiché i risultati delle analisi di espressione genica fanno concludere che il pre-trattamento e/o lo stress della ferita inducono un incremento dell'espressione dei geni di difesa, è possibile concludere che l'incremento della metilazione del DNA è associata all'espressione dei geni responsivi allo stress i quali permettono alla pianta di reagire adeguatamente.

3.4.4 Conclusione

Questo esperimento ha permesso di confermare ciò che in questa tesi è stato studiato più approfonditamente con altre tecniche. Chiaramente è da considerarsi un ulteriore completamento che non può essere alternativo alle tecniche di epigenetica utilizzate poiché esse sono *ad hoc* per questo tipo di studio non solo come metodologie di esecuzione ma anche perché l'analisi è mirata su geni specifici. Tuttavia è un modo aspecifico che permette di comprendere la profondità del fenomeno studiato e vederne i suoi effetti su larga scala.

4.1 Conclusioni e prospettive future

Il priming si attua come una condizione fisiologica che rende le cellule più reattive allo stress in quanto nel momento in cui si instaura questo fenomeno avvengono nella cellula e quindi nella pianta dei fenomeni che determinano un risveglio del meccanismo di difesa senza attivarlo completamente. Tra i vari effetti del priming è possibile individuare l'attivazione di fattori di trascrizione associati alla difesa, l'accumulo di trascritti, attivazione parziale o totale della trasduzione del segnale, cambiamenti metabolici e non ultimi, cambiamenti di natura epigenetica, i quali regolano l'accessibilità del DNA all'apparato trascrizionale.

Tutti questi fattori influenzano le risposte della pianta che quindi si attiveranno in maniera più rapida e quindi efficace in seguito alla percezione dello stress. Inoltre in letteratura sono anche riportati esempi in cui tale fenomeno non solo può essere mantenuto nel tempo, ma anche ereditato dalla progenie.

In questa tesi si è posta l'attenzione su come sia possibile indurre lo stato di priming in *Oryza sativa* spp. *Japonica* verificando tale induzione mediante l'analisi di geni che da letteratura sono inducibili da stress. Questo studio è stato eseguito su una pianta monocotiledone modello di cui è noto il genoma, che ha le dimensioni più piccole tra le graminacee. Inoltre, la pianta del riso sfama più della metà della popolazione mondiale, quindi appare molto evidente l'importanza dello sviluppo di tecniche che permettono di arginare le perdite di raccolto.

Nella prima parte di questo progetto di dottorato si è indotto il priming utilizzando il fitormone acido salicilico (SA) il quale ha un ruolo centrale nel pathway di difesa a stress biotici. Utilizzando basse dosi di tale fitormone è stato possibile rendere le piante di riso primed e quindi più resistenti allo stress a cui sono state sottoposte successivamente, cioè l'infezione con spore di *Fusarium culmorum*. Le analisi di RT-PCR hanno mostrato un andamento interessante per quanto riguarda alcuni geni SA-responsivi: essi infatti mostravano avere una maggiore espressione in piante pretrattate con acido salicilico e poi infettate (condizione di priming) rispetto alle piante solamente infettate (condizione di stress). Tutto ciò ha confermato un ruolo nel priming di geni come CEBIP, CHITINASI, MAPK5, BISAMT, WRKY71. Inoltre, appartenendo a famiglie diverse tali geni hanno permesso di fare speculazioni circa il pathway coinvolto in questo stress. Tale pathway vede la degradazione della parete fungina ad opera di enzimi come le chitinasi e successiva percezione dei PAMP così ottenuti da parte di proteine recettori di membrana come CEBIP, le quali attivano una cascata di trasduzione del segnale che comprende le MAPK. Tale segnale arriva fino al nucleo in cui si attivano delle proteine coinvolte nell'espressione genica come i fattori di trascrizione, ne è

un esempio WRKY71, e le metil-transferasi, come BISAMT. In parallelo a questo studio che ha permesso di delucidare una parte del meccanismo del priming indotto da acido salicilico, è stato anche verificato il coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno nelle risposte di difesa della pianta. Mediante un approccio che ha previsto l'utilizzo della molecola 2,7 DCFH₂-DA la quale viene ossidata dall'H₂O₂, con produzione della molecola fluorescente 2,7-DCF, è stato possibile osservare al microscopio confocale la risposta ossidativa della pianta di riso pretrattata utilizzando diverse concentrazioni di acido salicilico e successivamente infiltrata con LOS. Visualizzando la fluorescenza relativa al prodotto di reazione 2,7 DCF è stato possibile osservare indirettamente una produzione maggiore di H₂O₂ nelle piante pretrattate con acido salicilico alla stessa concentrazione utilizzata per l'induzione del priming. Tutto ciò ha permesso di concludere che il pretrattamento con acido salicilico alla concentrazione di 100µM ha un effetto protettivo sulla pianta di riso poiché induce un risveglio del sistema di difesa, ottimizzando la risposta allo stress.

Nella seconda parte di questo progetto di dottorato si è indotto il priming utilizzando il derivato di un altro fitormone vegetale che ricopre un ruolo centrale nella risposta a stress di natura abiotica, l'acido jasmonico. Quindi è stato verificato il coinvolgimento di geni JA-responsivi accoppiando il pretrattamento con JA ad uno stress abiotico, cioè la ferita. Analisi di RT-PCR hanno confermato il coinvolgimento nel meccanismo del priming di tre geni: BBPI, POX, LOX. Dati di q-PCR non hanno confermato l'esistenza del priming per LOX, mentre l'effetto priming è stato confermato per BBPI e POX.

Successivamente abbiamo voluto verificare se l'effetto priming fosse associato a modifiche epigenetiche. In particolare, è stato valutato il grado di metilazione del DNA mediante Methylation Specific PCR (MSP) e modifiche istoniche mediante immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) sui promotori dei geni BBPI e POX.

Negli esperimenti di ChIP sono state investigate due modifiche istoniche correlabili con un incremento dell'espressione genica: l'acetilazione della lisina 9 dell'istone H3 e la trimetilazione della lisina 4 dell'istone H3. Questa analisi ha permesso di verificare la presenza di queste modifiche sia nei promotori che in una parte del corpo dei geni considerati. Dai risultati ottenuti è stato possibile mettere in evidenza una maggiore presenza di acetilazione rispetto alla trimetilazione. Inoltre tali modifiche sono risultate essere più frequenti nei campioni stressati e /o primed.

Questi risultati sono stati integrati dall'analisi della metilazione del DNA, a carico della 5'-metilcitosina in zone specifiche nei promotori dei due geni. Sfortunatamente i risultati di MSP non hanno evidenziato una correlazione tra stress ed incremento della metilazione delle zone promotrici prese in esame.

Infine, per verificare un effetto dello stress sulla metilazione del DNA, è stato eseguito un esperimento di immunolabeling su protoplasti estratti dal mesofillo di foglie di riso. La visualizzazione al confocale per stimare la quantità della 5'-metilcitosina, ha permesso di osservare un aumento del segnale relativo alla modifica in esame nei campioni pretrattati con metil-jasmonato e successivamente feriti rispetto ai campioni solo stressati, pretrattati o di controllo. Ciò fa concludere che è presente una correlazione positiva tra stress ed incremento della metilazione del DNA. Tutto ciò in quanto tale modifica non è esclusivamente correlabile al silenziamento genico, anzi è possibile osservarla sia nel promotore che nel corpo di geni espressi.

Nell'ultima parte di questo progetto è stato iniziato lo studio del proteoma di riso nelle condizioni di priming e di successivo stress mediante ferita. In via preliminare, è stata effettuata un'analisi su gel di poliacrilammide monodimensionale degli estratti proteici ricavati dalle quattro condizioni sperimentali già usate per l'analisi dell'espressione genica. In particolare, sono stati utilizzati estratti proteici provenienti da piante primed, da piante ferite, e da piante ferite dopo il trattamento di priming; naturalmente, sono stati analizzati anche estratti da piante di controllo. Dall'analisi densitometrica del gel è stato possibile verificare che esiste un'espressione differenziale delle proteine nei vari campioni. Queste prime analisi hanno fornito risultati incoraggianti che ci consentiranno di approfondire lo studio del proteoma mediante analisi bidimensionale e successiva spettrometria di massa in modo tale da identificare le proteine differenzialmente espresse.

Nel futuro sarebbe interessante approfondire ulteriormente le analisi epigenetiche, mediante ChIP utilizzando un altro anticorpo come quello che consente di verificare la dimetilazione della lisina 4 dell'istone H3, infatti questa modifica istonica è strettamente correlata e complementare alla trimetilazione della K4H3.

Infine sarebbe interessante eseguire un'analisi completa della metilazione del DNA, utilizzando la tecnica Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA), la quale permetterebbe di analizzare i loci genici.

BIBLIOGRAFIA

Adie B. A. T., Perez-Perez J., Perez-Perez M.M., Godoy M., Sanchez-Serrano J. J., Schmelz A. E., Solano R. (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell*, vol. 19, pag. 1665–1681.

Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, vol. 124(4), pag. 783–801.

Allen MD, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, Tateno M, Suzuki M. (1998) A novel mode of DNA recognition by a β -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *The EMBO Journal.*, vol. 17(18), pag. 5484–96.

Anderson J.P., Ellet Badruzsaufari E., Schenk M. P., Manners J. M., Desmond O. J., Christina Ehlert C., Maclean D. J., Ebert P. R., Kazan K. (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, vol. 16, pag. 3460–3479.

Ashikawa I. (2002) Gene-associated CpG islands and the expression pattern of genes in rice. *DNA RESEARCH*, vol. 9, pag. 131-134.

Atkinson M.M. and Baker C.J. (1989) Role of the plasmalemma H⁺-ATPase in *Pseudomonas syringae*-induced K⁺/H⁺ exchange in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* vol. 91, pag. 298-303.

Ausubel M. F. (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology* vol. 6, pag. 973 – 979.

Baker C.J. and Orlandi E.W. (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* vol. 33, pag. 299-321.

Che F.-S., Nakayama Y., Tanaka N., Iwani M., Yoshida T., Takayama S., Kadota I., Isogai A. (2000) Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response

in cultured rice cells. *J. Biol. Chem.*, vol. 275, pag. 32347–32356.

Chen K., Arora R. (2012) Priming memory invokes seed stress-tolerance. *Environ. Exp. Bot.* In press

Chen X., Chern M., Canlas P. E., Jiang C., Ruan D., Cao P., Ronald P.C. (2010) A conserved threonine residue in the juxtamembrane domain of the XA21 pattern recognition receptor is critical for kinase autophosphorylation and XA21-mediated immunity. *J Biol Chem*, vol. 285, pag. 10454–10463.

Chen X., Ronald P. C. (2011) Innate immunity in rice, *Trends in Plant Science*, vol. 16(8), pag. 451-459.

Chen Z., Iyer S., Caplan A., Klessig D. F., Fan B. (1997) Differential Accumulation of Salicylic Acid and Salicylic Acid-Sensitive Catalase in Different Rice Tissues. *Plant Physiol*, vol. 114, pag. 193-201.

Chisholm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J. (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, vol. 124, pag. 803–814.

Cocolbet J., Hirt H. (2008) Arabidopsis MAPKs: A complex signaling network involved in multiple biological processes. *BIOCHEM J.*, vol.413, pag. 217-226.

Cohn J., Sessa G. and Martin G. B. (2001) Innate immunity in plants. *Current Opinion in Immunology*, vol.13, pag.55–62.

Conrath U., Beckers G. J. M., Flors V., García-Agustín P., Jakab G., Mauch F., Newman M.-A., Pieterse C. M. J., Poinssot B., Pozo M. J., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne D., Zimmerli L., Mauch-Mani B. (2006) Priming: Getting Ready for Battle, *The American Phytopathological Society*, vol. 19, pag. 1062–1071

Currie H. A., Perry C. C. (2007) Silica in Plants: Biological, Biochemical and Chemical Studies. *Annals of Botany*, vol. 100, pag. 1383–1389.

Dardick C., Ronald P. (2006) Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. *PLoS Pathog* vol.2: e2.

Daw B. D., Zhang L. H., Wang Z. Z (2008) Salicylic acid enhances antifungal resistance to *Magnaporthe grisea* in rice plants. *Australasian Plant Pathology*, vol. 37, pag. 637-644.

De Vos M., Van Zaanen W., Koornneef A., Korzelius J. P., Dicke M., Van Loon L. C, Pieterse C. M. J. (2006) Herbivore-induced resistance against microbial pathogens in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* vol. 142, pag. 352–363.

Dellaporta S. L., Wood J., Hicks J. B. (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* Fall., vol. 1(4), pag. 19-21.

Desaki Y., Miya A., Venkatesh B., Tsuyumu S., Yamane H., Kaku H., Minami E., Naoto Shibuya N. (2006) Bacterial lipopolysaccharides induce defense responses associated with programmed cell death in rice cells. *Plant Cell Physiol.* vol. 47, pag. 1530–1540.

Desveaux D., Marechal A., Brisson N. (2005) Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. *TRENDS in Plant Science*, vol. 10(2), pag. 95-102.

Epstein E. (2009) Silicon: its manifold roles in plants. *Annals of Applied Biology*, vol 155(2), pag. 155-160.

Erbs G., Newman, M.-A. (2003) The role of lipopolysaccharides in induction of plant defense responses. *Mol. Plant Pathol.* Vol. 4, pag. 421-425.

Eulgem T., Rushton P. J., Robatzek S., Somssich I. E. (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in plant science*, vol. 5, pag. 199-206.

Eulgem T., Somssich I. E. (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 10, pag. 366–371.

Farooq M., Basra S.M.A., Hafeez K. (2005) Seed invigoration by osmo hardening in *indica* and

japonica rice. *Seed Sci. Technol.* vol.33, pag. 25-32.

Ganesan V., Thomas G. (2001) Salicylic acid response in rice: influence of salicylic acid on H₂O₂ accumulation and oxidative stress. *Plant Science*, vol. 160, pag. 1095–1106.

Geetha R. (1992) Seed invigouration treatments on production potential and storability of rice (*Oryza sativa* L.). M. Sc. (Ag) Thesis, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore

Gendrel A.V., Lippman Z., Martienssen R. and Colot V. (2005) Profiling histone modification patterns in plants using genomic tiling microarrays. *NATURE METHODS*, vol. 2(3) pag.213-218.

Gerold J.M., Beckers A., Jaskiewicz M., Liu Y , Underwood W. R., He S. Y., Zhang S., Conrath U. (2009) Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 Are Required for Full Priming of Stress Responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, vol. 21, pag. 944–953.

Gomez-Gomez L., Boller, T. (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell*, vol. 5, pag. 1003–1011.

Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P.B., Puech-Pages V., Dun E.A.,Pillot J.P., Letisse F., Matusova R., Danoun S., Portais J.C.,Bouwmeester H., Becard G., Beveridge C.A., Rameau C., Rochange S.F. (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, vol. 455, pag.189–194.

Grant M., Lamb C. (2006) Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol*, vol. 9, pag. 414–420.

Gu K., Yang B., Tian D., Wu L., Wang D., Sreekala C., Yang F., Chu Z., Wang G. L., White F. F., Yin Z. (2005) R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, vol. 435, pag.1122–1125.

Gupta V., Willits M.G., Glazebrook J. (2000): *Arabidopsis thaliana* EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Mol Plant Microbe Interact*, vol. 13, pag. 503-511.

- Gus-Mayer S., Naton B., Hahlbrock K., Schmelzer E.** (1998) Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* , vol. 95, pag. 8398- 8403.
- Hashimoto C., Hudson L. K., Anderson K.V.** (1988) The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, vol. 52(2), pag. 269–279.
- Heazlewood, J. L., Howell, K. A., Whelan, J., Millar, A. H.** (2003) Toward an analysis of the rice mitochondrial proteome. *Plant Physiol.*, vol. 132, pag. 230–242.
- Heil M., Ton J.** (2008) Long-distance signalling in plant defence, *Trends in Plant Science*, vol. 13, pag. 264-272.
- Henry G., Thonart P., Ongena M.** (2012) PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors, vol. 16(2), pag. 257-268.
- Hernando-Amado S., González-Calle V., Carbonero P., Barrero-Sicilia C.** (2012) The family of DOF transcription factors in *Brachypodium distachyon*: phylogenetic comparison with rice and barley DOFs and expression profiling. *BMC Plant Biology*, vol.12, pag. 202-215.
- Inohara, N., Ogura, Y., and Nuñez, G.** (2002) Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol*, vol. 5, pag. 76–80.
- Iyer A. S., McCouch S. R.** (2004) The rice bacterial blight resistance gene xa5 encodes a novel form of disease resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.*, vol. 17, pag. 1348–1354.
- Jakab G., Ton J., Flors V., Zimmerli L., Métraux J. P., and Mauch-Mani, B.** (2005) Enhancing Arabidopsis salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiol.*, vol.139, pag. 267-274.
- Jiang G.-H., Xia Z.-H., Zhou Y.-L., Wan J., Li D.-Y., Chen R.-S., Zhai W.-X., Zhu L.-H.** (2006) Testifying the rice bacterial blight resistance gene xa5 by genetic complementation and further analyzing xa5 (Xa5) in comparison with its homolog TFIIAgamma1. *Mol. Genet. Genomics*, vol. 275, pag. 354–366.

Jin H., Martin C. (1999) Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Molecular Biology*, vol. 41(5), pag. 577-585.

Jones J.D., Dangl J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, vol. 444, pag. 323–329.

Kang H.-G., Singh K. (2000) Characterization of salicylic acid responsive Arabidopsis DOF domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. *Plant J.*, vol. 21, pag. 329–339.

Kawai T., Akira S. (2005) Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology.*, vol.17 (4), pag. 338-344.

Kawasaki T., Henmi K., Ono E., Hatakeyama S., Satoh H., Shimamoto K. (1999) The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 96, pag. 10922–10926.

Kessler A., Halitschke R., Diezel C., Baldwin I. T. (2006) Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuata*. *Oecologia*, vol. 148, pag. 280-292.

Kim S. T., Cho K. S., Yu S., Kim S. G., Hong J. C., Han C.-D., Bae D. W., Nam M. H., Kang K. Y. (2003) Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells. *Proteomics*, vol. 3, pag. 2368-2378.

Kim S.T., Kang Y. H., Wang Y., Wu J., Park Z. Y., Rakwal R., Agrawal G. K., Lee S. Y., Kang K. Y. (2009) Secretome analysis of differentially induced proteins in rice suspension-cultured cells triggered by rice blast fungus and elicitor. *Proteomics*, vol. 9, pag. 1302-1313.

Kim Y.-H., Khan A. L., Kim D.-H., Lee S.-Y., Kim K.-M., Muhammad Waqas M., Jung H.-Y., Shin J.-H., Kim J.-G., In-Jung Lee I.-J. (2014) Silicon mitigates heavy metal stress by regulating P-type heavy metal ATPases, *Oryza sativa* low silicon genes, and endogenous phytohormones, *BMC Plant Biology*, vol. 14:13.

Kishi-Kaboshi M., Okada K., Kurimoto L., Murakami S., Umezawa T., Shibuya N., Yamane

H., Miyao A., Takatsuji H., Takahashi A., Hirokita H. (2010) MAMP-responsive MAPK cascades regulate phytoalexin biosynthesis. *Plant Signal. Behav.*, vol. 5, pag. 1653– 1656.

Kisu Y., Ono T., Shimofurutani N., Suzuki M., Esaka, M. (1998) Characterization and Expression of a New Class of Zinc Finger Protein that Binds to Silencer Region of Ascorbate Oxidase Gene. *Plant Cell Physiol.* 39: 1054–1064

Kloek A.P., Verbsky M.L., Sharma S.B., Schoelz J.E., Vogel J., Klessig D.F., Kunkel B.N. (2001) Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant J*, vol. 26, pag. 509-522.

Komatsu S., Kajiwarra H., Hirano H. (1993) A rice protein library: a data-file of rice proteins separated by two- dimensional electrophoresis. *Theor Appl. Gen.*, vol. 86, pag. 935-942.

Komatsu S., Muhammad A., Rakwal R. (1999) Separation and characterization of proteins from green and etiolated shoots of rice (*Oryza sativa* L.): Towards a rice proteome. *Electrophoresis*, vol. 20, pag. 630-636.

Krause K., Herrmann U., Fuß J., Miao Y., Krupinska K. (2009) Whirly proteins as communicators between plant organelles and the nucleus? *Endocytobiosis Cell Res.*, vol. 19, pag. 51-62.

Lauria M., Rossi V. (2011) Epigenetic control of gene regulation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1809, pag. 369-378.

Lawton, K.A., Potter, S.L., Uknes, S., Ryals, J. (1994) Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell*, vol. 6, pag. 581–588.

Lee S. W., Han S. W., Sririyanyum M., Park C. J., Seo Y .S., Ronald P. C. (2009) A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. *Science*, vol.326, pag. 850–853.

Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J-M., Hoffmann A. J. (1996) The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in

Drosophila Adults. *Cell*, vol.86(6), pag.973–983.

Levine A., Tenhaken R., Dixon R. and Lamb C. (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive response. *Cell*, vol. 79, pag. 583-593.

Li G., Hall T. C., Holmes-Davis R. (2002) Plant chromatin: development and gene control, *BioEssays*, vol 24(3), pag. 234-243.

Li H., Yan S., Zhao L., Tan J., Zhang Q., Gao F., Wang P., Hou H., Li L. (2014) Histone acetylation associated up-regulation of the cell wall related genes is involved in salt stress induced maize root swelling, *BMC Plant Biology*, vol.14:105.

Li J., Wen J., Lease K.A., Doke J.T., Tax F.E., and Walker J.C. (2002) BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* vol. 110, pag. 213–222.

Li X., Wang X., He K., Ma Y, Su N., He H., Viktor Stolc V., Tongprasit W., Jin W., Jiang J., Terzaghi W., Li S., Wang Deng X. (2008) High-Resolution Mapping of Epigenetic Modifications of the Rice Genome Uncovers Interplay between DNA Methylation, Histone Methylation, and Gene Expression. *The Plant Cell*, vol. 20, pag. 259–276.

Li, B., Carey, M., Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell*, vol. 128, pag. 707–719.

López A.,Ramírez V.,García-Andrade J.,Flors V., Vera P. (2011). The RNA silencing enzyme RNA polymerase V is required for plant immunity. *PLoSGenet.* 7:e1002434. doi:10.1371/journal.pgen.1002434

Luna E., López A., Kooiman J., Ton J. (2014) Role of NPR1 and KYP in long-lasting induced resistance by β -aminobutyric acid. *Frontiers in plant science*, vol. 5, articolo 184.

Luzzatto-Knaan T., Kerem Z., Doron-Faigenboim A., Yedidia I. (2014) Priming of protein expression in the defence response of *Zantedeschia aethiopica* to *Pectobacterium carotovorum*. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY*, vol. 15(4), pag. 364–378.

Manosalva P.M., Davidson R. M., Lui B., Zhu X., Hulbert S.H., Leung H., Leah J.E. (2009) A

germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broadspectrum disease resistance in rice. *Plant Physiol.*, vol. 149, pag. 286–296.

May M.J., Hammond-Kosack K.E. and Jones J.D.G. (1996) Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the Cf-gene defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol.* vol. 110, pag. 1367-1379.

Mehdy M.C. (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* vol. 105, pag. 467-472

Mena, M., Cejudo, F.J., Isabel-Lamonedá, I. and Carbonero, P. (2002) A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of gibberellin-responsive genes in barley aleurone. *Plant Physiol.* 130: 111–119.

Mikami S., Hori H., Mitsui T. (2001) Separation of distinct compartments of rice Golgi complex by sucrose density gradient centrifugation. *Plant Sci.*, vol. 161, pag. 665–675.

Morel J-B. and Dangl J. L. (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Differentiation*, vol.4, pag.671 – 683.

Nagaraj S. (1996) Seed Hardening and Coating studies in upland rice (*Oryza sativa* L.). M.Sc. (Ag) Thesis, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore.

Nagpal P., Ellis C. M., Weber H., Ploense S. E., Barkawi L. S., Guilfoyle T. J., Hagen G., Alonso G. M., Choen J. D., Farmer E. E., Ecker J. R., Reed J. W. (2005) Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development*, vol. 132, pag. 4107–4118.

Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiology.*, vol.140(2), pag. 411–32.

Nakashima A., Chen L., Thao N. P., Fujiwara M., Wong H. L., Kuwano M., Umemura K., Shirasu K., Kawasaki T., Shimamoto K. (2008) RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *Plant Cell.*, vol. 20, pag. 2265–2279.

Navarro L., Dunoyer P., Jay E., Arnold B., Dharmasiri N., Estelle M., Voinnet O., Jones J. D. G. (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, vol. 312, pag. 436–439.

Newman M.-A., von Roepenack-Lahaye E., Parr A., Daniels M. J., Dow, J. M. (2002). Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *Plant J.* vol. 29, pag. 487-495.

Park C.J., Peng Y., Chen X., Dardick C., Ruan D., Bart R., Canlas P. E., Ronald P. C. (2008) Rice XB15, a protein phosphatase 2C, negatively regulates cell death and XA21-mediated innate immunity. *PLoS Biol*, vol. 6, e231.

Park, C. J., Han, S. W., Chen X., Ronald P. C. (2010) Elucidation of XA21-mediated innate immunity, *Cellular Microbiology*, vol. 12(8), pag. 1017-1025.

Paschold A., Halitschke R., Baldwin I. T. (2006) Using 'mute' plants to translate volatile signals. *Plant J.* vol.45, pag. 275-91.

Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H.B., Lacy M., Austin M.J., Parker J.E., Sharma S. B., Klessig D. F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A. B., Mundy J. (2000) Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, vol. 103, pag. 1111-1120.

Pirrotta V. (1998) Polycomb the genome: PcG, trxG and chromatin silencing. *Cell*, vol. 93, pag. 333-336.

Priming: Triumphs and Tribulations. *Madras Agrico. J*, vol.98 (7-9), pag. 197-209.

Rashid M., Guangyuan H., Guangxiao Y., Hussain J., Xu Y. (2012) A2/ RF Transcription Factor in Rice: Genome-Wide anvas and syntenic Relationships between Monocots and dicots. *Evolutionary Bioinformatics*, vol. 8, pag. 321–355.

Rival A., Beulé T., Bertossi F. A., Tregear J., Jaligot E. (2010) Plant epigenetics: from genomes to epigenomes. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, vol. 38(2), Special Issue, 09-15.

Robinson K.A., Koepke J.I., Kharodawala M., Lopes J.M. (2000). A network of yeast basic

helix-loop-helix interactions. *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, pag. 4460–4466.

Ryan C.A., Hufaker A., Yamaguchi Y. (2007) New insights into innate immunity in Arabidopsis..... vol.9 (8), pag.1902-1908.

Schenk P.M., Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C., Manners J.M. (2000) Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 97, pag. 11655-11660.

Seo H.S., Song J.T., Cheong J.J., Lee Y.H., Lee Y.W., Hwang I., Lee J.S., Choi Y.D. (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 98, pag. 4788-4793.

Seo, Y., Chern M., Bartley L. E., Han M., Jung K. H., Lee I., Walia H., Richeter T., Xu X., Cao P., Bai W., Ramanan R., Amonpant F. (2011) Towards establishment of a rice stress response interactome. *PLoS Genet.*, vol. 7, e1002020

Sharoni A.M., Nuruzzaman M., Satoh K., Shimizu T., Kondoh H., Sasaya T., Choi I.-R., Omura T., Kikuchi S. (2011) Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. *Plant and Cell Physiology*, vol.52(2), pag. 344–60.

Shimizu T., Nakano T., Takamizawa D., Desaki I., Ishii-Minami N., Nishizawa Y., Minami E., Okada K., Yamane H., Kaku H., Shibuya N. (2010) Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J.*, vol. 64, pag. 204–214.

Silverman P., Seskar M., Kanter D., Schweizer P., Métraux J.-P., Raskin I. (1995) Salicylic Acid in Rice. *Plant Physiol.*, vol. 108, pag. 633-639.

Singh B. K., Foley R. C., Oñate-Sánchez L. (2002) Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 5, pag. 430–436.

Sivasubramaniam K., Geetha R., Sujatha K., Raja K., Sripunitha A., Selvarani R. (2011) Seed Slaughter A., Daniel X., Flors .V, Luna E., Hohn B., Mauch-Mani B. (2012) Descendants of Primed Arabidopsis Plants Exhibit Resistance to Biotic Stress. *Plant Physiology*, vol. 158, pag.

Somssich I. E. (2009) Wrky transcription factors in plant defense. *Plant physiology*, vol. 10, pag.109-132.

Song W. Y., Wang G. L., Chen L. L., Kim H. S., Pi L.Y., Holsten T., Gardner J., Wang B., Tanaka, N., Che F. S., Watanabe N., Fujiwara S., Takayama S., Isogai A. (2003) Flagellin from an incompatible strain of *Acidovorax avenae* mediates H₂O₂ generation accompanying hypersensitive cell death and expression of PAL, Cht-1, and PBZ1, but not of Lox in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.*, vol. 16, pag 422–428.

Thulke O., Conrath U. (1998) Salicylic acid has a dual role in the activation of defense-related genes in parsley. *Plant J.* vol. 14, pag. 35-42.

Toledo-Ortiz G., Huq E., Quail P. (2003) The *Arabidopsis* Basic/Helix-Loop-Helix transcription factor family. *Plant Cell*, vol.15, pag. 1749–1770.

Tsuji H., Saika H., Tsutsumi N., Hirai A., Nakazono M. (2006) Dynamic and Reversible Changes in Histone H3-Lys4 Methylation and H3 Acetylation Occurring at Submergence-inducible Genes in Rice. *Plant Cell Physiol.*, vol. 47(7), pag. 995–1003.

Umehara M., Hanada A., Yoshida S., Akiyama K., Arite T., Takeda-Kamiya N., Magome H., Kamiya Y., Shirasu K., Yoneyama K., Kyojuka J., Yamaguchi S. (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, vol. 455, pag.195–200.

Verhagen B. W. M., Glazebrook J., Zhu T., Chang H.-S., van Loon L. C., Pieterse C. M. J. (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* vol. 17, pag. 895-908.

Vincentz M., Bandeira-Kobarg C., Gauer L., Schlogl P., Leite A. (2003) Evolutionary pattern of angiosperm bZIP factors homologous to the maize Opaque2 regulatory protein. *J Mol Evol.*, vol 56, pag. 105–116.

Wang, Z.X., Yano M., Yamanouchi U., Iwamoto M., Monna L., Hayasaka H., Katayose Y.,

- Sasaki T.** (1999) The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J.*, vol. 19, pag. 55–64.
- Wuitschick J.D., Lindstrom P.R., Meyer A.E., Karrer K.M.** (2004) Homing endonucleases
- Xiong, L., Yang, Y.** (2003) Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell*, vol. 15, pag. 745–759.
- Xu Y., Chang P.L.C., Liu D., Narasimhan M.L., Kashchandra G.R., Hasegawa P.M., Bressan R.A.** (1994) Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell*, vol. 6, pag. 1077-1085.
- Yanagisawa S., Schmidt R.J.** (1999) Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J.*, vol. 17(2), pag. 209–214.
- Yanagisawa S.**(2002) The Dof family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.*, vol. 7, pag. 555–560.
- Yoshida S.** (1981) Fundamentals of rice crops science. Laguna International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- Yoshimura S., Yamanouchi U., Katayose Y., Toki S., Wang Z.-X., Kono I., Kurata N., Yano M., Iwata N., Sasaki T.** (1998) Expression of Xa1, a bacterial blightresistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 95, pag. 1663–1668.
- Zemach A., Grafi G.** (2007) Methyl-CpG-binding domain proteins in plants: interpreters of DNA methylation. *TRENDS in Plant Science*, vol.12(2), pag 80-86.
- Zhai W.- X., Zhu L.- H., Fauquet C., Ronald P.** (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*, vol. 270, pag. 1804–1806
- Zhang M., Kimatu J. N., Kezhang Xu K., Liu B.** (2010) DNA cytosine methylation in plant development. *J. Genet. Genomics*, vol. 37, pag. 1-12.
- Zhang Y.** (2003) Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes Dev.*, vol.17, pag. 2733-2740.

Zhang Y., Reinberg D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.*, vol. 15, pag. 2343-2360.

Zhang, S., Klessig D. F. (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.*, vol. 6, pag. 520–527.

Zhong, B., Karibe, H., Komatsu, S., Ichimura, H., Nagamura Y., Sasaki T., Hirano H. (1997) Screening of rice genes from a cDNA catalog based on the sequence data-file of proteins separated by two-dimensional electrophoresis. *Breeding Science*, vol. 47, pag. 255–251.

Zhou B., Qu S., Dolan M., Sakai H., Lu G., Bellizzi M., Wang G. L. (2006) The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between Pi2 and Piz-t resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, vol. 19, pag. 1216–1228.

Zhuang J.C., Peng R.H., Zhu B., Jin X.F., Xue Y., Gao F., Fu X.- Y., Tian Y.- S., Zhao W., Qiao Y.- S., Zhang Z., Xiong A.- S. (2008) Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Populus trichocarpa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, vol. 371(3), pag. 468–74.

RINGRAZIAMENTI

Alla fine di questo bellissimo percorso voglio ringraziare tutte le persone che hanno permesso la sua realizzazione.

La prima persona è la professoressa Carla Caruso, la quale mi ha sempre supportata e considerata quasi una di famiglia. A lei il mio ringraziamento più speciale.

La seconda persona a cui devo un grazie speciale è la dottoressa Laura Bertini. Mi ha sempre consigliata, aiutata e sostenuta in ogni aspetto di questo percorso. Senza la sua presenza il mio dottorato non sarebbe stato lo stesso.

Un'altra persona che ho sentito sempre molto vicina, nonostante fosse fisicamente molto lontana è la dottoressa Silvia Proietti. Dall'Olanda mi ha sempre fatto sentire il suo sostegno.

Inoltre, voglio anche ringraziare il professore Carlo Caporale, il quale non mi ha fatto mai mancare una risata anche nei momenti meno allegri.

Il mio percorso di formazione in questo fantastico laboratorio, mi ha permesso non solo di apprendere numerose tecniche, ma di forgiarmi dal punto di vista personale.

Oltre a tutti loro, durante questi tre anni, ci sono sempre state intorno a me persone positive che mi hanno aiutata sia praticamente ma soprattutto supportandomi nei momenti più difficili: Ambra, compagna di avventure e di sventure, Chiara, Andrea. Inoltre voglio ringraziare anche i tesisti e tirocinanti che ho avuto la possibilità di seguire e che hanno avuto la pazienza di affiancarmi: Andrea, Cristina, Laura, Cristina.

Per mia fortuna ho avuto sostegno anche da persone di altri laboratori che non mi hanno mai negato un consiglio o una parola gentile: Serena, Anna, Giulio, Annarita, Elena, Michele, Valeria, Valentina. Grazie!

Un grazie doveroso devo farlo a tutti i professori che mi hanno permesso di utilizzare le loro strumentazioni per eseguire i miei esperimenti o che mi hanno dato utili dritte per portarli a termine: Proietti de Santis, Prantera, Onofri, Magrini, Ceoloni, Ciaffi, Tiezzi.

Chiaramente ho avuto anche tutto intorno il calore e l'affetto della mia famiglia, di Daniele e di tutti gli amici di sempre che si sono confermati un tassello indispensabile della mia vita.