

Università degli Studi di Parma
Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale

Corso di Dottorato di Ricerca in Biologia Vegetale – Ciclo XXI

e

**CRA- Centro di Ricerca per la Genomica
e la Postgenomica Animale e Vegetale**
Fiorenzuola d'Arda (PC)

Tesi di Dottorato di Ricerca

***Sviluppo di approcci di gene silencing in vite
(Vitis vinifera L.) per studi di genomica funzionale***

Dottoranda
Simona Urso

Tutor

Prof. Andrea Fabbri

Co-tutor

Prof. Giampiero Valè

Il coordinatore

Prof. Marcello Tomaselli

ANNO ACCADEMICO 2008-2009

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 1
LA VITE	pag. 3
<i>Botanica</i>	pag. 3
<i>Resistenza all'oidio</i>	pag. 4
<i>Tecniche di miglioramento genetico classico e innovative applicabili al genere Vitis</i>	pag. 6
REGOLAZIONE DELLE FUNZIONI GENICHE DI RESISTENZA AI PATOGENI	pag. 9
<i>Sistemi di difesa</i>	pag. 9
<i>I geni di resistenza (R)</i>	pag.11
<i>Geni regolatori della risposta di difesa</i>	pag.13
GENE SILENCING	pag.17
<i>Scoperta e meccanismo del gene silencing</i>	pag.17
<i>Diffusione sistemica del gene silencing</i>	pag.20
<i>Strategie per indurre il silenziamento</i>	pag.20
<i>Tecniche di trasformazione in pianta per la generazione di gene silencing</i>	pag.23
<u>Metodo biolistico</u>	pag.23
<u>Agroinfiltrazione</u>	pag.24
<u>VIGS</u>	pag.25
<i>Applicazioni del gene silencing</i>	pag.26
<i>Cenni sui miRNAs</i>	pag.27
OBIETTIVI	pag.29
MATERIALI E METODI	pag.31
MATERIALI SPERIMENTALI	pag.33
<i>Materiale vegetale</i>	pag.33
<i>Micropropagazione da microtalee</i>	pag.34
ANALISI MOLECOLARE	pag.35
<i>Sequenze dei geni</i>	pag.35
<i>Sistema Gateway®</i>	pag.35
<i>Trasformazione di A. tumefaciens e Agroinfiltrazione di vite</i>	pag.46
<i>Trasformazione con il metodo biolistico</i>	pag.53

RISULTATI E DISCUSSIONE	pag.57
MICROPROPAGAZIONE	pag.59
STRATEGIA DI SILENCING E SISTEMA GATEWAY®	pag.60
<i>Sistema Gateway®</i>	pag.62
<u>Vettori per l'agroinfiltrazione: pK7GWIWG2(II)</u>	
<u>e pK7GWIWG2D(II)</u>	pag.63
<u>Vettori per il metodo biolistico: pIPKTA30N</u>	pag.66
<i>Agroinfiltrazione e silenziamento genico transiente</i>	pag.68
<i>Trasformazione con il metodo biolistico</i>	pag.76
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE	pag.83
BIBLIOGRAFIA	pag.89
RINGRAZIAMENTI	pag.97



INTRODUZIONE

LA VITE

Botanica

La vite europea (*Vitis vinifera sativa*) appartiene al genere *Vitis*, famiglia *Vitaceae* o *Ampelidee*, ordine *Rhamnales*, sottoclasse *Archiclamidee*, classe *Dicotiledoni*.

Al genere *Vitis* appartengono circa 40 specie asiatiche e 30 specie americane, comprendenti due sottogeneri: *Muscadinia* e *Euvitis*.

Le specie appartenenti al sottogenere *Muscadinia* sono: la *Vitis rotundifolia*, la *Vitis munsoniana* e la *Vitis popenoei*. Esse possiedono un patrimonio cromosomico $2n=40$ e sono caratterizzate dalla forma dei vinaccioli quasi tondeggianti e dall'assenza di ritidoma (detto anche scorza, che è la parte più esterna della corteccia). La *Vitis rotundifolia*, specie naturale tipica delle coste meridionali degli USA e del Messico, essendo molto resistente alle malattie crittogamiche, alla fillossera e ai nematodi, è stata utilizzata in esperimenti di ibridazione con la *V. vinifera* L. e per ottenere nuovi portinnesti resistenti a fillossera e nematodi.

Il sottogenere *Euvitis* ha patrimonio cromosomico $2n=38$, i vinaccioli hanno forma piriforme e le parti legnose della pianta presentano il ritidoma. Può essere suddiviso in base ai climi ed alle zone geografiche di diffusione delle diverse specie che vi appartengono e, quindi, comprende:

- ▲ il gruppo delle viti americane;
- ▲ il gruppo delle viti asiatiche orientali;
- ▲ il gruppo delle viti euro-asiatiche.

Nel gruppo delle viti americane troviamo specie polimorfiche, resistenti al freddo, alla peronospora ed alla fillossera, con scarsa o nulla attitudine uvifera. Le specie più note sono: *Vitis rupestris*, *Vitis riparia* e *Vitis berlandieri*, usate come portinnesti o per ottenere ibridi da utilizzare come portinnesti.

Al gruppo delle viti asiatiche orientali appartengono specie resistenti al freddo invernale ed alla peronospora, ma scarsamente alla fillossera, con attitudine uvifera. Le specie più note sono: *Vitis labrusca* e *Vitis aestivalis*, quest'ultima è utilizzata nell'ibridazione per i portinnesti perché resistente alle malattie.

Le viti del gruppo euro-asiatico sono tipiche dei climi temperati o temperato-freddi ed originarie dell'Asia. Ne fa parte la *Vitis vinifera* L.: naturalizzata da sempre nel bacino

del Mediterraneo ed in Europa, è la specie più importante del mondo, avendo insuperate attitudini qualitative. E' però molto sensibile alle malattie. Ha due sottospecie: *Vitis vinifera silvestris* o vite selvatica e in *Vitis vinifera sativa* o vite europea. La *V.v. silvestris* è selvatica, dioica, cresce spontaneamente in Europa ed è resistente alle malattie, mentre la *V.v. sativa* è ermafrodita, deriva da *V.v. silvestris* per mutazione gemmaria ed è la più coltivata (Fregoni 2005).

Resistenza all'oidio

L'oidio della vite è causato da un fungo epifita biotrofico obbligato chiamato *Uncinula necator* (Schw.) Burr. (sinonimo di *Erysiphe necator*, forma anamorfica *Oidium tuckeri*), che attacca tutti i tessuti verdi della pianta (grappolo, foglie, tralci e germogli) causando perdite di resa in campo e riduzione della qualità del vino.

L'oidio della vite può svernare in due modi: sottoforma di cleistotecio globoso (corpo fruttifero della fase sessuata), che si conserva sulla vegetazione infetta caduta a terra, e sotto forma di micelio svernante negli anfratti delle gemme o fra le perule. Normalmente gli attacchi da oidio, escluse le infezioni primaverili da micelio svernante, avvengono in estate con un optimum di temperatura di 25-26°C ed una umidità atmosferica media superiore al 40-50%. Le infezioni primarie possono quindi prendere origine sia da micelio svernante nelle gemme, sia dalle ascospore che fuoriescono dagli aschi dei cleistoteci che, a loro volta, germinando producono un micelio epifita che invia austori nelle cellule. *U. necator* accede ai nutrienti dell'ospite penetrando direttamente attraverso la cuticola e la parete cellulare di singole cellule dell'epidermide con la successiva formazione di un austorio. La penetrazione avviene principalmente attraverso la forza meccanica, ma il fungo potrebbe anche sintetizzare e secernere enzimi capaci di degradare la cuticola e i materiali della parete cellulare della pianta ospite (Rumbolz et al. 2000).

L'oidio fu introdotto in Europa alla metà dell'ottocento causando rilevanti perdite di produzione fino a quando non furono attuati adeguati metodi di lotta chimica. Nella viticoltura moderna si ricorre ampiamente alla lotta chimica con fungicidi, come solfuri ed inibitori della biosintesi degli steroli, implicando alti costi di gestione, l'evolversi di ceppi insensibili ai fungicidi ed un elevato impatto ambientale negativo. Di

conseguenza si sta cercando di identificare fonti naturali di resistenza al patogeno che potrebbero essere impiegate per aumentare la resistenza delle viti coltivate. Molte cv ampiamente coltivate sono altamente suscettibili all'oidio perché esse sono derivate da *V. vinifera* L., una specie che non è stata esposta a questo patogeno durante la sua evoluzione. Al contrario, altre specie di vite come *Vitis labrusca*, *Vitis rupestris*, *Vitis aestivalis* e *Muscadinia rotundifolia* si sono co-evolute con *U. necator* nel continente Nord-Americano e possiedono vari livelli di resistenza al patogeno (Mullins et al. 1992). La resistenza all'oidio nella vite è determinata sia da loci di caratteri quantitativi (QTL), sia da un singolo locus. Inoltre, barriere fisiche che bloccano la penetrazione del fungo potrebbero agire come meccanismo di difesa passivo. L'espressione costitutiva dei geni PR (pathogenesis-related), come i geni che codificano per le β -1,3-glucanasi (PR-2) e per le chitinasi (PR-3) nelle specie di vite Nord americane resistenti al patogeno, potrebbe rappresentare un tipo di effetto cumulativo mediato dai QTLs (Fung et al. 2008). *M. rotundifolia*, ad esempio, può essere considerata una buona fonte di resistenza ad un numero di patogeni che causano malattie economicamente significative, in quanto è resistente ai patogeni che notoriamente attaccano le viti coltivate: oidio, peronospora, fillossera e nematodi. La resistenza in *M. rotundifolia* si fa risalire a *Run1* (*Resistance against U. necator*), un singolo locus dominante che contiene due famiglie di analoghi di geni di resistenza (Bouquet 1986, Donald et al. 2002, Barker et al. 2005). La resistenza data da *Run1* si crede sia mediata attraverso una risposta ipersensibile. Il locus *Run1* derivante da *M. rotundifolia* è stato introgresso nel genoma di *V. vinifera* L. usando lo pseudo-backcross come strategia di incrocio e differenti genotipi di *V. vinifera* L. ad ogni fase di re-incrocio. All'interno della popolazione di backcross ci sono individui resistenti che sono eterozigoti per il gene *Run1* e individui suscettibili che invece non hanno il gene. Lo sviluppo di tecniche per il clonaggio di geni di resistenza basato sulle mappe, combinate con la disponibilità di un sistema di trasformazione della vite (Iocco et al. 2001), attualmente offrono la possibilità di introdurre il gene *Run1* in un range di cv di *V. vinifera* L. attraverso la manipolazione genetica (Donald et al. 2002). In vite le basi genetiche della resistenza all'oidio sono complesse. Mentre su di esse si dispone di qualche conoscenza, poco è ancora noto circa i processi molecolari e la regolazione genica durante le interazioni compatibili ed incompatibili oidio-vite (Fung et al. 2008).

Tecniche di miglioramento genetico classico e innovative applicabili al genere Vitis

Il miglioramento genetico della vite è stato per lungo tempo, fin dagli inizi della coltura, opera empirica degli stessi viticoltori. Il loro lavoro, che poggiava su principi semplici (la selezione di piante spontanee e dei boschi), ha portato a notevoli risultati, sufficienti per le esigenze della viticoltura prefillosserica. Con la ricostituzione dei vigneti, seguita alla crisi avutasi con l'avvento della fillossera in Europa, i viticoltori non sono più intervenuti nella scelta del materiale di propagazione vegetativa della vite, lasciando quasi tutto il lavoro di selezione ai vivaisti. La comparsa delle malattie crittogamiche, peronospora ed oidio, e successivamente delle virosi, ha contribuito ad intensificare il lavoro di selezione e di creazione di nuove varietà. Dalla seconda metà dell'800, epoca in cui furono messe a punto le leggi mendeliane, ad oggi, lo sviluppo della scienza ha permesso di effettuare il miglioramento genetico su basi scientifiche molto solide, che hanno consentito e consentono, il raggiungimento di risultati consistenti, per la verità non sempre migliorativi sotto il profilo qualitativo. Sebbene la vite presenti notevoli vantaggi per il selezionatore, come la larga base genetica dovuta alla sua eterozigosi, la possibilità dell'uso iniziale dell'autofecondazione e di ottenere spesso degli ibridi fertili, presenta per contro l'inconveniente della lunghezza del ciclo vitale. Il miglioramento genetico della vite, tuttavia, procede nel tempo perché non esistono varietà e portinnesti ideali, aventi tutti i caratteri desiderabili ed adattabili alle molteplici situazioni pedo-climatiche e parassitarie.

Ci sono diversi metodi per migliorare geneticamente la vite. Quello classico, da sempre utilizzato dall'uomo, è la selezione clonale, che conduce a risultati rilevanti. Vitigni coltivati per numerosissimi anni si sono differenziati in popolazioni, che differiscono tra loro per moltissime caratteristiche importanti, sia dal punto di vista agronomico che tecnologico. Su questa base si instaurano anche le virosi, che contribuiscono a modificare l'omogeneità di una varietà e che portano alla sua degenerazione. Scopo della selezione clonale è l'individuazione, all'interno di un vitigno-popolazione, di biotipi (cloni) aventi caratteristiche migliorative o giudicate geneticamente interessanti in una prospettiva futura. Successivamente, verificata la loro reale validità genetica con diversi anni di controlli, si effettua la clonazione per ottenere materiale di moltiplicazione selezionato, omogeneo e con caratteri

complementari, al fine di evitare la perdita della variabilità genetica della popolazione (biodiversità) (Fregoni 2005).

Lo sviluppo e l'applicazione della tecnologia del DNA sta rapidamente cambiando l'aspetto della genetica della vite. Per i moderni breeders che lavorano sullo sviluppo di nuove varietà i marcatori molecolari rappresentano un validissimo strumento. La vite è una specie difficile su cui attuare analisi genetiche convenzionali a causa delle dimensioni della pianta, dei suoi lunghi tempi di generazione e della sua eterozigosità (Meredith 2000). Questa condizione potrebbe cambiare nel corso dei prossimi anni, grazie al fatto che il suo genoma è stato interamente sequenziato (Jaillon et al., 2007). Infatti, si stanno sviluppando sempre più programmi di MAS (Marker Assisted Selection), tecnica di selezione diretta che si basa sull'associazione fra un carattere fenotipico e un marcatore molecolare. I marcatori del DNA facilitano le indagini sull'origine delle cv esistenti e forniscono validi strumenti per la creazione di nuove cv. I marcatori microsatelliti forniscono un unico profilo genetico per ogni cv permettendone così un' identificazione certa che non è influenzata dall'ambiente, dalle malattie o dalle tecniche colturali; poiché sono locus-specifici e co-dominanti, servono anche per indagare sulle relazioni tra famiglie e rivelare le origini di alcune cv di vite più importanti al mondo. Attualmente i marcatori molecolari basati su programmi di mapping stanno accelerando i programmi di miglioramento genetico della vite permettendo la selezione precoce dei semenzali più promettenti. Il mappaggio genetico, in combinazione con il mappaggio fisico, può portare all'isolamento di geni di vite che controllano caratteri importanti dei quali i meccanismi sono ancora sconosciuti. Altri geni vengono isolati comparando sequenze di DNA di vite espresse con ampi databases di geni ben caratterizzati di altre piante.

Una delle possibili applicazioni biotecnologiche per introdurre nel genoma di vite le caratteristiche desiderate include i sistemi di trasformazione genetica stabile o transiente. I metodi di trasformazione più utilizzati per questa pianta sono: l'*Agrobacterium tumefaciens* e il metodo biolistico (particle bombardment delivery system). Sistemi per introdurre geni in cv di vite esistenti, derivanti sia da vite che da altri organismi, sono stati messi a punto (Iocco et al. 2001). Questi potrebbero permettere di migliorare le cv sotto diversi aspetti, soprattutto per quanto riguarda la riduzione delle perdite di resa e dell'utilizzo di fitofarmaci, senza interferire sulla vinificazione e sui caratteri del vino, quindi sulle caratteristiche di una varietà.

Progressi incoraggianti sono stati fatti nell'ambito della resistenza ai patogeni fungini. Il primo lavoro in questo campo è stato svolto da LeGall et al. nel 1994; essi hanno trasformato embrioni somatici di vite con *Agrobacterium tumefaciens* e da essi hanno ottenuto delle piante transgeniche che esprimevano la coat protein (CP) del grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMVF) riportando risultati promettenti. In seguito, Yamamoto et al. (2000) hanno riportato un'aumentata resistenza ad *U. necator* in viti che esprimevano un gene della chitinasi derivante da riso. Per quanto riguarda il metodo del particle bombardment, Vidal et al. nel 2003 e nel 2006 hanno sviluppato un sistema efficiente per la trasformazione e la rigenerazione della cv Chardonnay, in cui oltre ai geni marcatori, è stato inserito un peptide antimicrobico. La scoperta di geni su larga scala e le informazioni derivanti dal sequenziamento del genoma permetteranno di indagare sulla struttura, la funzione e la regolazione di geni importanti della vite. Oltre alla possibile utilizzazione per l'introduzione di caratteri di interesse agronomico a base genetica semplice, quindi, la trasformazione può essere utilizzata come strumento di analisi genetica sfruttando metodi che consentono di ottenere mutanti funzionali mediante il silenziamento di funzioni geniche (Zottini et al. 2008; Kikkert et al. 2004).

REGOLAZIONE DELLE FUNZIONI GENICHE DI RESISTENZA AI PATOGENI

Sistemi di difesa

Le piante regolarmente vengono a contatto con i microrganismi patogeni e sopravvivono. Differenti livelli di difesa sono stati scoperti attraverso analisi genetiche, genomiche e biochimiche. Le piante possiedono molte barriere preformate, ma attivano diversi tipi di livelli di resistenza: resistenza non-ospite, razza-specifica e non razza-specifica ed un sistema di difesa basale (Tab.1; Hammond-kosack e Parker 2003). L'attivazione di una risposta locale può anche indurre un'immunità sistemica che innesca i tessuti contro successivi attacchi; questo comporta una drastica riprogrammazione cellulare. Quindi, diversamente dagli animali, le piante fanno affidamento sull'immunità innata di ogni cellula e su un sistema di segnali sistemici che partono dal sito d'infezione.

Table 1		
Basic disease resistance concepts.		
Term	Explanation	Outcome
Non-host resistance	Disease resistance operating between species Effective against all known isolates of the pathogen	No disease
Race non-specific resistance	Disease resistance operating within a species Effective against all known isolates of the pathogen. R-protein-mediated	Only some plant genotypes fully resistant
Race-specific resistance	Disease resistance that varies within a species	Each plant genotype exhibits differential disease resistance and susceptibility to a single isolate
Basal defence	Effective only in plants with R proteins that correspond to elicitors produced by specific isolates of the pathogen Activated in susceptible genotypes of a host plant species	Disease severity varies between susceptible plant genotypes

Tab.1 Diversi livelli di resistenza alle malattie nelle piante (da Hammond-Kosack e Parker 2003).

I meccanismi di difesa che utilizzano le piante possono essere suddivisi in due gruppi: un sistema di difesa passivo, costituito dalle cosiddette "barriere" (ad esempio i rivestimenti cellulari), ed un sistema di difesa attivo, ulteriormente suddiviso in sistema immunitario innato basale ed sistema immunitario innato mediato dai geni di resistenza (geni R) (Jones e Dangl 2006; Bittel e Robatzek 2007).

La parete cellulare è la prima linea di difesa contro il mondo esterno, quindi le piante hanno evoluto dei sistemi di percezione e di difesa contro gli eventi fisici e chimici associati alla penetrazione del patogeno. Ad esempio, l'oidio induce la produzione di depositi di callosio nella cellula a livello del sito di penetrazione e la produzione extracellulare di specie reattive dell'ossigeno, sia sull'ospite suscettibile che su quello resistente (Mellersh e Heath 2001). In vite, la deposizione di lignina insieme ad altri componenti fenolici, accompagnati da un'alta attività perossidasi e la produzione di fitoalessine rappresentano componenti importanti della risposta di difesa (Kortekamp 2006). La resistenza non-ospite è altamente efficace e durevole nel tempo quindi lo sfruttamento di questa forma di resistenza è potenzialmente di grande importanza agronomica. In numerosi studi sui cereali attaccati dall'oidio la resistenza alla penetrazione del fungo è stata associata con la formazione di papille; queste sono costituite da apposizioni di callosio (nella cui matrice si accumulano anche fenoli e specie reattive dell'ossigeno) che si depositano tra la parete cellulare e la membrana plasmatica delle cellule attaccate dal patogeno, proprio a livello del sito di penetrazione e si oppongono alla perforazione dell'ifa costituendo un'efficace barriera. Attraverso analisi genetiche su mutanti di *Arabidopsis* che mostravano un'aumentata penetrazione da parte del patogeno non-ospite *Blumeria graminis sp hordei* (*Bgh*) è stato identificato il locus PEN1 (Penetration 1) che codifica per una sintaxina che si trova sulla membrana plasmatica (Collins et al. 2003). Nei mutanti *pen1* si ha una maggiore penetrazione da parte del fungo non-ospite facendo dedurre che nel wt il fungo incontra barriere efficaci contro la penetrazione. Ci sono almeno tre potenziali barriere contro la penetrazione del fungo; le prime due barriere si pensa siano costituite dalla cuticola e dalla parete cellulare primaria. Le papille, la cui formazione è indotta prima dell'infezione, rappresentano la terza. Essendo una sintaxina di membrana presumibilmente coinvolta nella secrezione, PEN1 potrebbe essere implicato nella deposizione dei precursori della cuticola, della parete cellulare primaria e delle papille. Quindi PEN1 sembra avere una funzione basale nella secrezione ed una funzione correlata alla difesa specializzata, essendo richiesto per gli eventi di secrezione polarizzata che danno origine alla formazione delle papille (Assaad et al. 2004).

Le piante sono immuni nei confronti di molti potenziali patogeni (non-host disease resistance) e hanno la capacità di ridurre la gravità della malattia dei patogeni attuali (basal disease resistance). Entrambe queste forme di resistenza coinvolgono, come

fase iniziale, il riconoscimento dei (potenziali) patogeni attraverso molecole conservate ad essi associate, originariamente chiamate "elicitori", poi PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) e, recentemente, MAMPs (microbial-associated molecular patterns). I MAMPs riconosciuti dalla pianta corrispondono a molecole essenziali per la vita del microrganismo, ma non hanno necessariamente un ruolo nella patogenicità. Esempi ben noti sono: la chitina e gli ergosteroli, principali componenti strutturali della membrana e della parete cellulare dei funghi, e la flagellina, principale componente strutturale del flagello batterico. I MAMPs sono riconosciuti attraverso i PRRs (pattern recognition receptors) a livello della superficie cellulare. L'attivazione dei PRRs guida l'attivazione delle risposte di difesa (MAMP-triggered immunity) nella resistenza basale e in quella non-ospite, impedendo così un'ulteriore colonizzazione da parte dei patogeni non compatibili e limitando la diffusione dei patogeni compatibili.

I patogeni possono superare questo primo livello di difesa (MAMP-triggered immunity) producendo delle molecole effettrici (nell'apoplasto e/o nelle cellule ospiti) che riducono o sopprimono la risposta dell'ospite. Il riconoscimento di tali molecole da parte dei prodotti dei geni R determina nelle piante l'attivazione del secondo livello di resistenza (effector-triggered immunity), di solito accompagnato da una risposta ipersensibile (HR), una morte cellulare programmata locale che circoscrive l'invasione del patogeno (Bittel e Robatzek 2007).

I geni di resistenza (R)

I geni che codificano i determinanti di specificità dell'effector-triggered immunity sono conosciuti come geni di resistenza (R). Molti geni R codificano proteine intracellulari che contengono un sito NB (nucleotide-binding) e un dominio LRR (leucine-rich repeats). La maggior parte di queste proteine hanno un dominio N-terminale variabile. Meno comune è la classe delle proteine serina/treonina chinasi e delle proteine con il dominio LRR extracellulare (eLRR), che possiedono un singolo dominio trans membrana ed un corto C-terminale intracellulare o un dominio chinasi. Le proteine NBS-LRR sono coinvolte nel riconoscimento di effettori del patogeno specializzati (chiamati anche proteine di avirulenza Avr) che si pensa svolgano funzioni di virulenza in assenza del rispettivo gene R. Secondo le analisi svolte fino

ad oggi, i domini LRR di varie proteine R delle piante contribuiscono alla specificità nel riconoscimento del patogeno, mentre il ruolo del sito NB è quello della trasduzione del segnale (Hammond-Kosack e Parker 2003).

La spiegazione più immediata per la specificità delle proteine NBS-LRR delle piante è che i patogeni sono individuati attraverso la diretta interazione tra le proteine NBS-LRR e le molecole derivate dal patogeno. Comunque, per la diretta individuazione dei patogeni che sono in grado di sopravvivere nel tempo ai meccanismi di resistenza, le piante devono bilanciare la rapida evoluzione dei microrganismi patogeni con un'altrettanto rapida diversificazione di geni che codificano per le proteine NBS-LRR. Sebbene ci sia prova che alcune proteine NBS-LRR siano sottoposte a selezione, l'ipotesi dell'individuazione diretta per il riconoscimento del patogeno non spiega come un numero relativamente limitato di proteine di resistenza possa riconoscere in modo specifico l'ampia gamma e la diversità dei potenziali patogeni e i loro effettori. Questa apparente disparità ha portato a formulare il "modello di guardia" dell'individuazione del patogeno, che afferma che i patogeni sono individuati direttamente attraverso l'azione dei loro effettori. Il meccanismo di rilevazione indiretta permette alla pianta di monitorare un numero limitato di bersagli chiave di patogenesi e rispondere quando questi bersagli sono perturbati, limitando il numero di proteine di resistenza necessarie per l'adeguata resistenza. Sebbene solo poche proteine R sono state ben caratterizzate, è stato provato che le piante usano sia il meccanismo diretto di individuazione del patogeno che quello indiretto.

Il legame dell'ATP a livello del dominio NBS determina un cambiamento conformazionale delle proteine NBS-LRR che comporta la loro attivazione. Nella Fig.1 sono rappresentati l'attivazione delle proteine nell'individuazione diretta ed indiretta del patogeno. Il segnale è attivato in maniera simile sia nel modo diretto (sinistra) che indiretto (destra). La presenza dell'effettore del patogeno (1) altera la struttura della proteina attraverso il legame diretto (sinistra) o modificazioni di ulteriori proteine della pianta (destra), permettendo la conversione di ATP in ADP. Il legame dell'ATP al dominio NBS (2) attiva la trasduzione del segnale attraverso la creazione di siti di legame per le molecole segnale a valle e/o la formazione di multimeri di proteine NBS-LRR. Il distacco dell'effettore del patogeno e del bersaglio dell'effettore modificato (se presente) (3) insieme all'idrolisi dell'ATP (4) determina il ritorno della proteina al suo stato inattivo (De Young e Innes 2006).

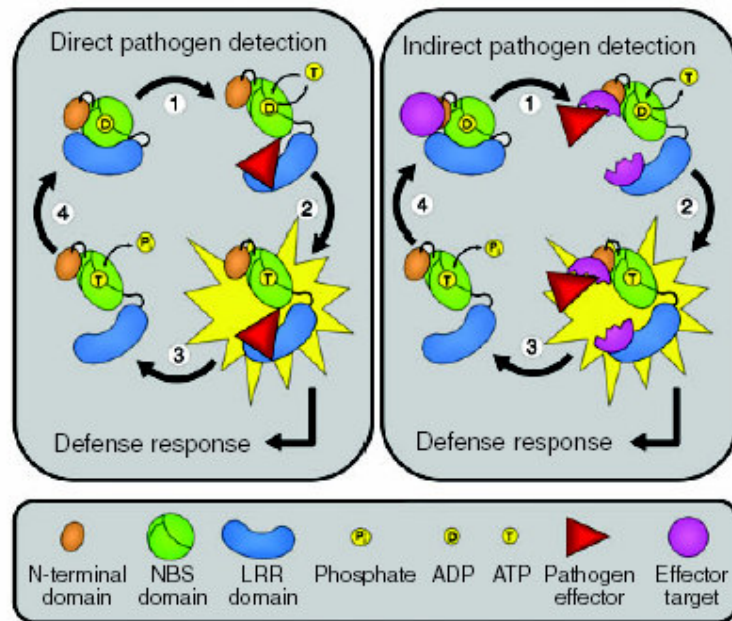


Fig.1 Modello per l'attivazione delle proteine NBS-LRR e l'individuazione diretta ed indiretta del patogeno (da De Young e Innes 2006).

Il modello del riconoscimento diretto può essere superato dal patogeno attraverso l'alterazione del fattore Avr senza modificare la sua funzione di virulenza. Al contrario, il riconoscimento indiretto non può essere superato attraverso l'alterazione del fattore Avr senza alterare la sua funzione di virulenza.

Geni regolatori della risposta di difesa

Le proteine NBS-LRR agiscono attraverso un network di segnali e inducono una serie di risposte di difesa della pianta. La scoperta di nuovi geni o mutanti permette analisi più dettagliate dei segnali locali e sistemici, e di iniziare a far luce sulle complesse interazioni che avvengono tra le molecole della difesa come: acido salicilico (SA), ossido nitrico (NO), intermedi delle specie reattive dell'ossigeno (ROI), acido jasmonico (JA) ed etilene (ET).

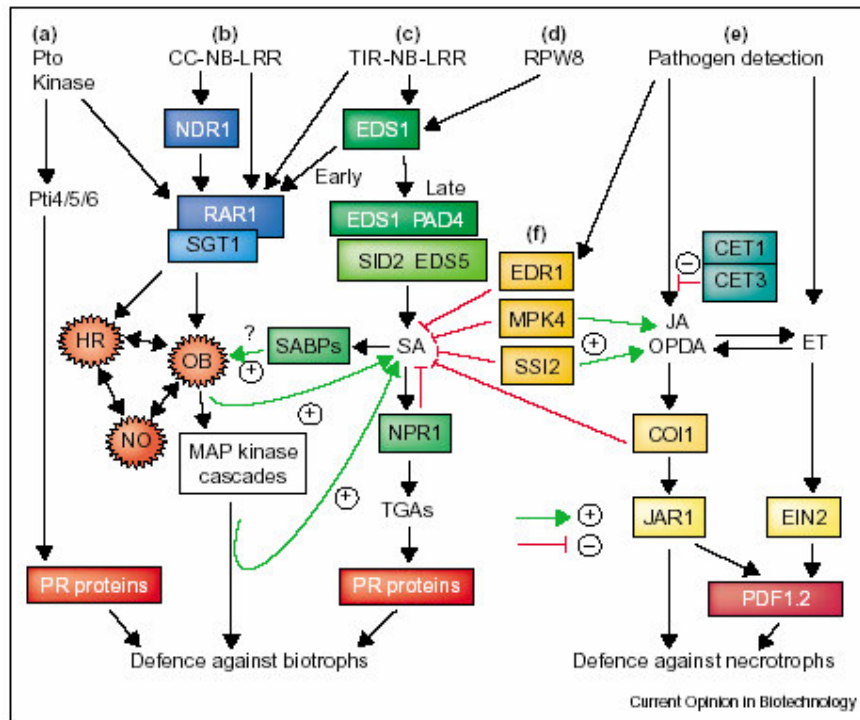


Fig.2 Visione d'insieme dei networks dei segnali locali che controllano l'attivazione delle risposte di difesa locali (da Hammond-Kosack e Parker 2003).

La figura 2 mostra una visione d'insieme dei networks di segnali che controllano l'attivazione delle risposte di difesa locali. Cinque principali cascate di segnale sono rappresentate: a, b, c, d, e. La resistenza alle malattie mediata dai geni R è efficace contro i patogeni biotrofi obbligati, ma non contro i necrotrofi. La resistenza mediata da Pto-kinase (a) coinvolge RAR1 (required for Mla-dependent resistance 1) e l'interazione diretta con i fattori di trascrizione Pti4/5/6 (Pto-interacting 4,5,6) per attivare direttamente l'espressione dei geni PR (pathogenesis-related). Molte proteine CC-NB-LRR-type (coiled-coil NB-LRR) (b) richiedono NDR1 (non-race specific disease resistance 1), mentre le proteine TIR-NB-LRR (*Drosophila* Toll and mammalian Interleukin 1 receptor -NB-LRR) (c) sono dipendenti da EDS1 (enhanced disease susceptibility 1). RPW8 (broad-spectrum mildew R protein) opera attraverso EDS1 e SGT1 (suppressor of G2 allele of SKP1). Un possibile punto di convergenza dei quattro pathways è al livello RAR1/SGT1: entrambi operano a monte della HR e dell'oxidative burst (OB). Un altro segnale di difesa precoce generato è l'ON, che può potenziare HR ed OB. L'attivazione delle risposte di difesa tardive potenziate promossa dalle proteine TIR-NBS-LRR coinvolge l'azione combinata di EDS1 e PAD4 (phytoalexine-deficient 4), EDS5, SA e NPR1 (non espresso of PR1). L'OB può potenziare il segnale mediato da SA direttamente o attraverso l'induzione di

varie cascate MAPK (mitogen-activated protein kinase). NPR1 è richiesto a valle di SA, che stimola anche la translocazione di NPR1 nel nucleo dove interagisce con i fattori di trascrizione TGA e induce l'espressione dei geni PR. Un differente network di trasduzione del segnale (e) porta all'attivazione parallela delle cascate di segnale di JA ed ET.

Mutazioni in RAR1 di orzo sopprime la resistenza contro l'oidio data dal gene MLA12. Un ruolo conservato di RAR1 nella resistenza data dai geni R contro gli oomiceti, i batteri e i virus è adesso ben documentato con analisi genetiche in *Arabidopsis thaliana* ed attraverso la VIGS (virus induced gene silencing) di RAR1 in *Nicotiana benthamiana* (Liu et al. 2002). Diversamente da EDS1, che ha una funzione nella difesa basale limitando la crescita del patogeno virulento, RAR1 sembra essere specificatamente richiesto per la R gene-triggered resistance. Ci sono prove della diretta interazione fisica tra RAR1 e SGT1 e dell'ampio uso da parte delle piante di SGT1 nella R gene-triggered resistance. SGT1 sembra esercitare, come RAR1, un ruolo importante nella resistenza a differenti classi di patogeni. Ad esempio, il gene silencing della singola copia di SGT1 di orzo ha compromesso un subset di geni R di oidio al locus MLA. Allo stesso modo, il silenziamento di SGT1 in *N. benthamiana* ha conferito resistenza al potato virus X (PVX) ed al tabacco mosaic virus. Inoltre, SGT1 è richiesto anche per certe risposte di resistenza non ospite che rende tutte le varianti genetiche di una pianta immuni all'attacco di tutti gli isolati di una specie di patogeno (Shirasu e Schulze-Lefert 2003).

NDR1 codifica per una piccola proteina di membrana integrale putativa, altamente basica; la sua trascrizione è indotta dall'infezione del patogeno molto precocemente. E' richiesto per la resistenza a *Pseudomonas syringae* e *Peronospora* parasitica. NDR1 lega la generazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) alla produzione di SA e le conseguenze fenotipiche della sua mutazione (*ndr1-1*) in *Arabidopsis* è causata da una ridotta capacità di accumulare SA prima dell'infezione del patogeno (Shapiro e Zang 2001).

I geni di *Arabidopsis* EDS1 e PAD4 per lipase-like proteins che funzionano nella resistenza mediata dai geni R e nella resistenza basale. Le analisi fenotipiche dei mutanti nulli *eds1* e *pad4* mostrano che questi due geni sono richiesti per la resistenza condizionata dallo stesso spettro di geni R, ma svolgono ruoli distinti all'interno del pathway di difesa. EDS1 è essenziale per l'elaborazione del HR, mentre EDS1 e PAD4 sono entrambi richiesti per l'accumulo del SA. EDS1 è

necessario per l'accumulo dell'mRNA di PAD4 indotto dal patogeno, mentre mutazioni di PAD4 o il blocco dell'accumulo di SA compromette solo parzialmente l'espressione di EDS1. EDS1 può dimerizzare ed interagire con PAD4 nelle cellule vegetali sane e infettate dal patogeno. Feys et al. nel 2001 hanno proposto due ruoli per EDS1. Il primo è richiesto precocemente nella difesa, indipendentemente da PAD4. IL secondo recluta PAD4 nell'amplificazione della difesa, possibilmente attraverso la diretta associazione EDS1-PAD4. Chong et al. (2008) nella cv Chardonnay hanno identificato due elementi regolatori putativi, VvNHL1 e VvEDS1, simili a NDR1 ed EDS1. Studi di espressione di questi geni putativi del segnale insieme con altri geni di difesa della vite mostrano che sono differenzialmente regolati dai trattamenti con SA e jasmonate-ethylene e dall'inoculo con differenti tipi di patogeni. L'espressione di VvEDS1 è stata stimolata da trattamenti con SA, *Botrytis cinerea* e *Plasmopara viticola*, mentre VvNHL1 è stato represso da *B. cinerea*.

NPR1 è un regolatore chiave nel pathway di trasduzione del segnale che porta alla resistenza sistemica acquisita (SAR). Mutazioni in questo gene portano alla mancata induzione dei geni PR nei tessuti sistemici ed un'augmentata suscettibilità all'infezione del patogeno, mentre l'overespressione della proteina NPR1 porta all'aumento dell'induzione dei geni PR e all'augmentata resistenza alla malattia. Kinkema et al. nel 2000 hanno dimostrato che la localizzazione nucleare di NPR1 è essenziale per la sua attività nell'induzione dei geni PR. In seguito, Spoel et al. (2003) hanno dimostrato che la localizzazione nucleare di NPR1, che è essenziale per l'espressione dei geni di difesa mediati da SA, non è richiesta per la soppressione del segnale di JA. Hanno quindi riportato una nuova funzione di NPR1 nel citosol e hanno provato che NPR1 citosolico gioca un ruolo cruciale nella comunicazione incrociata tra le risposte di difesa dipendenti da SA e JA.

GENE SILENCING

Scoperta e meccanismo del gene silencing

Il gene silencing è un processo di controllo post-trascrizionale dell'espressione genica e di RNA aberrante conservato in un'ampia gamma di organismi: animali, funghi e piante. Esso consiste in una degradazione specifica di RNA endogeni, dovuta alla presenza di dsRNA omologhi immessi localmente o trascritti da un transgene che, in pianta, scatenano il silenziamento di (trans)geni. Le piante, in particolare, hanno sviluppato il silencing principalmente come sistema di difesa contro virus (Boulcombe, 1999).

La scoperta del silencing avvenne nel 1990, quando il gruppo di ricerca di Jorgensen, nel tentativo di aumentare l'attività del gene della calcione sintasi (un enzima coinvolto nella produzione di specifici pigmenti), introdusse dei transgeni in petunia. Inaspettatamente la pigmentazione non aumentò, anzi si ebbe una variegazione del colore e, in alcuni casi, la totale perdita di colore.

Questo fenomeno fu definito "co-soppressione", intendendo la soppressione sia del gene introdotto, sia quello endogeno. In seguito, la "co-soppressione" venne ricondotta al PTGS (post transcriptional gene silencing) poiché, in tutti i casi, il fenomeno era il risultato di una degradazione dell'RNA trascritto. Inoltre, questa degradazione post-trascrizionale era osservata anche per transgeni espressi da piante, batteri o sequenze virali. Mentre si parlava di PTGS in piante, un fenomeno molto simile denominato "quelling" (repressione) era già stato osservato nei funghi. Nel 1999, Cogoni et al., nel tentativo di incrementare la produzione di un pigmento arancione trasformarono una coltura di *Neurospora crassa* con un plasmide contenente un segmento del gene *a/1* ottenendo come risultato fenotipi albini. Questi risultati confermarono le precedenti osservazioni sul silenziamento genico indotto da transgeni.

Nel 1998 Fire *et al.* catalogarono questi fenomeni isolati sotto un principio comune: l'RNA interference (RNAi).

Il gene silencing è un meccanismo biochimico conservato che coinvolge più di 10 proteine correlate tra loro. L'intero processo può essere diviso in 3 fasi (Fig.3):

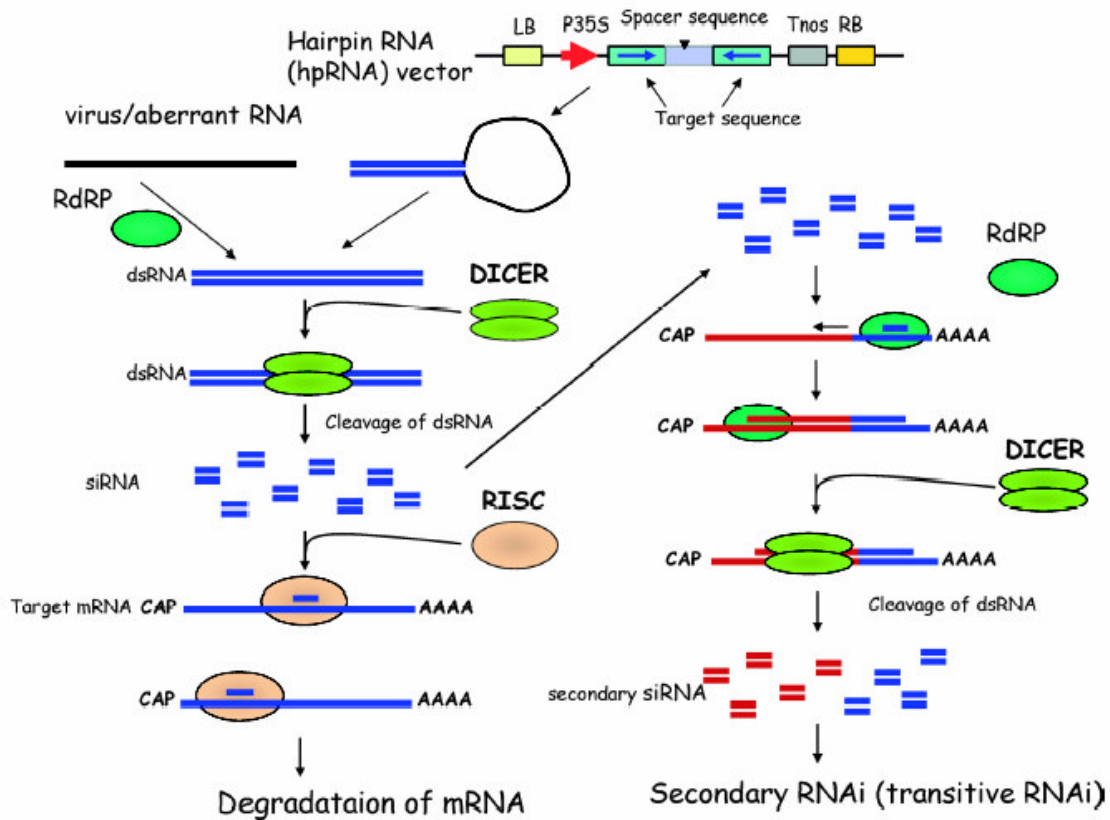


Fig.3 Modello corrente del gene silencing mediato dall'RNA in pianta (da Sato 2005).

1) FASE INIZIALE

Nello stadio iniziale il dsRNA che può avere diverse origini: virale, trasposonica (dovuto all'orientamento senso e antisense degli elementi trasponibili) o introdotto nella cellula (esogeno) viene digerito in siRNA (small interfering RNA) di 21-23 nucleotidi (Zamore 2002) che vengono anche chiamati "RNA guida". L'enzima responsabile di questo taglio è stato identificato come un membro della famiglia delle RNasi III, ribonucleasi specifiche per dsRNA; questo enzima è stato chiamato "Dicer" ed è responsabile del taglio del dsRNA ATP-dipendente. La struttura di Dicer è quella di una molecola allungata con un dominio di legame all'RNA denominato PAZ ad una estremità e due domini RNasi III all'estremità opposta. Dicer riconosce le estremità del dsRNA con il suo dominio PAZ e successivamente procede al taglio con i suoi domini nucleasici; la distanza tra il dominio PAZ ed i domini Rnasicci determina la lunghezza dei siRNA prodotti da Dicer che varia tra le specie ma è tipicamente di 22-30 nucleotidi (ntRNA; 21-23 ntRNA per le piante).

2) FASE EFFETTORE

Le sequenze di 22 ntRNA fungono da sequenze-guida per il riconoscimento dell'mRNA bersaglio ed entrano a far parte di un complesso multiproteico chiamato RISC (RNA-induced silencing complex). L'assemblamento di RISC richiede ATP e procede attraverso una serie di sub-complessi intermedi; durante questo processo il siRNA viene svolto al fine di incorporare solo un filamento della molecola di RNA nel complesso attivo. Una volta riconosciuto l'mRNA a sequenza complementare, RISC procede con il taglio dell'mRNA causandone la degradazione. L'elevata efficienza e specificità dell'RNAi nel trovare l'mRNA bersaglio risiede nella capacità di RISC di analizzare gli mRNA e di individuare il suo bersaglio specifico definito dalla sequenza di 21/22 nucleotidi complementare, azione svolta da un dominio ad attività progressiva di scorrimento che ha omologie di sequenza con la famiglia delle proteine RecA implicate nel riconoscimento di sequenze omologhe di DNA nella ricombinazione.

3) FASE DI AMPLIFICAZIONE

La fase finale consiste nell'amplificazione dell'RNA guida da parte di RNA polimerasi dipendenti da RNA (RdRP). L'elevata efficienza del silencing, riscontrata in tutti gli esperimenti, è stata attribuita ad un processo di amplificazione del segnale di silencing. Questa amplificazione può avere come bersaglio i dsRNA, al fine di produrre più siRNA, o gli siRNA stessi. In questo modo i complessi RISC hanno la possibilità di effettuare un maggior numero di reazioni ribonucleasiche sequenza-specifiche ("tagli"). Recenti indagini hanno dimostrato che gli siRNA complementari all'mRNA bersaglio possono funzionare da primer per una RNA polimerasi-RNA dipendente (RdRP), primer dipendente, che trasforma l'mRNA in dsRNA, che viene processato da Dicer in secondary siRNA (siRNA secondario). Un siRNA secondario viene incorporato in RISC che, dopo aver trovato un mRNA omologo, procede con il taglio causando la degradazione del messaggero. Questo meccanismo prende il nome di Transitive RNA silencing (Fig.3) (Horiguchi 2004; Sato 2005).

Diffusione sistemica del gene silencing

Il silenziamento è un fenomeno sistemico. In molti organismi (piante e nematodi) si è osservata la capacità di diffusione del “segnale” di silenziamento genico dalle cellule da cui è scaturito ad altre più distanti.

Un esperimento esemplificativo di questo fenomeno è stato quello eseguito da Voinnet e Baulcombe (1997). Piante di *Nicotiana benthamiana* trasformate per la produzione di GFP venivano infettate localmente (su una foglia) da virus che, trasformato a sua volta, portava una sequenza senso del gene della GFP. La pianta prima dell'infezione, vista la sua costitutiva espressione di GFP, mostrava una fluorescenza diffusa se sottoposta a luce UV. Nel momento in cui essa veniva localmente attaccata dal virus, l'entrata nelle cellule dell'RNA virale provocava l'instaurarsi di un meccanismo di silenziamento genico contro le sequenze introdotte (GFP). L'analisi sotto luce incidente UV della foglia infettata mostra un calo dell'espressione endogena di GFP.

Questo fenomeno è riferibile alla co-soppressione (silenziamento del gene esogeno in concomitanza di quello endogeno). Tuttavia, col passare del tempo si osservava una diffusione del silenziamento al di fuori della zona infettata, fino ad interessare l'intera pianta. Risultati simili furono ottenuti con infezione da *A. tumefaciens*. Altri esperimenti hanno in seguito dimostrato che un'infezione da virus genera una resistenza ad esso che si diffonde per tutta la pianta rendendola “immune” ad attacchi successivi (fenomeno denominato “recovery”). Questo avviene grazie ad un meccanismo di amplificazione dei siRNA (siRNA amplification cycle) operato da RNA polimerasi RNA dipendenti (RDR6) e da elicasi (SDE3). I siRNA così amplificati sono in grado di diffondere alle cellule adiacenti tramite dei canali (plasmodesmi) e diffondere il silenziamento all'intera pianta.

Strategie per indurre il silenziamento

Prima della messa a punto di tecniche in grado di sfruttare il fenomeno dell'RNAi mediato da dsRNA, il sistema più frequentemente usato per generare PTGS in piante, era la produzione di RNA antisenso tramite l'espressione di un transgene. I costrutti antisenso consistono di una sequenza complementare all'mRNA bersaglio,

sotto il controllo di un promotore forte e costitutivo. L'appaiamento del filamento antisense con l'mRNA endogeno ne blocca la traduzione e lo rende bersaglio di RNAsi specifiche. Negli esperimenti con RNA antisense, in genere, si ha una efficienza di silencing con una percentuale che varia dal 5 al 20 %. La degradazione dell'mRNA varia da individuo a individuo: da nessun effetto al 99% di mRNA degradato. L'efficienza è in strettissima relazione con l'omologia esistente fra il costrutto antisense e l'mRNA.

Un ulteriore miglioramento della tecnologia di silenziamento, mediante siRNA, fu apportato dall'utilizzo degli ihpRNAs (intron-containing hairpin RNAs). Si tratta sempre di un costrutto contenente entrambe le sequenze ripetute e invertite a formare una struttura a forcina, ma la differenza sta nella presenza di uno spaziatore. E' stato dimostrato (Smith et al., 2000) che costrutti aventi come spaziatore una sequenza riconosciuta come intronica vengono meglio processati ai fini dell'RNAi. Alla base di questo fenomeno vi è lo splicing che normalmente avviene nel nucleo. Non è ancora ben chiaro come la presenza di un introne nella regione spaziatrice possa migliorare l'efficienza dei costrutti; si è comunque ipotizzato che lo splicing dell'introne permetta un migliore allineamento tra i due bracci della forcina favorendo la formazione del duplex di RNA. A questo proposito sono stati creati vettori plasmidici per la clonazione di ihpRNA in batteri già ingegnerizzati e contenenti una regione intronica. Ai lati di questo introne sono presenti i siti di restrizione specifici e diversificati che permettono l'inserimento di prodotti di amplificazione, quali il filamento senso e quello antisense che appaiandosi genereranno il dsRNA funzionale all'RNAi (Fig.4). I batteri usati per la clonazione dei plasmidi sono in genere *Escherichia coli* e talvolta *Agrobacterium rhizogenes*, il quale può essere direttamente usato per infettare la pianta. I più noti plasmidi ingegnerizzati con ihpRNA sono pK7GWIWG2(II), pK7GWIWG2D(II) (www.psb.ugent.be; Karimi et al. 2002) e pHELLSGATE (CSIRO, Australia), utilizzati per la trasformazione delle piante con *Agrobacterium tumefaciens*.

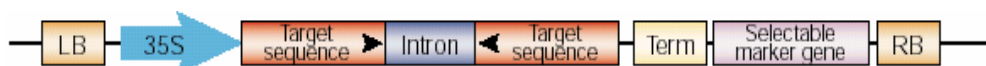


Fig.4 Struttura del costrutto inserito tra LB ed RB in *A. tumefaciens*, sotto il controllo del promotore costitutivo 35S per la trascrizione in pianta dopo la trasformazione ad opera del batterio

(<http://www.molecularlab.it/>).

Anche i virus hanno un'elevata capacità di indurre il silenziamento. Essi, dopo aver infettato la pianta, si replicano producendo intermedi di replicazione a dsRNA che innescano il silencing. Questa loro caratteristica naturale è stata sfruttata dai biologi molecolari per silenziare geni nelle piante mediante la VIGS (Virus Induced Gene Silencing). Dopo la scoperta dell'RNAi sono state messe a punto diverse strategie per indurre il silenziamento mediante l'utilizzo di dsRNA. Nella figura 5 sono mostrate le possibili molecole iniziatrici del processo dell'RNAi sintetizzabili *in vitro* e direttamente introducibili nell'organismo, al fine di ottenere il silenziamento genico desiderato. Le molecole più semplici sono piccoli RNA sintetizzati chimicamente (siRNA); una volta introdotti nell'organismo non devono essere processati dall'enzima Dicer in quanto emulano già un suo possibile prodotto, e vengono direttamente incorporati nel complesso RISC, guidando la degradazione dell'mRNA (Fig.5a). Lunghi dsRNA devono invece essere processati da Dicer per generare diversi siRNA (Fig.5b). Vengono anche sintetizzati duplex di RNA a forcina con perfetta complementarità dei bracci; anch'essi, tagliati da Dicer, generano siRNA funzionali (Fig.5c). In ultimo sono disponibili duplex di RNA a forcina con una non perfetta complementarità tra i bracci (Fig.5d): essi emulano i pre-miRNA che fuoriescono dal nucleo e una volta processati da Dicer generano miRNA che guidano il silenziamento post-trascrizionale (per degradazione di mRNA in caso di perfetta complementarità con esso; per blocco della traduzione in caso di appaiamento parziale; vedi più avanti "miRNA").

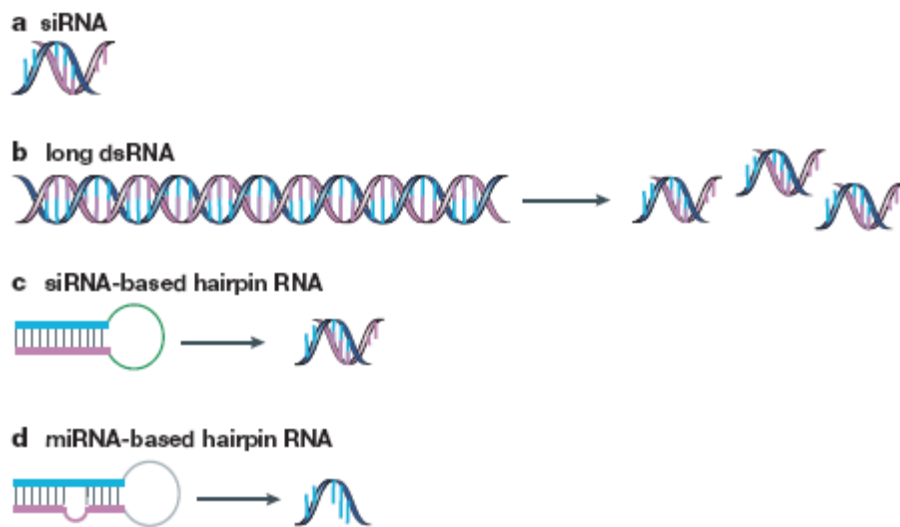


Fig.5 Molecole sintetiche per indurre RNAi artificialmente (<http://www.molecularlab.it/>).

Tecniche di trasformazione in pianta per la generazione di gene silencing

I metodi più utilizzati per trasformare le piante con costrutti che innescano il processo di silencing sono principalmente tre: il metodo biolistico (particle bombardment), l'agroinfiltrazione e la VIGS.

Metodo biolistico

Il metodo biolistico è un sistema di trasformazione che usa la pressione dell'elio per introdurre in cellule DNA precipitato su microparticelle (microcarrier). Con questo metodo è possibile trasformare diversi bersagli: batteri, funghi, insetti e cellule vegetali ed animali. E' un sistema vantaggioso per trasformare cellule in coltura intatte dal momento che sono necessarie poche manipolazioni pre o post bombardamento ed è più facile e veloce dell'agroinfiltrazione.

Il bombardamento con particelle viene utilizzato per trasformazioni stabili o transienti di diversi tipi di target per introdurre, ad esempio, costrutti di DNA che producono dsRNA (Douchkov et al., 2005). Il DNA o il dsRNA è adeso a particelle di tungsteno o di oro che vengono sparate ad altissima velocità sul tessuto bersaglio e attraversano la parete cellulare, sfruttando un flusso di elio ad alta pressione, che passa in una camera di bombardamento nel quale viene fatto il vuoto. La presenza di dsRNA nelle cellule bombardate risulta nel silenziamento di un determinato gene. Questo metodo, pur essendo molto rapido, presenta degli inconvenienti. Uno di questi è dovuto al fatto che solo pochi strati di tessuto possono essere bombardati, escludendo la possibilità di analizzare gli effetti del silenziamento sull'intero organismo. Inoltre, tale metodologia presenta una bassa efficienza, in quanto poche cellule effettivamente vengono colpite dai microproiettili che trasportano il dsRNA e molte, a causa della pressione del bombardamento, vanno incontro a morte cellulare. Infine, il silenziamento non viene ereditato e rimane circoscritto al tessuto bombardato. Nonostante queste limitazioni, la tecnica, non presentando limitazioni biologiche, viene comunque usata per piante recalcitranti alla trasformazione stabile. Il bombardamento viene anche usato per analisi di singole cellule, dove lo studio è limitato a processi che si mostrano a questo livello e sono autonomi nelle singole cellule (per esempio, vie biosintetiche).

La trasformazione della vite (una specie difficile da trasformare) è stata ottenuta sia usando l'agroinfiltrazione (Yamamoto et al. 2000; Iocco et al. 2001) sia il metodo

biolistico (Kikkert et al., 2004) usando colture embrioniche. Con il sistema biolistico si può ovviare a diversi problemi legati alla trasformazione con *Agrobacterium*, quali: la RH che si scatena a seguito del contatto del batterio con i tessuti della vite, in combinazione con gli antibiotici usati per eliminare l'*Agrobacterium* e per effettuare la selezione dei tessuti trasformati. Chiaramente, come tutti i sistemi, i parametri per la trasformazione e la rigenerazione dei trasformati devono essere messi a punto e sono molto legati, nel caso della vite, alla cv con cui si lavora. Vidal et al. (2003 e 2006) recentemente hanno dimostrato che è possibile trasformare una sospensione cellulare di vite mediante il metodo biolistico, soltanto con una cassetta genica minimale (MCs), costituita da promotore + frammento di DNA + terminatore senza il vettore, in modo da ridurre le interferenze del DNA del vettore nella pianta e riuscendo in modo efficace a rigenerare i tessuti trasformati per ottenere delle linee di piante transgeniche stabili.

Agroinfiltrazione

L'*Agrobacterium tumefaciens* è un batterio del suolo che parassitizza le piante trasferendo una parte del suo DNA (T-DNA) nel genoma nucleare delle cellule vegetali infettate. La maggior parte delle sequenze che servono al batterio per il trasferimento del T-DNA si trovano sul plasmide Ti (tumor-inducing plasmid), che quindi contiene lo stesso T-DNA, delimitato da ripetizioni imperfette di 25 bp, conosciute come RB (right border e left border). Questo plasmide può essere modificato in modo tale da inserire il DNA desiderato al posto delle sequenze batteriche all'interno del T-DNA, perché qualsiasi sequenza contenuta tra LB ed RB viene trasferita nella cellula vegetale. Attualmente è possibile trasformare un ampio range di piante con diversi scopi perché sono disponibili molti ceppi disarmati di *Agrobacterium* e molti vettori Ti binari (sono detti binari perché in grado di replicarsi sia in *Escherichia coli* che in *Agrobacterium*) (Hellens et al., 2000). L'agroinfiltrazione venne usata per la prima volta nel 1997 nel tentativo di ottenere il silenziamento genico attraverso l'introduzione di dsRNA, e può anche essere utilizzata per trasformare le piante con i vettori VIGS (descritti in seguito). L'*Agrobacterium*, quindi, viene trasformato con il gene di interesse inserito in un costrutto per la generazione di silencing e poi usato per trasformare cellule o tessuti vegetali, attraverso, ad esempio, l'infiltrazione sulle foglie della pianta; la sequenza introdotta viene integrata nel genoma e la sua trascrizione genera dsRNA,

“azionando” il PTGS. Diversi esperimenti di trasformazione stabile di colture cellulari o embrioni con *Agrobacterium* su diverse cv di vite sono riportati in letteratura (Yamamoto et al., 2000; Iocco et al., 2001; Bornhoff et al., 2005). Recentemente Zottini et al. (2008), hanno esplorato la diversità del background genetico delle cv di vite e hanno eseguito l'agroinfiltrazione su foglie di piante *in vitro*. Attraverso la combinazione di diversi genotipi e condizioni fisiologiche, essi hanno sviluppato un protocollo per una trasformazione transiente efficiente per cv di vite selezionate.

VIGS

La maggior parte dei virus delle piante possiedono un genoma a ssRNA il quale viene rilasciato all'esterno del rivestimento proteico delle particelle virali per andare ad insediarsi all'interno della cellula ospite e replicarsi attraverso una RdRP (RNA polimerasi RNA-dipendente) codificata dal virus stesso. Tale replicazione genera filamenti senso ed antisense dello stesso template i quali hanno la potenzialità di ibridarsi a formare dsRNA. Analogamente a quanto accade nei mammiferi, il meccanismo dell'RNAi processa i dsRNA in filamenti più corti (siRNA) per utilizzarli come template ed andare a degradare l'mRNA o il ssRNA virale complementare. Questi dati supportano l'ipotesi che il meccanismo dell'RNAi si sia co-evoluto in diversi organismi come sistema di difesa da infezioni virali, oltre che da elementi trasponibili. I virus dispongono di caratteristiche che li rendono particolarmente utili per la ricerca su piante. L'RNA “nudo” (senza la protezione della particella virale) di molte specie di virus vegetali può essere usato direttamente per causare l'infezione. Questo RNA può essere ottenuto attraverso la trascrizione *in vitro* di un clone di cDNA che codifica per l'intera sequenza virale. Analogamente, l'intero cDNA virale può essere inserito in un plasmide T-DNA, espresso sotto il controllo del promotore 35s di CaMV (cauliflower mosaic virus), un forte promotore costitutivo, e trasfettato in pianta attraverso agroinfiltrazione; questo risulterà in un' infezione generata senza la presenza iniziale del virus.

E' possibile introdurre una sequenza esogena in un specifico locus del genoma virale mantenendo l'infettività del trascritto. Quando questo trascritto viene usato per infettare le piante, anche la sequenza introdotta artificialmente diventa bersaglio del meccanismo dell'RNAi, ma se il virus porta artificialmente sequenze geniche della pianta stessa, si può ottenere un silenziamento specifico dell'mRNA endogeno della pianta e successivamente è possibile osservare il fenotipo derivante dal

silenziamento del gene in questione. Questo metodo, chiamato VIGS, è molto utilizzato in piante per studiare la funzione dei geni. *Nicotiana benthamiana* è stata la prima specie sulla quale è stato applicato il VIGS; tale approccio è stato successivamente utilizzato per molte altre piante, tra cui *Arabidopsis thaliana*. Il VIGS ha permesso di studiare diversi geni, da quelli implicati in vie biosintetiche a quelli coinvolti nella resistenza a patogeni e, sorprendentemente, è stato osservato che il silenziamento genico avviene anche nelle zone meristematiche. Poiché è noto che i meristemi non vengono infettati da virus, ciò ha fatto dedurre che il silenziamento venga propagato sistemicamente, probabilmente attraverso siRNA (Baulcombe, 1999). Gli esperimenti di maggior successo sono stati effettuati utilizzando come vettori TMV (tobacco mosaic virus), PVX (potato-virus X), TRV (tobacco-rattle virus) e come bersaglio del silenziamento geni reporter di piante trasformate con geni per la GFP e GUS (β -glucuronidase), o geni endogeni come PDS (phytoene-desaturase). In quest'ultimo caso le piante silenziate mostravano un imbianchimento delle foglie a causa della compromessa protezione della clorofilla dalla luce incidente (photobleaching).

Applicazioni del gene silencing

Molti progetti di ricerca prevedono il silenziamento di geni per studi di genomica funzionale in piante economicamente importanti o l'utilizzo del silencing per ottenere resistenza a determinati virus vegetali. Un interessante esempio attinente a questi ultimi aspetti è il lavoro di Ogita et al. (2003) che, silenziando attraverso l'RNAi il gene della theobromina sintasi (CaMXMT1) in caffè, coinvolto nella sintesi della caffeina, hanno ottenuto piante naturalmente decaffeinatizzate senza comprometterne nessun altro aspetto fisiologico. Nell'ambito della genomica funzionale il silencing è stato inoltre usato per studiare i geni coinvolti nella difesa della pianta contro i patogeni.

Dong et al. nel 2006 hanno silenziato in orzo i geni per la sintesi della poliubiquitina. I risultati di questo esperimento hanno consentito di dimostrare che l'attivazione del pathway dell'ubiquitina in orzo è importante anche per la difesa contro il fungo fitopatogeno *Blumeria graminis*, agente dell'oidio dell'orzo.

Cenni sui miRNAs

In aggiunta al ruolo del gene silencing come sistema di difesa, vi è quello correlato al controllo dell'espressione genica affermatosi con la scoperta dei microRNAs (miRNAs) in diversi organismi, incluse le piante. I miRNAs sono piccoli RNA lunghi circa 22 nucleotidi; derivano da trascritti non codificanti e funzionano come repressori nella regolazione genica in eucarioti. I miRNAs di piante e animali differiscono per sequenza, quantità, pattern di espressione e localizzazione genomica. Alcuni di essi possiedono un proprio locus, altri, invece, sono contenuti all'interno di regioni introniche di altre sequenze codificanti, spesso nello stesso senso; questo suggerisce che probabilmente vengono trascritti in concomitanza del loro gene ospite. I miRNAs quindi entrano a fare parte di tutte quelle sequenze che fino ad ora sono state annotate come intergeniche o unità policistroniche. Studi su piante ed animali hanno rilevato che i miRNAs vengono trascritti dall'RNA polimerasi II a partire dal loro stesso promotore. Essendo geni di classe II (pri-miRNA) possiedono introni, sono poliadenilati e hanno il cap al 5'. Questi pri-miRNA sono dotati di una sequenza che li conforma in una struttura secondaria a forcina, non perfettamente complementare. Il miRNA funzionale è contenuto in uno dei due bracci della forcina. La struttura dei pri-miRNA è essenziale per il riconoscimento e il processamento da parte di una ribonucleasi di classe III (RNasi III) che li taglia in miRNA più piccoli (chiamati pre-miRNA). Generalmente i miRNAs maturi vengono integrati in un complesso chiamato miRNP (micro ribonucleoproteine) (simile a RISC per i siRNA). I miRNAs interagiscono con l'mRNAs target attraverso complementarità delle basi. Due tipi di meccanismi sono stati individuati a carico del silenziamento mediato dai miRNAs: uno prevede la degradazione dell'mRNA bersaglio, l'altro il blocco della traduzione dello stesso. L'azione di uno o dell'altro processo è discriminato dalla complementarità tra mRNA e miRNA. Nel caso di un perfetto appaiamento si verifica il taglio dell'mRNA mediato dal complesso, come avviene per il silenziamento mediato da siRNA. Se l'appaiamento risulta invece non perfetto il miRNA si lega alla regione 3'UTR dell'mRNA bloccandone la traduzione. Questi miRNAs, vista la loro natura regolatrice, si trovano molto conservati all'interno di molte specie, e in alcuni casi arrivano a costituire l'1% del genoma, mostrandosi come il componente regolatore più rappresentativo (Brodersen and Voinnet, 2006).

Schwab et al nel 2006 costruendo miRNAs artificiali che potevano silenziare gli stessi target dei miRNAs cellulari hanno dimostrato, in *A. thaliana*, che diversi miRNAs cellulari sono implicati nel silenziamento di alcuni fattori trascrizionali.



OBIETTIVI

- ❖ sviluppare un sistema di silenziamento genico transiente in foglie vite *in vitro* focalizzato sul gene target PDS (Phytoene desaturase) e ottenuto mediante l'introduzione di vettori che esprimono RNA a doppio filamento veicolati in pianta tramite trasformazione con *Agrobacterium tumefaciens*;
- ❖ sviluppare un sistema di silenziamento genico transiente in foglie di vite *in vitro* utilizzando vettori che generano RNA a doppio filamento veicolati mediante il metodo del particle bombardment.



MATERIALI E METODI

MATERIALI SPERIMENTALI

Materiale vegetale

Il materiale vegetale utilizzato in questo lavoro è costituito da piante di *Vitis vinifera* L. di diverse cv: Pinot Nero 115x5BB cl 114, Moscato giallo, Aleatico, Superior e la vite Run1, ottenuta per incrocio tra *Vitis vinifera* e *Muscadinia rotundifolia* (specie che porta il gene di resistenza Run1), seguendo uno schema di incrocio di pseudo-backcross, utilizzando ad ogni reincrocio una cv diversa (Fig.6) (Bouquet, 1986).

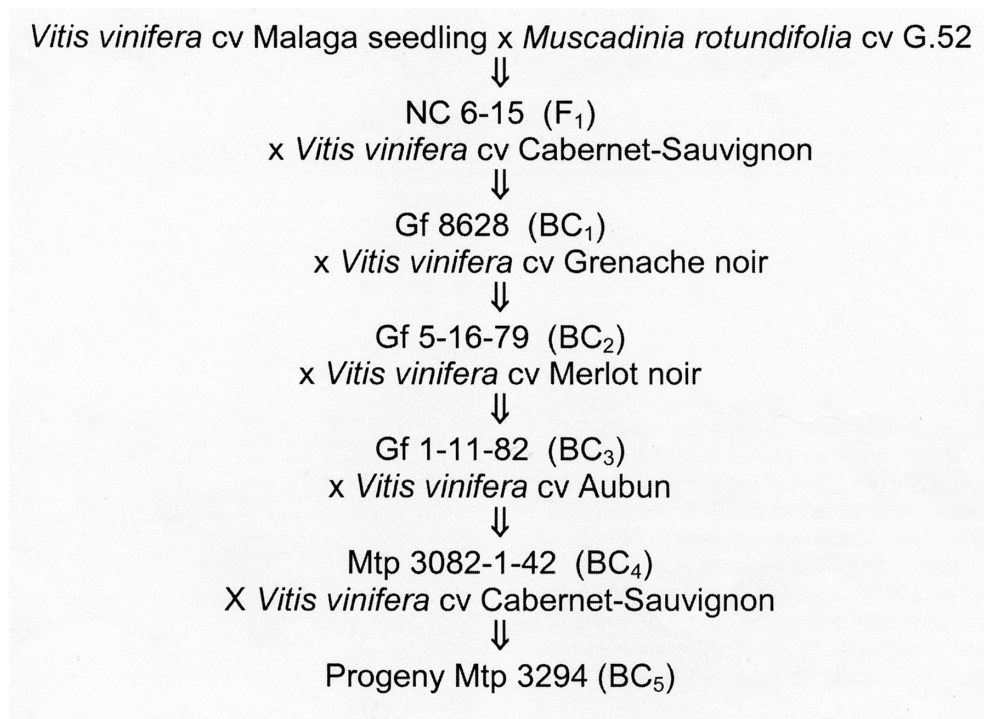


Fig.6 Schema di incrocio di pseudo-backcross utilizzato per ottenere la vite Run1.

Micropropagazione da microtalee

Il materiale di partenza dal quale sono state ottenute le microtalee è stato prelevato da piante in serra. Il protocollo prevede prima la sterilizzazione degli espianti e poi la messa in coltura.

La procedura è la seguente:

- Prendere la parte apicale della pianta e tagliarne una sezione in modo tale da avere tre nodi per ricavarne circa tre microtalee per ogni apice.
- Durante il trasporto dalla serra al laboratorio tenerle in becher con acqua sterile.
- Portare il tutto sotto cappa sterile.
- Sterilizzazione: fare un lavaggio con ipoclorito di sodio commerciale diluito quattro volte in acqua sterile, al quale si aggiunge una goccia di Tween 80, per 10 minuti agitando i contenitori.
- Fare tre lavaggi di 7 minuti ciascuno con acqua sterile agitando i contenitori con le mani.
- Tagliare le sezioni di pianta a livello degli internodi togliendo tutte le foglioline. Le microtalee devono essere molto piccole: circa 2 cm di altezza.
- Mettere circa 15 microtalee in contenitore VitroVent[®] contenente il terreno MS 1/2 addizionato di IBA (*Indole-3-Butyric Acid*) 0,1 mg/l e BAP (*6-BenzylAminoPurine*) 0,5 mg/l.
- Mettere in cella di crescita a 23±1 °C con 16h di luce e 8h di buio.
- Dopo circa 15 giorni trasferire le microtalee in Microbox[®] più alti (3 microtalee per Microbox[®]) contenenti terreno MS 1/2 senza ormoni.

Terreno MS (MURASHIGE and SKOOG, 1962)

4,4 g/l MS (*Duchefa Biochimie B.V.*)

30 g/l Saccarosio

8 g/l Agar

0,5 mg/l BAP

0,1 mg/l IBA

Sciogliere in 1L di acqua distillata.

pH 5.8 con KOH

ANALISI MOLECOLARE

Sequenze dei geni

Le sequenze EST dei geni da amplificare e inserire nei vettori sono state ricercate nelle banche dati del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), TIGR Grape Gene Index (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=grape>) e IASMA Genomics (<http://genomics.research.iasma.it/iasma>).

Sistema Gateway[®]

La tecnologia Gateway[®] è un metodo di clonaggio che consente di trasferire in modo rapido ed efficiente frammenti di DNA tra diversi vettori di clonaggio, basandosi su un sistema di ricombinazione sito-specifica. Tutti i passaggi sono stati effettuati seguendo il manuale del pENTR[™] Directional TOPO[®] Cloning Kits dell'Invitrogen. La prima fase prevede l'amplificazione della sequenza del gene di interesse mediante PCR (Tab.2).

Gene name	GB Accession	Tigr Accession	EST name	Primer
PDS	CN007512		CSECS150F8	PDS-4 5'-CACCCCAATTTTACTGGTGAATGGT-3'
				PDS-5 5'-CCCAAACAATCTATGCTGGA-3'
				PDS-6 5'-CCAATTTTACTGGTGAATGGT-3'
				PDS-7 5'-CACCCCAACAATCTATGCTGGA-3'
RAR1	CF373047	TC48174	CSECS083C05	RAR1-4 5'-CACCTTGTATGAAAGCCCATG-3'
				RAR1-5 5'-AACATGGTTCACAAGCCAGA-3'
EDS1	CB003996	TC47633	VVB034F07	EDS1-4 5'-CACCATCCGTTGCCGCTAGTTTGA-3'
				EDS1-5 5'-GTTACTACGACGCCTTCAAGC-3'
NDR1	CB001372	TC47718	VVB003D01	NDR1-4 5'-CACCAGCTCGGATGCTCCAAGCGA-3'
				NDR1-5 5'-CGGCCGCTCTAGAACTAGTG-3'
NPR1	CD718779	TC49238	VVB154A09	NPR1-4 5'-CACCGCAAGAGAGTCTACTGTTAGTCCTTC-3'
				NPR1EST-Fw 5'-GCTATAGCAGGCGATGATCTG-3'
SGT1	CB349232	TC39101	CAB2SG0006	SGT1-4 5'-CACCAACATTTTCATCTGCTACGCC-3'
				SGT1-5 5'-CTCCGATTCCTAATTCAAC-3'
PEN1	CF516408	TC41126	CAP0003IVFG09	PEN1-4 5'-CACCTGAAGGAAGGTTTCGCTCTC-3'
				PEN1-5 5'-CCCGGCTAATCATGAACGAT-3'
Ubiquitina	CF606748	TC93460	GEMMA01-000140	CF606748-Fw2 5'-CACCGGAAAGACCATCACCCCTG-3'
				CF606748-Rev 5'-TCTTCACGAAGATTTGCATACCA-3'
mlo	CF209979	TC74396	CAB20005IVbRb	CF209979-Fw2 5'-CACCGCAAGCAAAACCTTGACTAATACC-3'
				CF209979-Rev 5'-CATGGGACAATTGGGTTTCA-3'

Tab.2 Nomi e numeri di accessione degli EST dei geni amplificati da inserire nei vettori e sequenze dei primer usati per l'amplificazione.

Polymerase Chain reaction (PCR)

Per amplificare le sequenze è stata utilizzata la Platinum[®] Pfx DNA Polymerase (Invitrogen). Durante l'amplificazione del DNA il termociclatore usato è *Applied Biosystems 2720*.

Mix di reazione

Componente	Quantità da aggiungere
H ₂ O	Fino a 50 µl
PCR Buffer 10x	10 µl
dNTPs (10 mM)	1,5 µl
MgSO ₄	0,5 µl
Primer 5' (10 µM)	1,5µl
Primer 3' (10 µM)	1,5µl
DNA (10 ng/µl)	1 µl
Taq Pol. (5 u/µl)	0,5 µl

Programma di amplificazione

N° Cicli	Temperatura	Tempo
1	94 °C	2 minuti
35	94 °C	30 secondi
	50 °C	35 secondi
	68 °C	1 minuto
	15 °C	∞

Eluizione di bande da gel

Dopo aver effettuato una separazione elettroforetica del materiale in analisi, mediante gel d'agarosio all'1%, si sono escisse le bande di interesse dal gel, mediante cutter opportunamente sterilizzato, e sono state inserite in un tubo sterile. La purificazione del materiale genetico "contenuto" nella banda eluita è stata eseguita mediante il kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* della Promega (<http://www.promega.com/>).

Quantificazione DNA

Dopo aver terminato la purificazione del frammento, è stata effettuata la quantificazione del DNA per determinare la concentrazione in soluzione, che è servito per allestire la reazione di clonaggio: si sono utilizzate due modalità differenti:

- con spettrofotometro. Per la quantificazione del DNA ci si è avvalsi dello spettrofotometro (DU640, Beckam). Si esegue la lettura dell'assorbanza UV diluendo il campione in acqua contro un bianco (acqua) a 260 nm e a 280 nm.
- su gel di agarosio: caricare 1 µl di DNA risospeso (1 µl di DNA + 9 µl di H₂O + 2 µl di *loading buffer* 6x) in un gel di agarosio all' 1% (1g di agarosio per 100 ml di tampone TBE). Fare correre a un lato un marker (1Kb *ladder*, Fermentas) e almeno tre concentrazioni note di DNA λ. Mediante confronto con gli standard , a vista o con un appropriato software (Molecular Analyst[®], Bio-Rad), si può risalire alla concentrazione del campione.

Preparazione Loading Buffer:

- Blu di bromofenolo 250 mg
- Cilene 250 mg
- Glicerolo 30 g
- H₂O sterile 70 ml

Preparazione del TBE 5x:

- Tris 54 g
- Ac. Borico 27,5 g
- EDTA 0,5 M (pH 8) 20 ml
- H₂O distillata ad 1 litro

Dopo ogni corsa elettroforetica bisogna effettuare una lettura del gel al visualizzatore di gel Gel Doc (Bio-Rad).

Analisi al Gel Doc

Il gel è fotografato con lo strumento a telecamera GelDoc 1000 (Bio-Rad) digitalizzato con il software Molecular Analyst[®] (Bio-Rad).

Reazione di clonaggio TOPO®

Dopo aver ottenuto il prodotto di PCR, si procede all'inserimento del frammento all'interno del vettore pENTR™/SD/D-TOPO® (Invitrogen) (Fig. 7).

Razione di clonaggio

Reagenti	µl
Prodotto di PC (20 ng/µl)	1
Soluzione Salina	1
Acqua Sterile	3
Vettore TOPO® (20 ng/µl)	1
Volume finale	6

La reazione va agitata delicatamente e incubata per 5 minuti a temperatura ambiente. Trascorsi i 5 minuti la reazione va messa in ghiaccio.

Si procede alla trasformazione delle cellule competenti.

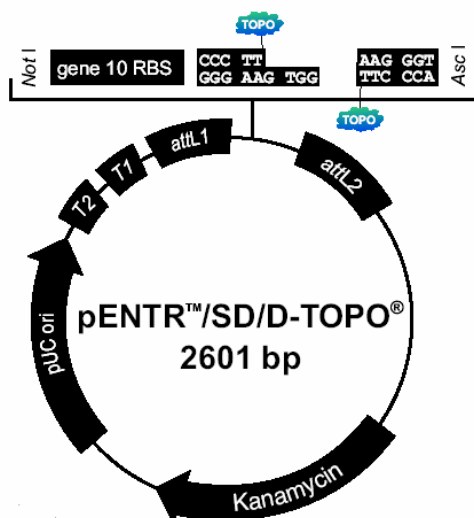


Fig.7 pENTR™/SD/D-TOPO® (Invitrogen)

Trasformazione cellule competenti

In questa fase il costrutto (vettore + frammento) viene trasferito all'interno delle cellule competenti One Shot® TOP10 (Invitrogen), seguendo il protocollo allegato al kit *One Shot® Chemical Transformation* (Invitrogen).

Terreno LB liquido:

Le colonie batteriche ottenute dalla trasformazione vengono usate per inoculare terreno di crescita LB:

10g Triptone

5g Estratto di lievito

10g NaCl

Sciogliere in 1 litro di acqua distillata. Portare a pH 7,5 con NaOH. Autoclavare.

Per ottenere il terreno LB solido si aggiunge agar (15 g/l).

Estrazione DNA plasmidico

E' una metodologia che consente di estrarre il DNA plasmidico di interesse da cellule batteriche.

Si preleva una colonia dalla piastra e la si fa crescere in Falcon (da 15 ml) in 7 ml di terreno LB liquido con l'aggiunta di kanamicina (50 mg/l).

Agitare a 170 rpm e a 37°C over night.

L'estrazione è stata effettuata con il kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

Digestione DNA plasmidico

Per selezionare il plasmide (pENTR) in cui il frammento si è inserito correttamente, si effettuano due digestioni separate con: NotI, che riconosce un sito di taglio nel plasmidio, e con un enzima che taglia solo nella sequenza inserita, ma non nel vettore. I prodotti della restrizione sono stati analizzati mediante una corsa elettroforetica.

La mix di digestione è la seguente:

- DNA 1,5 µl
- Buffer 10x 1 µl
- Enzima (1,0 unità/ µl) 0,5 µl
- H₂O 7 µl

Il volume totale della mix è 10 µl.

I campioni sono in seguito incubati 2h alla temperatura di 37°C.

Nella tabella sottostante sono riportati gli enzimi utilizzati in questo lavoro; le ditte produttrici sono Fermentas e Promega.

ENZIMA	SITO DI TAGLIO
HindIII	5'-a/agctt-3' 3'-ttcga/a-5'
SacI	5'-gagct/c-3' 3'-c/tcgag-5'
XbaI	5'-t/ctaga-3' 3'-agatc/t-5'
NotI	5'-gc/ggccgc-3' 3'-cgccgg/cg-5'

Dopo aver effettuato la digestione, si procede con un'elettroforesi su gel di agarosio 1% per identificare i cloni in cui il frammento si è inserito correttamente.

Sequenziamento

Un ulteriore controllo delle colonie positive è effettuato mediante sequenziamento degli inserti clonati nei vettori pENTR/SD/D-TOPO[®].

Per il sequenziamento è stato utilizzato il *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, [Http://www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)) che sfrutta il principio del metodo di Sanger, che consiste in una terminazione della reazione di amplificazione ad opera di dideoossinucleotidi associato ad un elettroforesi capillare operata mediante sequenziatori. I nucleotidi di-deossi interrompono la reazione di polimerizzazione e questo determina la presenza di un pool di ampliconi di dimensioni diverse in base al punto in cui è stato incorporato il ddNTP, inoltre ognuno di questi ddNTP è marcato con fluoroforo differente a seconda della base che porta, che può essere rilevato dal detector di un sequenziatore automatico su cui il pool viene analizzato mediante elettroforesi capillare. Il sequenziatore dispone di un software in grado di trasformare il segnale elettrico rilevato in un elettroferogramma, rappresentativo della sequenza nucleotidica in analisi.

La reazione di amplificazione è eseguita nel seguente modo:

Mix di reazione

Componenti	Quantità
DNA	150-200ng per plasmidi 1,5ng/100bp per frammenti purificati
Primers	3,2-6,4-8 pmoli
BigDye v3.1	0,3 µl per reazione

Condizioni di tempi e temperature

Temperatura	Tempi	Cicli
96°C	1 minuto	1
95°C	10 secondi	25
50°C	5 secondi	
60°C	4 minuti	
4°C	∞	

La purificazione delle sequenze amplificate viene fatta mediante precipitazione con etanolo assoluto e sodio acetato 3M, per eliminare i sali ed i ddNTPs non incorporati. Successivamente vengono risospese in 20 µl di acqua sterile e caricate nel sequenziatore capillare Applied Biosystems Genetic Analyzer 3130XL a 16 capillari. I dati grezzi raccolti dal sequenziatore sono stati analizzati con il programma *Chromaslite Version 2.01* (www.technelysum.com.au).

Reazione di ricombinazione tra pENTR™/SD/D-TOPO® e pK7GWIWG2(II), pK7GWIWG2D(II) o pIPKTA30N

Il pENTR nel quale è stata inserita la sequenza in analisi è stato ricombinato con: pK7GWIWG2(II), pK7GWIWG2D(II) (www.psb.ugent.be) (Fig.8 e 9), vettori binari basati sul sistema Gateway® che sono in grado di replicarsi in *Agrobacterium tumefaciens*, e con il vettore pIPKTA30N (from IPK, Gatersleben Germania; Douchkov et al.2005) (Fig.10), basato sempre sul sistema Gateway® ed utilizzato per il metodo biolistico. Con un unico processo di ricombinazione la sequenza è stata clonata nei suddetti vettori in orientamento senso e antisenso. Le reazioni sono condotte separatamente e portano ad avere due tipi diversi di vettori di destinazione che portano le stesse sequenze geniche. Una volta veicolato nel genoma della

pianta questo costrutto genico viene trascritto in un RNA che, ripiegandosi su se stesso grazie alla presenza di un introne che separa le copie senso e antisenso, forma un loop ed una struttura a dsRNA in grado di sviluppare silencing con maggiore efficienza rispetto a vettori che sovraesprimono la sequenza del gene o esprimono il suo antisenso.

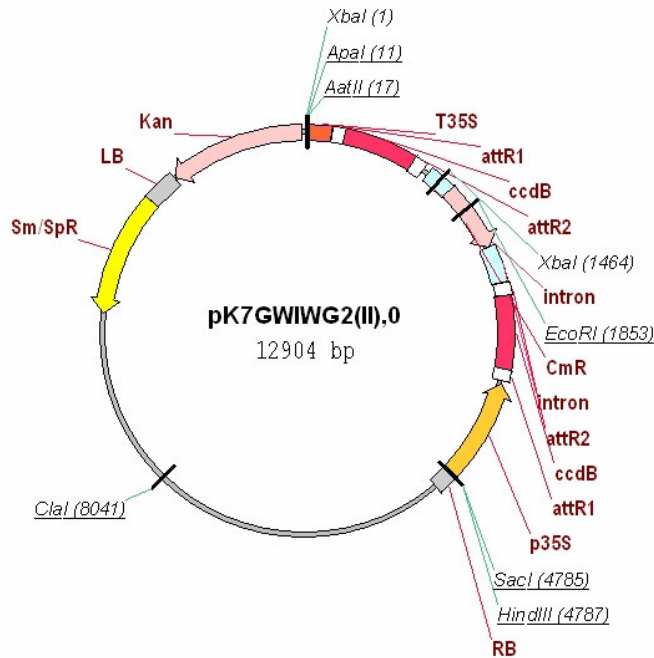


Fig.8 Vettore binario Gateway® pK7DGWIWG2(II) (www.psb.ugent.be)

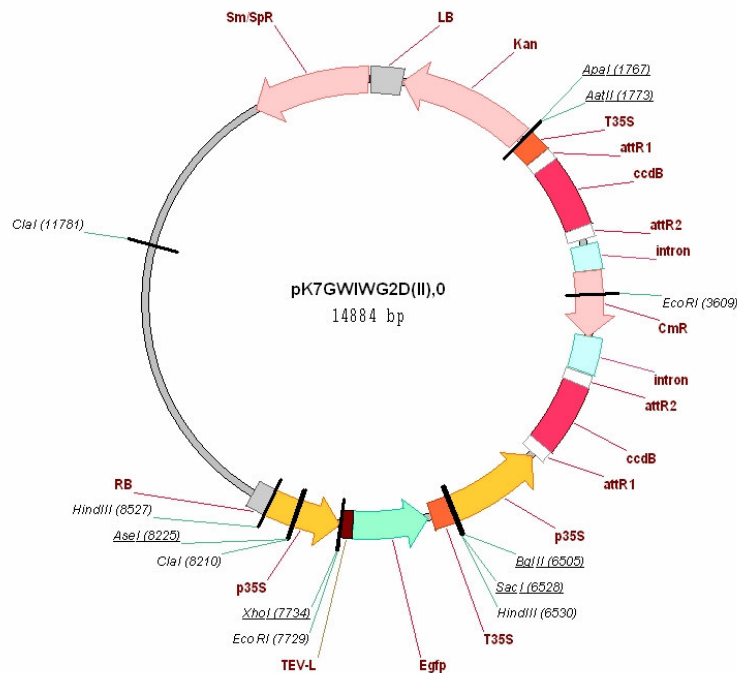


Fig.9 Vettore binario Gateway® pK7DGWIWG2D(II) (www.psb.ugent.be)

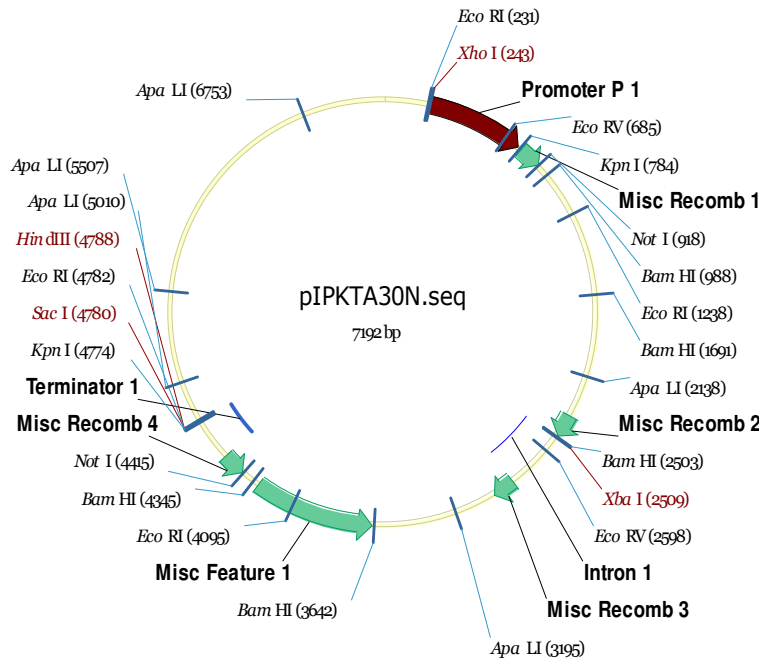


Fig.10 Vettore Gateway® pIPKTA30N (Douchkov et al.2005)

La reazione di ricombinazione è stata effettuata utilizzando il kit *Gateway® LR CLONASE™ Enzyme Mix* (Invitrogen™).

Procedura:

- Aggiungere i seguenti componenti, in un tubo da 1,5 ml, a temperatura ambiente e mescolare:

pENTR+sequenza (160 ng/ µl)	1 µl
vettore di destinazione (160 ng/ µl)	1 µl
H ₂ O	4 µl
Buffer di reazione	2 µl

- Scongellare l'enzima LR Clonase™ Enzyme Mix in ghiaccio.
- Vortexare brevemente l'enzima.
- Aggiungere 2 µl di enzima. Mescolare con la pipetta.
- Incubare la reazione in termociclatore a 25°C over night.

Con la reazione di ricombinazione sono state trasformate le cellule DH5α tramite elettroporazione, per i costrutti del pK7GWIWG2 e pK7GWIWG2D, e le cellule competenti TOP10 per i costrutti del pIPKTA30N, seguendo il protocollo descritto in precedenza.

Verifica delle colonie positive

Le colonie nate dalla trasformazione sono state testate con una colony PCR per trovare i cloni positivi. Su ogni colonia sono state condotte due PCR separate in modo tale da amplificare sia il senso che l'antisense, usando un primer sul promotore+un primer sulla sequenza e nell'altra reazione un primer sul terminatore+un primer sulla sequenza. Le bande ottenute sono state purificate e sequenziate per verificare l'inserimento della sequenza. Inoltre, i plasmidi delle colonie positive, sia per pK7GWIWG2/D che per pIPKTA30N, sono stati sottoposti ad una digestione con l'enzima Bsp1407I (Fermentas[®]) che taglia solo nelle regioni di ricombinazione, per verificare se c'è stata reazione di ricombinazione.

I primer usati per pK7GWIWG2/D sono: P27-5 (5'-GGGATGACGCACAATCC-3') + primer reverse sulla sequenza e T35S-Fw (5'-GAGAGACTGGTGATTTTTGCGGACTCTAGC-3') + primer reverse sulla sequenza.

I primer usati su pIPKTA30N sono: P27-5 + primer reverse sulla sequenza e M13FC (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') + primer reverse sulla sequenza.

Mix di reazione per la colony PCR:

DNA (colony)	1,5 µl
Buffer 5X	4 µl
dNTPs (2 mM)	2 µl
MgCl ₂	1 µl
DMSO	1 µl
Primer Fw	1 µl
Primer Rev	1 µl
Go Taq Polymerase (5 u/ µl)	0,35 µl
H ₂ O	8.15 µl
TOT	20 µl

La Taq polimerasi usata è la GoTaq[®] FlexI DNA Polymerase (Promega); DMSO sta per di-Metil Solfossido.

Programma di amplificazione:

N° Cicli	Temperatura	Tempo
1	95°C	3 minuti
35	95°C	30 secondi
	51°C	30 secondi
	72°C	1 minuto
1	72°C	5 minuti
	15°C	∞

I vettori positivi di pk7GWIWG2 sono stati digeriti con XbaI e SacI contemporaneamente, mentre i vettori positivi di pK7GWIWG2D sono stati digeriti con XbaI, se nella sequenza inserita questo sito non era presente, o con EcoRI se XbaI era presente anche nella sequenza, per verificare la corretta orientazione dell'introne a seguito della ricombinazione. I vettori positivi di pIPKTA30N sono stati digeriti con NotI.

Le bande ottenute dalla colony PCR sono state purificate e sequenziate come verifica finale dell'inserimento delle sequenze.

Con il vettore ricombinato in modo corretto pK7GWIWG2/D+PDS (pK7/D/PDS) sono stati trasformati i ceppi di *A. tumefaciens* C58C1 e AGL1.

Tutti i vettori per il silencing ottenuti, sia per l'agroinfiltrazione che per il metodo biolistico, verranno utilizzati quando il metodo sarà sviluppato.

Trasformazione di A. tumefaciens e Agroinfiltrazione di vite

Trasformazione di *A. tumefaciens*

Questa metodologia consente di trasformare *A. tumefaciens* con il vettore pK7/D/PDS.

La procedura seguita è quella di Zottini et al. 2008 e il vettore è stato introdotto attraverso elettroporazione. La crescita dei batteri è stata ottimizzata in terreno LB per C58C1 e YEP per AGL1.

Le colonie positive dell' *Agrobacterium* trasformato sono state identificate mediante crescita su terreno selettivo e ulteriormente verificate tramite "PCR colony". Quest'ultima è stata condotta mediante denaturazione iniziale di 4 minuti a 95 °C e da una $T_m=52^\circ\text{C}$ e usando primers specifici per la PDS.

I ceppi di *Agrobacterium* possiedono la resistenza alla rifampicina, mentre il vettore pK7GWIWG2/D(II) alla streptomicina e cloramfenicolo.

Terreno YEP:

Bacto-Triptone	10 g/l
Estratto di lievito	10 g/l
NaCl	5g/l

Acqua distillata fino ad 1L. pH 7.

Gli antibiotici vanno aggiunti sotto cappa, dopo aver autoclavato e fatto raffreddare in bagnetto a 60 °C il terreno, alle seguenti concentrazioni:

Rifampicina	25 mg/l
Streptomicina	25 mg/l
Cloramfenicolo	50 mg/l

Agroinfiltrazione di vite

Con i ceppi di *A. Tumefaciens*: AGL1 + pK7/D/PDS, C58C1 + pK7/D/PDS si sono trasformate piante di vite di Moscato giallo, Aleatico e Superior mediante Agroinfiltrazione con siringa senza ago.

Procedura e preparazione di A. tumefaciens per l'infiltrazione (da Zottini et al. 2008)

Due giorni prima dell'agroinfiltrazione, singole colonie di *A. tumefaciens* cresciute su piastre di agar sono state inoculate in 5 ml di YEP liquido addizionato con specifici antibiotici. Le colture batteriche sono incubate per due giorni a 28-30 °C a 200 rpm. Due giorni dopo le colture sono state inoculate con terreno fresco (1/200 v/v). Le nuove colture sono cresciute sotto le stesse condizioni per un altro giorno. Dopo 24h, 2 ml di ogni coltura batterica è stata trasferita in Eppendorf e pellettata centrifugando a 1500 giri per 4 min a temperatura ambiente. Il pellet è stato lavato due volte con 2 ml di buffer di infiltrazione. Le sospensioni batteriche sono diluite con infiltration buffer a OD_{600} pari a 0,2 e poi fatte crescere al buio per 1-2h a 25 °C in lenta agitazione, prima di usarle per l'agroinfiltrazione.

Gli inoculi sono veicolati nella lamina fogliare di vite *in vitro* attraverso una leggera pressione esercitata da una siringa senza ago da 1 ml, attraverso gli stomi sulla pagina inferiore. Sono state inoculate giovani foglie non completamente espanse (2/3 delle dimensioni finali). Dopo l'infiltrazione le piante sono trasferite in una camera di crescita alle condizioni standard di crescita.

Buffer di infiltrazione:

50 mM	MES pH 5,6 (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid Hydrate)
2 mM	Na ₃ PO ₄
0,5%	glucosio (p/v)
100 µM	acetosiringone (3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxy-acetophenone)

Valutazione delle foglie trasformate

Le foglie agro infiltrate sono state osservate dopo 6 e 12 giorni dall'agroinfiltrazione.

La prima osservazione è stata fatta utilizzando lo stereomicroscopio per osservare il fenotipo del silencing, ovvero il fenotipo del photobleaching nei siti di infezione.

La fluorescenza data dalla GFP presente sul vettore è stata saggiata prima usando uno stereomicroscopio epifluorescente. Successivamente, è stata fatta l'analisi al microscopio confocale usando un apparecchio Nikon PCM2000 (Bio-Rad, Germany) laser scanning confocal imaging system. Per la GFP sono state utilizzate lunghezze d'onda di eccitazione di 488 nm e ed un'emissione 515/530 nm. Per la clorofilla l'eccitazione era pari a 488 nm e l'emissione sui 570 nm. Le analisi delle immagini sono state condotte con ImageJ bundle software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Analisi dei trascritti

Per avere una ulteriore conferma dell'avvenuto silenziamento genico della PDS sono stati condotti esperimenti di RT-PCR semiquantitativa sui tessuti che mostravano il fenotipo di photobleaching.

Sono stati accuratamente escissi i tessuti trasformati a livello dei siti di agroinfiltrazione e da essi è stato estratto l'RNA totale secondo il seguente protocollo (Bekesiova et al., 1999).

Protocollo primo giorno:

- pre-riscaldare una falcon da 50 ml con 20 ml di buffer di estrazione (sono necessari 20 ml di buffer/g di foglia);
- raccogliere 1 g di foglia;
- congelare il campione in azoto liquido e conservarlo a -80°C o utilizzarlo subito;
- polverizzare il campione usando un mortaio e azoto liquido;
- raccogliere la polvere nel tubo falcon, contenente il buffer di estrazione precedentemente riscaldato, e mescolare vigorosamente;
- sotto cappa chimica aggiungere un ugual volume (20 ml) di cloroformio:isoamylalcol (fase di estrazione), mescolare delicatamente e porre sotto lieve agitazione per 10 minuti;
- porre la soluzione in un tubo corex, centrifugare a 10,000 rpm per 10 min a 4°C;
- prelevare la fase superiore (~15 ml) e trasferirla in un nuovo tubo corex;
- ripetere la fase di estrazione: aggiungere un ugual volume di cloroformio:isoamylalcol, centrifugare immediatamente e porre il surnatante in un nuovo tubo corex;
- ripetere la fase di estrazione: aggiungere un ugual volume di cloroformio:isoamylalcol, centrifugare immediatamente e porre il surnatante in una nuova falcon;
- aggiungere 1 vol di 10 M LiCl e mescolare bene;
- precipitare l'RNA a 4° o/n.

Protocollo secondo giorno:

- centrifugare il tubofalcon a 10,000 rpm per 20 min a 4°C;
- lavare il pellet con etanolo 70% (~ 500 µl), vortexare bene e velocemente per staccare il pellet, trasferirlo per inversione in una eppendorf, centrifugare (10 min 13,2 rpm);
- lavare il pellet con 3 M sodium acetate (pH 5.2) (~ 500 µl), centrifugare (10 min 13,2 rpm), eliminare il surnatante;
- lavare il pellet con etanolo 70% (~ 500 µl), centrifugare (10 min 13,2 rpm), eliminare il surnatante;

- lavare il pellet con etanolo 70% (~ 500 µl), centrifugare (10 min 13,2 rpm), eliminare il surnatante, far asciugare il pellet;
- sciogliere l'RNA in 60 µl di H₂O DEPC (velocemente);
- porre i campioni a 65 °C per 5 min;
- vortexare, spinnare brevemente;
- controllare l'integrità dell'RNA mediante corsa elettroforetica (1% agarosio);
- misurare la concentrazione dell'RNA allo spettrofotometro, fare aliquote da 10 µg, aggiungere 1:10 di NaAc 3M e 2 vol di etanolo assoluto. Conservare a -20 °C.

Protocollo terzo giorno: Trattamento DNasi:

- Preparare in un eppendorf da 1,5 ml: 10 µg di RNA, 5 µl di DNasi (2U/µl, Ambion, UK, conservata a -20 °C sportello PCR), 10 µl di buffer 10x e portare la miscela di reazione ad un volume finale di 100 µl con H₂O mQ;
- Incubare i campioni per 1h e 30 min a 37 °C in un bagnetto termostato;
- Inattivare l'enzima: 15 min a 70 °C;
- Precipitazione: aggiungere 0.1 volumi di sodio acetato 3 M pH 5.2 (10 µl) e 2.5 volumi di etanolo assoluto (275 µl);
- Porre i campioni a -20 °C per 30 min / 40 min / 1h;
- Centrifugare i campioni per 15 min a 13,200 rpm;
- Lavare il pellet con etanolo 70% (~500 µl, centrifugare 5 min, 13,200 rpm), eliminare il surnatante;
- Aggiungere 500 µl di sodio acetato 3 M;
- Vortexare 10 sec per staccare il pellet, centrifugare 5 min e rimuovere il surnatante;
- Eseguire due lavaggi con etanolo 70% (vortex, centrifugare 5 min max speed);
- Asciugare il pellet sotto cappa;
- Aggiungere 10 µl di H₂O mQ;
- Risospensione RNA: porre i campioni a 65 °C per 5 min (temperatura a cui l'RNA si distende);
- Vortexare, porre in ghiaccio per due minuti, spinnare e conservare a -80 °C;

Controllare la concentrazione dell'RNA allo spettrofotometro e l'integrità dell'RNA mediante corsa elettroforetica su gel denaturante all'1% di agarosio.

Buffer di estrazione
300 mM Tris-HCl (pH 8.0)
25 mM EDTA (pH 8.0)
2.0 M NaCl
2% (w/v) CTAB
2% (w/v) PVPP K25

Tutte le soluzioni, eccetto il Tris-HCl, vanno preparate con acqua Millipore purificata, trattata con diethylpyrocarbonato (DEPC).

Retrotrascrizione:

Per ottenere il cDNA è stato utilizzato il kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen).

Protocollo:

- aggiungere i seguenti componenti ad un eppendorf sterile:

Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ (500 µg/ml)	1 µl
5 µg di RNA totale	x µl
dNTP mix (10 mM ognuno)	1 µl
H ₂ O sterile	a 12 µl
- incubare la mix a 65°C per 5 min e velocemente raffreddare in ghiaccio. Centrifugare brevemente e aggiungere:

5X First-Strand Buffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNaseOUT™ (40 unità/ µl)	1 µl
- miscelare gentilmente ed incubare a 42°C per 2 min;
- aggiungere 1 µl (200 unità) di SuperScript™ II RT e miscelare spipettando gentilmente su e giù;
- incubare a 42°C per 50 min;
- inattivare la reazione incubando a 70°C per 15 min.

La reazione è stata portata ad un volume finale di 100 µl H₂O sterile e di questi ne sono stati utilizzati 5 µl per ogni reazione di PCR. Di conseguenza, per ogni reazione di PCR sono stati utilizzati circa 250 ng di RNA totale.

Per le amplificazioni è stata utilizzata la GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega) ed è stato seguito il protocollo allegato.

Mix di reazione:

cDNA	5 µl
Buffer 5x GoTaq Flexi	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
MgCl ₂	2,5 µl
primer Fw (10 µM)	1,5 µl
primer Rev (10 µM)	1,5 µl
Go Taq polymerase	0,25 µl
H ₂ O	a 50 µl

Programma di amplificazione:

N° Cicli	Temperatura	Tempo
1	95°C	2 minuti
vario	95°C	30 secondi
	61°C	30 secondi
	72°C	1 minuto
1	72°C	5 minuti
	4°C	∞

Sia per la cv Superior che per la cv Aleatico sono state fatte 3 repliche biologiche e 3 repliche tecniche per il controllo (trasformato con pK7D vuoto) e per i due costrutti pK7D/PDS45 e pK7D/PDS67. Quindi per ogni cv sono stati analizzati il controllo e due trattati.

Numero cicli effettuati sul cDNA estratto da foglie agroinfiltrate per le RT-PCR semiquantitative:

primers:	PDS-RT-1+ PDS-RT-2	34 cicli
	PDS-RT-3+ PDS-RT-4	31 cicli
	26S-F+26S-R	16 cicli

Per ogni campione (controllo e trattati) sono state fatte 3 reazioni di PCR diverse con le tre coppie di primers sopra elencate e per ogni coppia di primers tre reazioni separate: una con 16, l'altra con 31 e l'altra con 34 cicli di amplificazione. Successivamente, 10 µl di ogni reazione sono stati fatti correre su gel di agarosio all'1%. L'abbondanza relativa dei trascritti è stata rilevata misurando l'intensità delle bande di DNA al Gel Doc con il software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e i valori delle concentrazioni ottenute per i trattati sono stati divisi per i valori ottenuti per i relativi controlli.

Primer usati per la RT-PCR:

PDS-RT-1 5' GTGAACCTTGCCGTCCCTTACAAA 3'

PDS-RT-2 5' GCTAGGAAATTGCCACAGCATAAATACCA 3'

PDS-RT-3 5' TCTGTCAGGGAAGCTTTGTGCACA 3'

PDS-RT-4 5' TGCAAGCGCTAGTTGGGTAATTCC 3'

26S-F 5' CCAAAGAAGGTGATAGCCCTGTA 3'

26S-R 5' CGAACACGCCGCGTTT 3'

La sequenza dei primers 26S è disegnata sul 26S ribosomale RNA (usato come normalizzatore), che corrisponde al TC70629 (banca dati TIGR); i primers PDS-RT sono stati disegnati sulla sequenza della PDS.

Trasformazione con il metodo biolistico

È stato seguito il protocollo di Kikkert et al., 2004. Il vettore utilizzato per gli esperimenti di bombardamento è il pUC19GUS, che contiene appunto la sequenza del GUS (β -glucuronidase).

Preparazione delle foglie e del terreno di coltura

Le piante *in vitro* di Pinot nero e vite Run1 sono state messe al buio per 24h tenendole alla temperatura ottimale di crescita.

Le foglie distaccate dalla pianta sono state successivamente trasferite su piastre di MS ½ con mannitolo e sorbitolo, incubate al buio a 23±1 °C e dopo 3-4h sottoposte a bombardamento.

Terreno MS ½ con mannitolo e sorbitolo

2,2 g/l MS con vitamine (Duchefa)

30 g/l saccarosio

0.125 M sorbitolo

0,125 M mannitolo

3 g/l phytigel (Sigma)

Portare a pH 5,8.

Preparazione al bombardamento

Tutto il materiale necessario al bombardamento: componenti della strumentazione, particelle d'oro (microcarriers), macrocarriers, dischi di rottura, stopping screen, sono stati sterilizzati secondo il protocollo dato da Kikkert et al. 2004 ed il manuale del Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad).

Preparazione del DNA plasmidico

Il DNA plasmidico è stato estratto con il QIAfilter Plasmid Midi Kit della QIAGEN.

Adesione del DNA ai microcarriers

Protocollo per sei spari:

- Vortexare per 2 min i microcarriers ed aliquotarne 50 µl in una Eppendorf da 1,5 ml.
- Vortexare mentre si aggiungono i seguenti componenti: 12 µl di DNA plasmidico (1 µg/µl), 50 µl di CaCl₂ e 20 µl di spermidina 0,1 M.
- Incubare in continuo vortex per 10 min.
- Centrifugare a 13000 giri per 5 sec ed eliminare il surnatante.
- Aggiungere 140 µl di isopropanolo, agitare leggermente, centrifugare come prima e rimuovere il surnatante.
- Risospendere i microcarrier in 48 µl di isopropanolo mescolando ripetutamente con micropipetta.
- Vortexare e distribuire 6 µl in modo omogeneo e in circolo sul macrocarrier e lasciare asciugare sotto cappa.

Bombardamento

Lo strumento utilizzato è il Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad) posto sotto cappa sterile (Fig.11). Per eseguire gli spari è stato seguito il protocollo riportato sul manuale dello strumento.

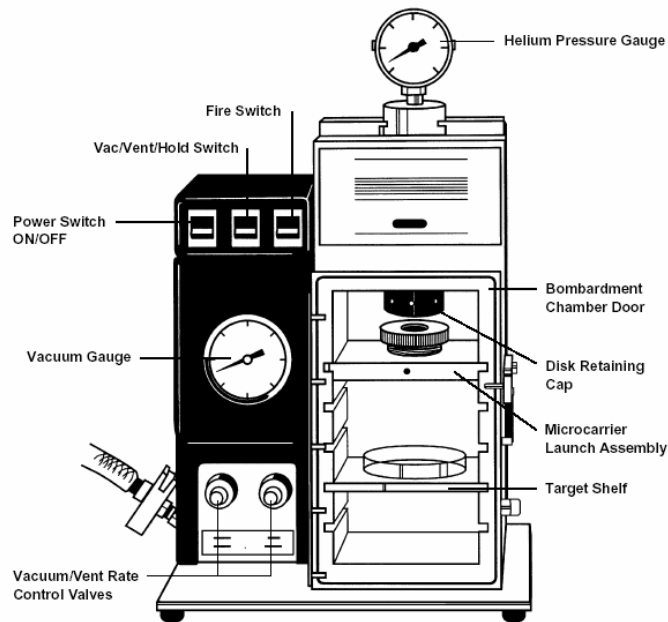


Fig.11 Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (Biorad).

Gli spari sono stati eseguiti sulla pagina inferiore delle foglie poste in piastra cambiando diversi parametri:

- pressione dell'elio: da 900 a 450 psi;
- distanza tra disco di rottura e macrocarrier: 1 cm;
- vuoto applicato nella camera di bombardamento: da 26 a 28 mmHg;
- distanza tra macrocarrier e piastra bersaglio: da 6 a 12 cm.

Dopo lo sparo incubare le foglie al buio a 23 ± 1 °C. Dopo 16h porre le foglie in piastre con MS1/2 + 30 g/l saccarosio e incubare al buio per 48h.

Colorazione GUS e decolorazione foglie

48h dopo il bombardamento si è fatta la colorazione GUS. Le foglie sono state poste in Falcon da 50 ml e immerse in una soluzione GUS e poi poste senza tappo nella pompa a vuoto Concentrator 5301 (Eppendorf). E' stato applicato il vuoto due volte

consecutive per qualche secondo. Successivamente, le Falcon sono state chiuse con il tappo e incubate per 24h a 37°C.

Poi le foglie sono state poste in etanolo al 70% per circa 2-3 giorni fino a quando tutta la clorofilla è stata eliminata.

Soluzione per la colorazione GUS

100 mM	Na ₂ PO ₄ pH7
10 mM	EDTA pH8
0,5 mM	K ₃ [Fe(CN) ₆] pH7
0,5 mM	K ₄ [Fe(CN) ₆] pH7
Triton X 100	0,1%
X-Gluc	1 mM
H ₂ O	fino a 20 ml

X-Gluc sta per: 5-bromo 4-cloro 3-indol β-D-gluconide

Osservazioni al microscopio

Le foglie decolorate sono state osservate al microscopio ottico OLYMPUS BX51 e le immagini analizzate e fotografate con il software Viewfinder Lite versione 1.0.



RISULTATI E DISCUSSIONE

MICROPROPAGAZIONE

La micropropagazione è una tecnica che permette di ottenere piantine identiche alla “pianta madre” (cloni), completamente sane e quindi prive di virus e patogeni, grazie alle condizioni di sterilità in cui sono mantenute. Permette di avere sempre a disposizione materiale vegetale in qualsiasi periodo dell’anno indipendentemente dalle condizioni climatiche, in quanto le piante vengono tenute in celle di crescita con luce artificiale e con temperatura e umidità controllate. Tutte le cultivar di vite utilizzate nel presente lavoro sono state micropropagate: Pinot nero 115x5BB cl 114, Moscato giallo, Aleatico, Superior e vite Run1. Il Pinot Nero rappresenta uno dei genotipi di vite più utilizzati per gli studi di genetica; infatti, ad esempio, il genoma di vite utilizzato per il sequenziamento deriva da Pinot Nero (O. Jaillon, 2007).

Il terreno scelto per la micropropagazione è MS1/2 in quanto rispetto al C2D, terreno messo a punto per la propagazione della vite (Chèe and Pool, 1987), ha dato risultati più soddisfacenti.

In questo modo si è riusciti a produrre piantine nell’arco dell’intero anno, rendendole così sempre disponibili per le prove di agroinfiltrazione e di bombardamento (Fig.12).



Fig.12 Micropropagazione della vite

STRATEGIA DI SILENCING E SISTEMA GATEWAY®

Con lo scopo di creare dei mutanti di funzione per lo studio di geni in vite, si sta cercando mettere a punto un sistema di gene silencing transiente mediato da dsRNA. Il gene silencing permette di accorciare i tempi di analisi funzionale per le piante con lunghi tempi di generazione come la vite causando la perdita o la riduzione della funzione di un gene in modo dominante. La trasformazione transiente, analogamente permette di evitare i lunghi tempi di rigenerazione previsti per la trasformazione stabile. La strategia di silencing che si basa sulla produzione di dsRNA è stata scelta come metodologia poiché ha dato maggiori risultati a livello di intensità e di efficienza e sembra essere favorita proprio dalla presenza di un introne che facilita la formazione del loop (Smith et al., 2000). Per ottenere il silenziamento di un gene è necessario inserire un transgene che contiene la sequenza di interesse che ha una lunghezza che va dalle 300 alle 800 bp. Nel presente lavoro le sequenze di interesse sono state amplificate in modo tale da avere una lunghezza della sequenza amplificata che va da 500 a 700 bp.

Per mettere a punto il sistema di silenziamento in vite, si è utilizzato come marcatore il gene che codifica per la Phytoene desaturase, un enzima coinvolto nella biosintesi dei carotenoidi a livello del cloroplasto. Il silenziamento di questo gene determina “foto-ossidazione” della clorofilla, portando alla comparsa di macchie bianche o clorotiche sulle foglie indicate con il nome di “bleaching” (Wielopolska, 2005).

La sequenza della PDS è stata ricercata nella banca dati di TIGR Grape Gene Index (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=grape>) e ha numero di accessione CN007512 (Fig.13).

>PDSViteCN007512

```
ttttttttttttttgttgaaaaagtaaaggatgcttttataacatgaataaatcaaatacagtttaaatgctttct
tttatagagaagttactttcaaagagctaggaaattgccacagcataaataccaatttttactggatgaatggta
ataacttgtaaaatgccattgatctgcaagcgctagttgggtaattcccaggtactggtgcaaaaacttctcca
attcaagtggtttaactgagaatgctgacctcggccaacttttggttctcctgagcaacaagcaattcatagtc
tttacaatagcctgtgcacaaaagcttccctgacagaaacagcaccttccattgaagctaagtatTTTTGTTTGTG
tagtccccagctaaataaaaagccctctataggagatctttgtaagggacggcaaggttcacaatttgggacagtt
ttgtaaacagatcttgggtgttttaacaacatggtatttcaaaactttcgctttgctctgatcttctgaaatttca
tcaggaaagagtttggcaagttccttcattgtagcttcaatgatttctgagtcactgcggtgagaccattcttca
gcaggtgcaaaaccactccagcatagattgtttggg
```

Fig.13 Sequenza EST della PDS in FASTA format.

Per confermare ulteriormente la correttezza della sequenza della PDS, essa è stata confrontata con l'algoritmo tBLASTX con la banca dati di tabacco in TIGR ed è stata trovata la proteina corrispondente in *Nicotiana benthamiana* (Fig.14).

```
>gb|ABE99707.1| phytoene desaturase [Nicotiana benthamiana]
Length=586
Score = 223 bits (568), Expect = 6e-57
Identities = 107/124 (86%), Positives = 118/124 (95%), Gaps = 0/124 (0%)
Frame = -2
Query 612 FAPAEWVSRSDSEIIIEATMKELAKLFPDEISEDQSKAKVLKYHVVKTPRSVYKTVPNCE 433
          FAPAEW++RSDSEII+ATMKELAKLFPDEIS DQSKAK+LKYHVVKTPRSVYKTVP CE
Sbjct 460 FAPAEWINRSDSEIIDATMKELAKLFPDEISADQSKAKILKYHVVKTPRSVYKTVPGCE 519
Query 432 PCRPLQRSPIEGFYLAGDYTKQKYLASMEGAVLSGKLCQAIVKDYELLVAQGEQKLAEV 253
          PCRPLQRSPIEGFYLAGDYTKQKYLASMEGAVLSGKLCQAIV+DYELL+ ++ LAE
Sbjct 520 PCRPLQRSPIEGFYLAGDYTKQKYLASMEGAVLSGKLCQAIVQDYELLGRSQKMLAEA 579
Query 252 SILS 241
          S++S
```

Fig.14 Allineamento delle sequenze aminoacidiche di PDS di vite e tabacco eseguita mediante ricerca tBLASTX.

Sistema Gateway®

La tecnologia Gateway® è un metodo di clonaggio che consente di trasferire in modo rapido ed efficiente frammenti di DNA tra diversi vettori di clonaggio, basandosi su un sistema di ricombinazione sito-specifica. Particolari sequenze, derivanti dal batteriofago lambda, sono presenti sul pENTR (*attL1* e *attL2*) e sono in grado di ricombinarsi con le altre sequenze specifiche presenti sul vettore di destinazione (*attR1* e *attR2*) (Fig.15).

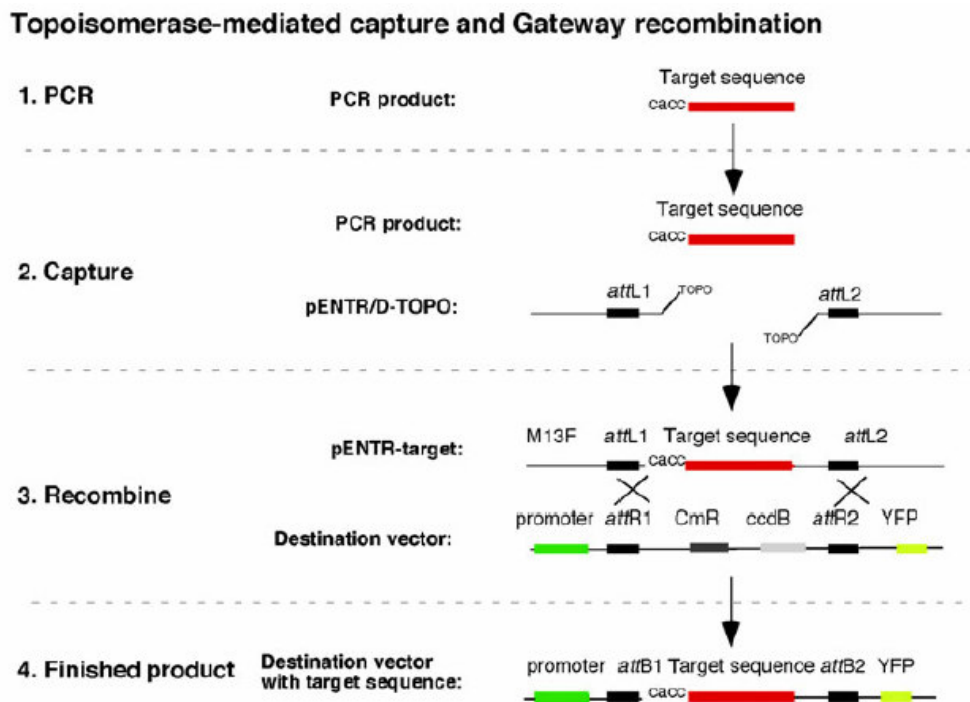


Fig.15 Rappresentazione schematica della preparazione di costrutti genici mediante il sistema Gateway®. (1) Formazione del prodotto di PCR con coda di CACC al 5', che consente un giusto inserimento all'interno del vettore. (2) Integrazione del prodotto di PCR all'interno del vettore pENTR (Invitrogen), tra le regioni *attL1* e *attL2*, attraverso una reazione di ligation catalizzata dall'enzima Topoisomerasi. (3) Reazione di ricombinazione, tra il vettore pENTR e il vettore di destinazione, catalizzata dall'enzima LR ricombinase (Invitrogen). (4) Vettore di destinazione con sequenza di interesse (da Earley et al., 2006).

Nel presente lavoro è stata utilizzata la suddetta tecnologia poiché permette di accelerare i tempi di clonaggio rispetto ai metodi tradizionali di ligation, facilitando il trasferimento dei frammenti di interesse tra i vettori stessi, quindi permettendo di

ottenere in modo rapido vari costrutti. La Fig.15 sintetizza i vari processi per ottenere il costrutto finale.

L'amplificazione del gene PDS di vite è stata effettuata usando Platinum[®] Pfx DNA Polymerase (Invitrogen), che consente di ottenere un amplificato blunt ends, e ha un basso margine di errore. Le coppie di primers utilizzate sono: PDS-4+PDS-5 e PDS-6+PDS-7 (Tab.2) in due reazioni separate. Queste due coppie di primers permettono di amplificare le sequenze nello stesso senso, ma di inserirle in pENTR in senso opposto l'uno rispetto all'altro perché la sequenza "CACC" viene aggiunta al 5' nel caso della coppia PDS-4+PDS-5, e al 3' nel caso della coppia PDS-6+PDS-7. La coda "CACC" consente di inserire nel pENTR la sequenza desiderata in maniera direzionale. In questo modo mediante ricombinazione si ottengono due pENTR/PDS: pENTR-PDS45 e pENTR-PDS67. Per selezionare i plasmidi pENTR-PDS in cui il frammento si è inserito correttamente sono state effettuate due digestioni separate con NotI e HindIII, dei quali NotI riconosce un sito di taglio del plasmidio, mentre HindIII riconosce un sito nel gene PDS. I due differenti pENTR/PDS (pENTR-PDS45 e pENTR-PDS67) sono stati prodotti per poter inserire la PDS nel vettore di destinazione in due orientazioni diverse. Seguendo lo stesso protocollo sono stati prodotti altri vettori pENTR (pENTR/RAR1, pENTR/EDS1, pENTR/NDR1, pENTR/NPR1, pENTR/SGT1, pENTR/PEN1, pENTR/Ubiq e pENTR/mlo) nei quali sono state inserite le sequenze dei geni regolatori delle risposte di difesa ai patogeni in pianta. I geni in questione ed i primers utilizzati per la loro amplificazione sono elencati nella Tab.2.

Vettori per l'agroinfiltrazione: pK7GWIWG2(II) e pK7GWIWG2D(II)

Il pENTR-PDS45 è stato ricombinato con pK7GWIWG2(II) (www.psb.ugent.be), vettore binario basato sul sistema Gateway[®] che è in grado di replicarsi in *Agrobacterium tumefaciens*. Con un unico processo di ricombinazione il gene della phytoene desaturase è stato clonato nel suddetto vettore in orientamento senso e antisenso ed è stato ottenuto il plasmidio pK7/PDS45. La verifica, della presenza del frammento e del corretto inserimento dell'introne, è stata effettuata mediante una doppia digestione del costrutto pK7/PDS45 con gli enzimi SacI e XbaI. Durante il processo di ricombinazione tra il pENTR ed il vettore di destinazione può succedere che l'introne venga invertito rispetto alla sua posizione normale. Questo non

dovrebbe influire sulla capacità del costrutto di produrre un dsRNA funzionante, ma comunque è preferibile utilizzare un vettore con l'introne nella corretta orientazione. Il sito di restrizione XbaI presente sull'introne permette di verificare il senso in cui esso si è inserito. Infatti, se l'introne è nel senso corretto, a seguito della digestione, si avranno una banda alta rappresentata dal plasmide, una banda di medie dimensioni (circa 3 Kb) e una banda più piccola di circa 1,5 Kb. Se, invece, l'introne è invertito insieme alla banda del plasmide si avranno due bande di dimensione molto simili (Fig.8 Materiali e Metodi e 16).

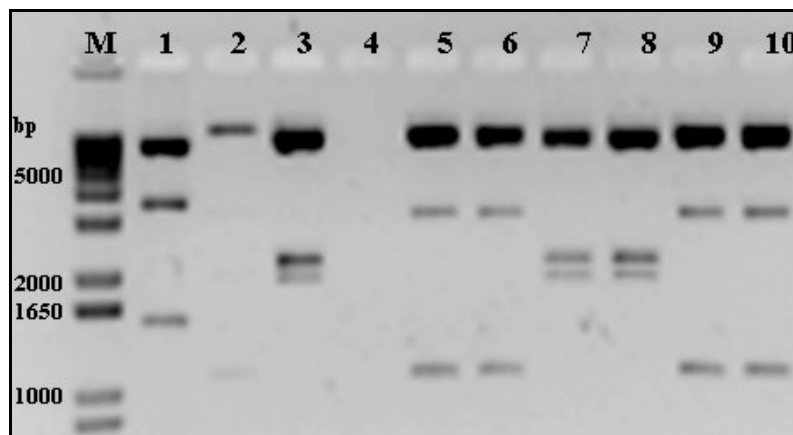


Fig.16 Corsa elettroforetica del vettore pK7/PDS45 dopo doppia digestione. Nella colonna n°1 si osserva il vettore vuoto di controllo; nelle colonne n°3,7,8 un vettore con l'introne inserito in modo non corretto; nelle colonne n°5, 6, 9, 10 un vettore con il frammento correttamente inserito.

Successivamente, i plasmidi positivi alla digestione sono stati sequenziati per confermare la presenza delle sequenze nella cassetta d'espressione.

I costrutti positivi sono stati usati per trasformare i ceppi di Agrobacterio C58C1 ed AGL1. La strategia di utilizzare due diversi ceppi di Agrobacterio ha lo scopo di identificare la combinazione migliore Agrobacterio-cv di vite da trasformare, perché è necessario avere per ogni cv di vite un ceppo che sia in grado di infettare in modo efficiente e che, nello stesso tempo, non sia troppo virulento nei confronti della pianta, per non causare la necrosi dei tessuti infettati.

Dopo aver trasformato *Agrobacterium* le colonie positive sono state identificate mediante colony PCR usando primers specifici per la Phytoene desaturase (PDS-4+PDS-5).

Il vettore pK7GWIWG2D(II) è stato ricombinato con pENTR-PDS45 e pENTR-PDS67 in due reazioni separate. E' stato usato lo stesso protocollo descritto sopra e sono stati ottenuti due vettori di destinazione che portano la PDS orientata in modo diverso: pK7D/PDS45 e pK7D/PDS67. Con questi due vettori si è andato a verificare se il senso della sequenza influisce sull'efficienza e l'intensità del silencing. Dopo la reazione di ricombinazione è stata fatta una colony PCR per identificare le colonie positive andando ad amplificare sia la sequenza inserita in un senso che quella in senso opposto, in due reazioni separate per ogni colonia (Fig.17). Le bande ottenute per ogni colonia positiva sono state sequenziate per verificare che fossero le sequenze di interesse. I campioni positivi di pK7D/PDS45 e 67 sono stati digeriti con Xbal, per verificare la corretta orientazione dell'introne a seguito della ricombinazione (Fig.18).

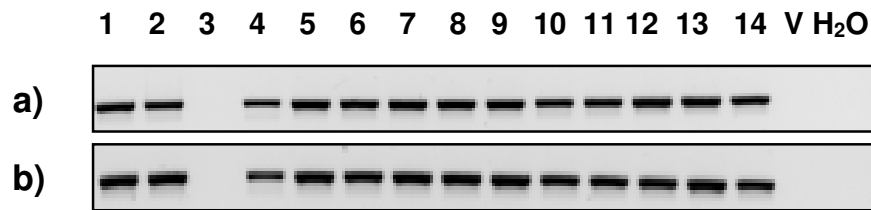


Fig.17 Risultati della colony PCR su pK7D/PDS67. I primers usati per pK7D/PDS67 sono: P27-5+PDS6 (a) e T35S-Fw+PDS6 (b). V= vettore vuoto di controllo.



Fig.18 Digestione di controllo con Xbal sulle prime 8 colonie di pK7D/PDS67; le colonie positive sono rappresentate dalle numero 4,7,8,9. V= vettore vuoto di controllo.

Dopo aver trasformato *Agrobacterium* con pK7D/PDS45 e pK7D/PDS67 le colonie positive sono state identificate mediante colony PCR usando primers specifici per la phytoene desaturase (PDS-4+PDS-5 e PDS-6+PDS7).

Il protocollo sopra illustrato è stato seguito anche per ottenere i vettori di destinazione pK7GWIWG2D contenenti i geni regolatori della risposta di difesa ai patogeni che si vuole silenziare per studiarne la funzione (Tab.2).

Vettori per il metodo biolistico: pIPKTA30N

I vettori pENTR nei quali sono state inserite le sequenze dei geni regolatori della risposta di difesa ai patogeni in pianta sono stati ottenuti amplificando le sequenze secondo il protocollo riportato in Materiali e Metodi ed utilizzando i primers specifici per ogni gene (Tab.2). Per ognuno di questi geni, al contrario di quello che è stato fatto per la PDS, è stata usata una sola coppia di primers perché in questa fase del lavoro non sarà necessario studiare l'influenza dell'orientamento della sequenza sul silencing. Ogni pENTR così ottenuto (pENTR/RAR1, pENTR/EDS1, pENTR/NDR1, pENTR/NPR1, pENTR/SGT1, pENTR/PEN1, pENTR/Ubiq e pENTR/mlo) è stato ricombinato con il pIPKTA30N, vettore basato sul sistema Gateway[®] che si utilizza per la trasformazione transiente con il metodo del particle bombardment. Una volta veicolato nel genoma della pianta questo costrutto genico viene trascritto in un RNA che forma un loop ed una struttura a dsRNA in grado di sviluppare silencing.

L'ubiquitinazione delle proteine regola molti processi nelle cellule eucariotiche che vanno dalla divisione cellulare alla morte cellulare. Inoltre, l'ubiquitinazione è essenziale per la degradazione ed il turnover delle proteine. Il costrutto pIPKTA/Ubiq contenente sequenze per il gene ubiquitina è stato prodotto al fine di fornire un controllo positivo del silencing. Ci sono dati in letteratura che dimostrano che la regolazione del turnover delle proteine è importante anche per un'efficace difesa contro il micopatogeno *Blumeria graminis* in orzo. E' stato inoltre dimostrato (in orzo) che il silenziamento del gene per l' ubiquitina provoca morte cellulare in presenza di attacco di patogeni (Dong et al., 2006). Co-trasformando delle foglie di orzo con un costrutto esprime il gene GUS ed il costrutto per silenziare l'ubiquitina pIPKTA/Ubiq, è stato visto che il numero delle cellule che esprimevano il GUS era molto più basso rispetto al numero di cellule trasformate riscontrate nel controllo (trasformato con il solo GUS).

Dopo la reazione di ricombinazione è stata fatta una colony PCR per identificare le colonie positive andando ad amplificare sia la sequenza inserita in un senso che quella in orientamento opposto, in due reazioni separate per ogni colonia (Fig.19). Le bande ottenute per ogni colonia positiva sono state sequenziate per verificare che fossero le sequenze di interesse. I campioni positivi di pTA+gene sono stati digeriti con NotI, per un'ulteriore verifica a seguito della ricombinazione (Fig.20).

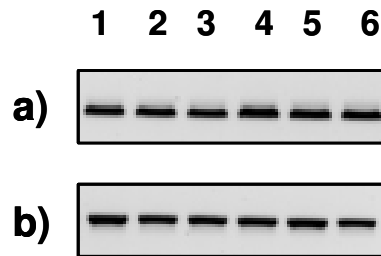


Fig.19 Risultati della colony PCR su pTAUbiq. I primer usati per l'amplificazione sono: P27-5+CF606748-Rev (a) e M13FC+CF606748-Rev (b).

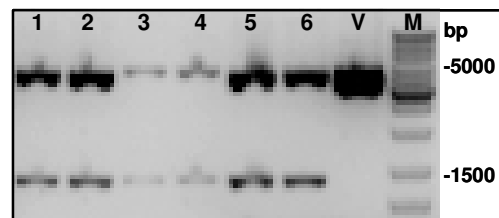


Fig.20 Digestione di verifica con NotI dei vettori pTAUbiq. V= vettore vuoto di controllo.

Questo protocollo è stato seguito per ottenere anche i vettori di destinazione pIPKTA30N contenenti i geni regolatori della risposta di difesa ai patogeni che si vuole silenziare per studiarne la funzione (Tab.2). Tutti i vettori per il particle bombardment così prodotti verranno utilizzati quando il metodo verrà messo a punto sulle cellule dell'epidermide di vite.

Agroinfiltrazione e silenziamento genico transiente

Uno dei primi lavori sulla trasformazione genetica stabile della vite utilizzando l'Agrobatterio fu fatto nel 1994 da LeGall et al., che trasformarono embrioni somatici di vite dai quali rigenerarono delle piante transgeniche in grado di esprimere la proteina del capsidio (proteina CP) del grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMVF). Nel 2001 Iocco et al. hanno sviluppato un sistema di trasformazione mediato dall'Agrobatterio partendo da embrioni di vite. Hanno così messo a punto un sistema per trasformare e rigenerare piante di vite transgeniche per un certo numero di cv importanti per l'industria vinicola che può essere applicato anche su altre cv. Nel 2008 Zottini et al. hanno sviluppato un protocollo per la trasformazione transiente di foglie di vite per alcune cv di vite. L'approccio della trasformazione transiente può essere usato come alternativa alla complementazione genica, per lo studio dell'espressione e della localizzazione subcellulare e per studi di funzione, evitando di ricorrere alla trasformazione stabile. La trasformazione, quindi, può essere utilizzata come strumento di analisi genetica sfruttando metodi che consentono di ottenere mutanti funzionali mediante il silenziamento di funzioni geniche.

Il primo obiettivo del presente lavoro è stato quello di sviluppare un sistema di silenziamento genico transiente in foglie di vite *in vitro* focalizzato sul gene target della PDS (Phytoene desaturase) mediante l'introduzione di vettori che esprimono RNA a doppio filamento veicolati in pianta tramite trasformazione con *Agrobacterium tumefaciens*.

I primi esperimenti sono stati condotti utilizzando il costrutto pK7/PDS45, con il quale si sono trasformati i due ceppi di *Agrobacterium*: AGL1 e C58C1, che sono stati utilizzati poi per agroinfiltrare le cv Pinot nero e Moscato Giallo. La trasformazione con i due diversi ceppi aveva lo scopo di: individuare il ceppo più virulento nei confronti dei genotipi di vite; evidenziare possibili combinazioni vite-Agrobatterio nelle quali il sistema di gene silencing potrebbe funzionare; capire quale ceppo provoca meno danni alla pianta in seguito all'infezione. Questa parte del lavoro è stata svolta (ed è tuttora in corso) in collaborazione con la prof.ssa Fiorella Lo Schiavo e la dott.ssa Michela Zottini del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova. Prima di procedere alla trasformazione della vite con l'*Agrobacterium*, questo è stato reso virulento nei confronti del tessuto vegetale ponendolo a contatto con acetosiringone per favorire appunto la trasformazione. Gli inoculi sono stati veicolati nella lamina

fogliare di vite *in vitro* attraverso una leggera pressione esercitata da una siringa senza ago da 1 ml, attraverso gli stomi sulla pagina inferiore. Sono state inoculate giovani foglie non completamente espanse (2/3 delle dimensioni finali). E' stata usata una siringa senza ago per danneggiare il meno possibile la superficie fogliare ed evitare quindi di causare necrosi cellulare (che ha come fenotipo delle macchie scure) (Fig.21).



Fig.21 Tecnica di agroinfiltrazione della pagina inferiore di foglie di vite *in vitro* con una siringa senza ago.

Dopo circa 7 giorni dall'infiltrazione, le foglie trasformate sono state osservate allo stereomicroscopio; solo nel caso delle foglie infiltrate con il ceppo C58C1, in corrispondenza al punto di contatto con la siringa, si è manifestata la comparsa di macchie circolari colore verde attenuato (clorotiche) rispetto al colore verde naturale della foglia, e la presenza limitata, sui bordi perimetrali della circonferenza, di sintomi di necrosi (Fig.22). Per verificare l'efficienza della trasformazione delle foglie e per inserire un controllo negativo, è stata fatta una trasformazione di controllo con AGL1+GFP (green fluorescent protein); nel caso di quest'ultimo costrutto non si sono osservati ingiallimenti nelle zone della lamina agro-infiltrate (Fig. 22, fotogramma AGL1-GFP).

Pagina inferiore



Pagina superiore



AGL1-GFP



Fig.22 Moscato giallo trasformato con C58C1. Fotobleaching (zone clorotiche) sulle foglie di vite agroinfiltrate con il vettore di silencing per il gene PDS.

Piante di *Arabidopsis*, tabacco e pomodoro nelle quali il gene che codifica per PDS era stato silenziato da dsRNA prodotto da trasformazione stabile o mediante VIGS presentavano una superficie fogliare bianca (Wielopolska, et al., 2005). Nel presente esperimento la superficie risultava invece clorotica piuttosto che completamente bianca. La differenza di fenotipo è probabilmente dovuta al minor numero di cellule che vengono trasformate da *Agrobacterium* rispetto alla trasformazione stabile e al VIGS. Un minor numero di cellule trasformate comporterebbe infatti la persistenza di una certa percentuale di cellule nelle quali la funzione della PDS non viene soppressa e, di conseguenza, il contenuto di clorofilla in queste cellule non viene alterato. La co-esistenza di cellule nelle quali la clorofilla è sottoposta a photobleaching con cellule con contenuto normale potrebbe spiegare la colorazione clorotica osservata.

Visti questi primi risultati promettenti, sono stati fatti ulteriori esperimenti. A seguito del lavoro svolto da Zottini et al. (2008) è stato verificato che il ceppo AGL1 aveva dato buoni risultati di trasformazione sulle cv Superior ed Aleatico; quindi si è deciso di continuare il lavoro usando questa combinazione di cv di vite-Agrobatterio. Gli esperimenti successivi sono stati quindi condotti trasformando AGL1 con pK7D/PDS45 e pK7D/PDS67 ed agroinfiltrando la pagina inferiore delle foglie in vitro delle cv Superior ed Aleatico. Questi due costrutti contengono tra il RB ed il LB, nella cassetta di espressione, il gene che codifica per la GFP (Fig. 9 Materiali e Metodi). La presenza di questo marcatore fluorescente permette di verificare l'efficienza della trasformazione con Agrobatterio perché mette in evidenza i siti e le cellule in cui è avvenuta la trasformazione e, quindi, si è avuto il trasferimento del transgene. Dopo 6 e 12 giorni dall'agroinfiltrazione sono state fatte prima le osservazioni allo stereomicroscopio e poi al microscopio laser confocale (Fig.23 e 24).

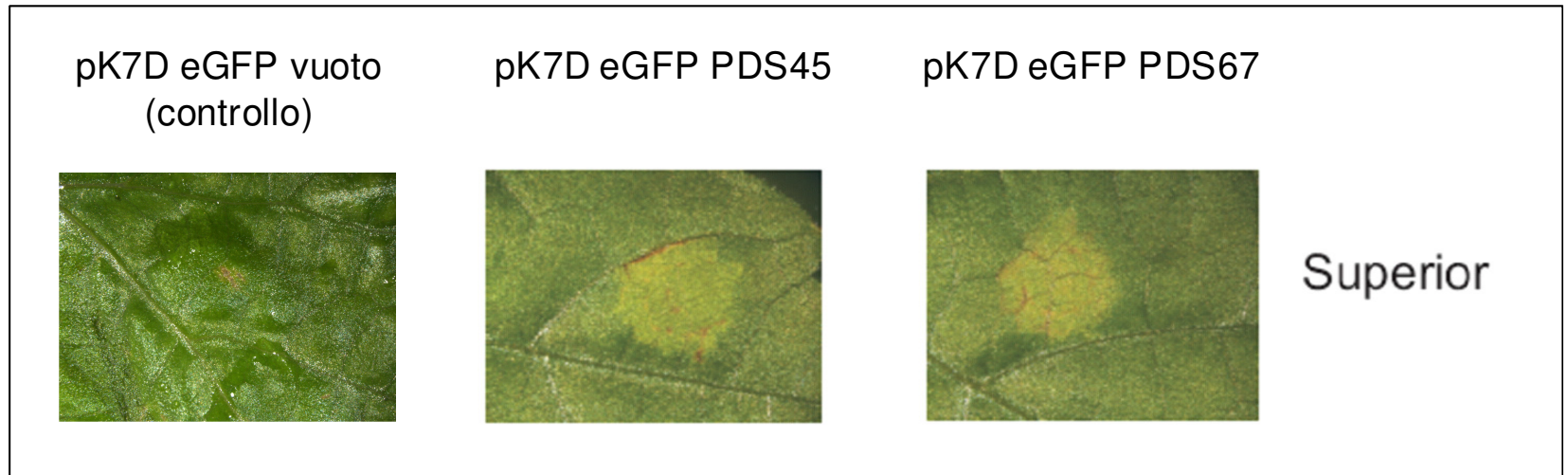


Fig.23 Osservazione allo stereomicroscopio dei sintomi del photobleaching nei siti agroinfiltrati sulla cv Superior a 6 giorni dall'agroinfiltrazione.

Nella Fig.23 la prima foto mostra una trasformazione di controllo delle foglie *in vitro* della cv Superior con il vettore pK7D vuoto. Come si può notare a livello del sito di infezione vi è la comparsa di una macchia necrotica dovuta all'interazione dell'Agrobatterio con i tessuti infettati. La seconda e la terza foto mostrano il fenotipo delle foglie trasformate con pK7D/PDS45 e pK7D/PDS67. A livello dei siti di agroinfiltrazione sono presenti delle macchie clorotiche sintomo della fotossidazione della clorofilla. Questi risultati sono stati successivamente confermati dall'osservazione delle stesse foglie con microscopio confocale laser (Fig.24). La prima serie di foto in alto mostra un sito di agroinfiltrazione di controllo condotta con il vettore pK7D vuoto. Nella prima foto sono messi in evidenza contemporaneamente sia la clorofilla (che appare di colore rosso) che la GFP che, come noto, da fluorescenza verde. La seconda e la terza foto mostrano la stessa sezione fogliare (della prima foto) sollecitata con una fluorescenza che evidenzia solo la GFP (seconda foto) e solo la clorofilla (terza foto).

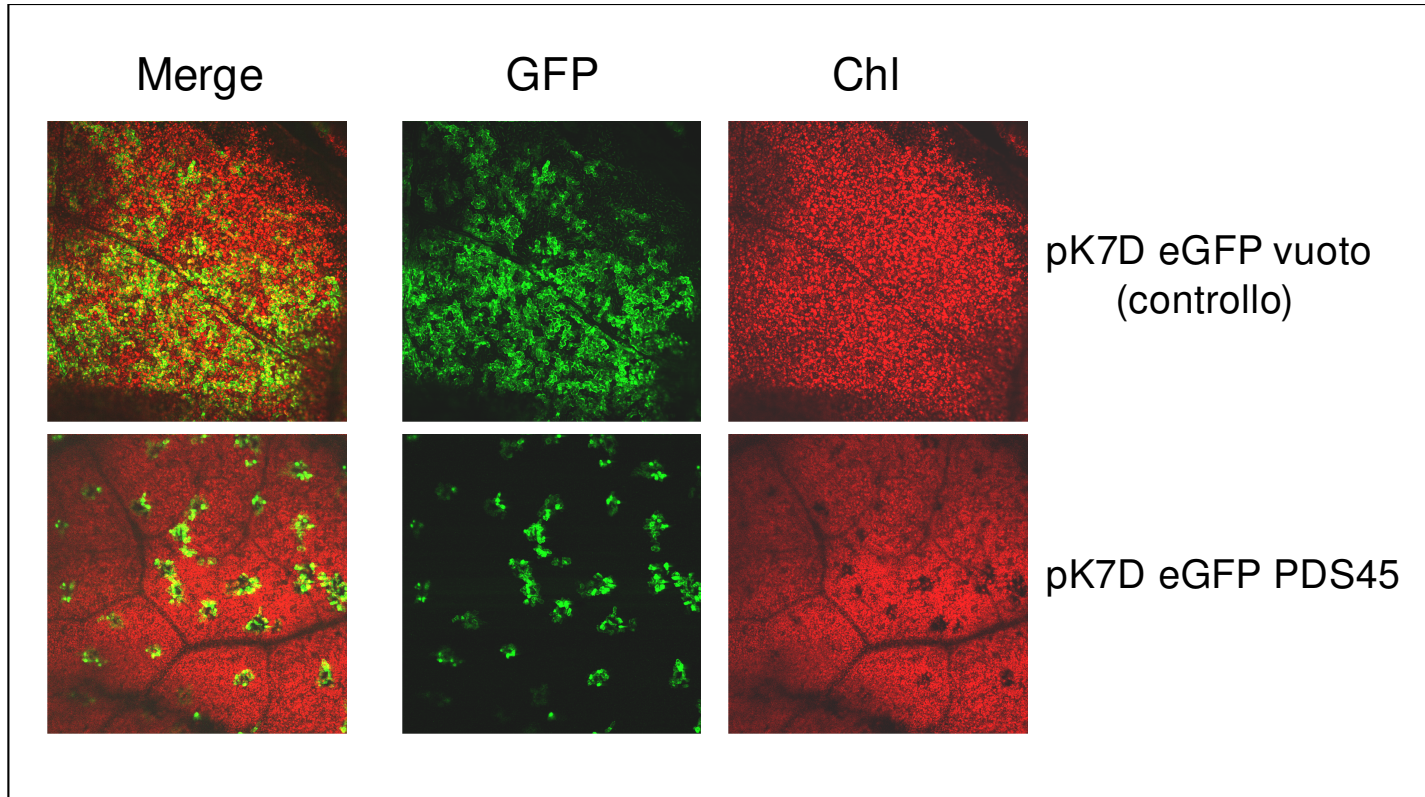


Fig.24 Foglie della cv Superior agroinfiltrate osservate al microscopio confocale laser sei giorni dopo l'infezione. In questo caso sono mostrate solo le foto della trasformazione con pK7D eGFP PDS45.

Nella serie di foto in basso è rappresentato un ingrandimento del sito di infezione fatta con pK7D/PDS45. Nella prima immagine la clorofilla e la GFP sono messe in evidenza insieme. Nella seconda è stata evidenziata solo la GFP, nella terza solo la clorofilla. Se queste ultime due immagini si confrontano si può notare che i punti in cui si trova la fluorescenza dovuta alla GFP sono co-localizzati con i punti in cui la clorofilla è assente, come evidenziato dalla presenza di macchie nere (assenza di fluorescenza rossa dovuta alla mancanza di clorofilla) (Fig.24). Gli stessi risultati sono stati ottenuti agroinfiltrando con pK7D/PDS45 e 67 sia la cv Superior che la cv Aleatico.

Il contenuto di trascritti del gene PDS nei siti di agroinfiltrazione è stato testato attraverso RT-PCR semiquantitativa. Sono stati accuratamente isolati dalle foglie le porzioni di tessuto che a livello dei siti di infezione risultavano trasformati. Da questi tessuti è stato estratto RNA ed è stato condotto un esperimento di RT-PCR semiquantitativa per analizzare la quantità trascritti della PDS. La Fig.25 mostra i risultati ottenuti. Sia per la cv Superior che per la cv Aleatico sono state fatte 3 repliche biologiche e 3 repliche tecniche per il controllo (trasformato con pK7D vuoto) e per i due costrutti pK7D/PDS45 e pK7D/PDS67. Per ogni campione (controllo e trattati) sono state fatte 3 reazioni di PCR diverse con le tre coppie di primers: PDS-RT-1+ PDS-RT-2, PDS-RT-3+ PDS-RT-4 e 26S-F+26S-R e per ogni coppia di primers tre reazioni separate: una con 16, l'altra con 31 e l'altra con 34 cicli di amplificazione. Successivamente, 10 µl di ogni reazione sono stati fatti correre su gel di agarosio all'1%. L'abbondanza relativa dei trascritti è stata rilevata misurando l'intensità delle bande di DNA al Gel Doc con il software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e i valori delle concentrazioni ottenute per i trattati sono stati divisi per i valori ottenuti per i relativi controlli.

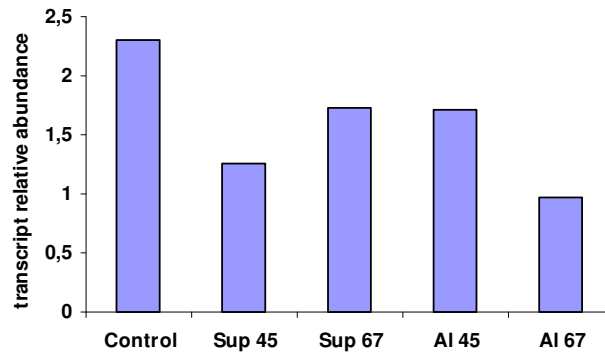


Fig.25 RT-PCR semiquantitativa condotte su tessuti di foglie delle cv Superior ed Aleatico agroinfiltrate con pK7D eGFP (controllo), pK7D eGFP PDS45 e pK7D eGFP PDS67. La quantità dei trascritti del gene PDS nei diversi campioni è stata normalizzata rispetto agli amplificati ottenuti utilizzando primers per la subunità 26S di vite.

Gli esperimenti di RT-PCR semiquantitativa hanno consentito di misurare l'abbondanza dei trascritti per le PDS nei tessuti trasformati con il costrutto di controllo e in quelli di due cv di vite (Superior e Aleatico) trasformate con i due costrutti realizzati per generare silenziamento della PDS. In questo esperimento si è osservato che nelle foglie trasformate con i costrutti di silenziamento i livelli dei trascritti della PDS erano più bassi rispetto al controllo in entrambe le cv e per entrambi i costrutti testati. Questa analisi RT-PCR, unitamente alle osservazioni al microscopio, ha confermato l'abbassamento dei livelli dei trascritti del gene della PDS e quindi l'efficienza del sistema di silenziamento su foglie di vite *in vitro* trasformate in modo transiente con *Agrobacterium tumefaciens*.

Trasformazione con il metodo biolistico

La trasformazione della vite (una specie difficile da trasformare) è stata ottenuta sia mediante agroinfiltrazione di embrioni somatici (Yamamoto et al. 2000; Iocco et al. 2001) che mediante l'utilizzazione del metodo biolistico (Kikkert et al., 2004) usando colture embriogeniche in sospensione. Il primo sistema di trasformazione transiente di foglie di vite *in vitro* è stato messo a punto da Zottini et al nel 2008, mentre per quanto riguarda la trasformazione transiente di foglie di vite con il particle bombardment non ci sono ancora dati pubblicati in letteratura. Con il sistema biolistico si può ovviare a diversi problemi legati alla trasformazione con *Agrobacterium*, quali la HR che si può talora presentare in alcune combinazioni tra genotipi di vite-ceppo di *A. tumefaciens*. Vidal et al. (2003 e 2006) recentemente

hanno dimostrato che è possibile trasformare cellule di vite di una coltura cellulare in sospensione mediante il metodo biolistico; risultati positivi sono stati ottenuti trasformando anche soltanto con una cassetta genica minimale (MCs), costituita da promotore + frammento di DNA + terminatore senza il vettore, in modo da ridurre le interferenze del DNA del vettore nella pianta e riuscendo in modo efficace a rigenerare i tessuti trasformati per ottenere delle linee di piante transgeniche stabili.

Il metodo biolistico viene utilizzato in diverse specie per la trasformazione transiente di foglie di piante per fare studi di funzione attraverso il gene silencing (Douchkov et al., 2005). Tenendo presente questo tipo di strategia, quindi, il secondo obiettivo del presente lavoro è quello di sviluppare un sistema di silenziamento genico transiente in foglie di vite cresciute *in vitro* utilizzando vettori che generano RNA a doppio filamento veicolati mediante il metodo del particle bombardment.

Il protocollo a cui si è fatto riferimento per effettuare gli esperimenti è quello di Kikkert et al. (2004) e lo strumento utilizzato è il Biolistic[®] PDS-1000/He Particle Delivery System (Biorad) (Fig.11 Materiali e Metodi).

Tutti i parametri per il bombardamento e le fasi pre e post-bombardamento presenti in letteratura e applicati su vite fanno riferimento alla trasformazione di sospensioni di cellule embrioniche (Kikkert et al., 2004; Vidal et al., 2006) o calli embrionetici. Nel presente lavoro si è partiti da questi dati per effettuare i primi esperimenti, modificandoli poi di volta in volta singolarmente per cercare il protocollo migliore per ottenere la trasformazione di foglie di vite *in vitro*. I materiali utilizzati erano rappresentati da foglie delle cv Pinot nero e vite Run1 cresciute *in vitro*; di conseguenza le cellule fogliari di queste piantine presentano una struttura diversa sia dalle cellule embrionali in sospensione sia dalle foglie di vite *in vivo*.

A seguito di una serie di esperimenti preliminari effettuati partendo da dati già pubblicati (Kikkert et al., 2004), si è stabilito che la quantità ottimale di DNA totale da utilizzare per ogni singolo sparo è di 12 µl ad una concentrazione di 1 µg/µl, in quanto è stato ottenuto un numero maggiore di cellule trasformate per ogni singola foglia. Gli esperimenti pilota di trasformazione sono stati condotti utilizzando il costrutto pUC19GUS, perché si è ritenuto più opportuno utilizzare questo gene reporter rispetto alla GFP. Questa scelta è motivata dal fatto che i tessuti fogliari della vite presentano elevati livelli di autofluorescenza quando osservati a luce incidente a bassa lunghezza d'onda con microscopio a fluorescenza; questo comportamento, probabilmente dovuto alla presenza di composti fenolici a livello delle pareti cellulari,

non permetteva di discriminare in modo semplice e corretto la fluorescenza della GFP dall'autofluorescenza di fondo. I microcarrier erano in oro con dimensioni di 0,6 μm . Le foglie *in vitro* utilizzate erano giovani e con un'espansione fogliare di circa 2-3 cm di diametro. Per gli esperimenti di trasformazione è stata utilizzata la pagina inferiore delle giovani foglioline in quanto hanno fornito risultati migliori, cioè un maggior numero di cellule trasformate, ed erano più semplici da osservare al microscopio in quanto le cellule dell'epidermide erano più evidenti.

Sono state provate diverse pressioni di elio per lo sparo, in un range che andava da un minimo di 450 psi ad un massimo di 1350 psi. I risultati migliori si sono avuti con le pressioni di 450 e 650 psi perché è stato ottenuto un maggior numero di cellule trasformate. Il vuoto applicato era pari a 28 mmHg e la distanza tra il disco di rottura ed il macrocarrier era pari ad 1 cm. Nella Fig.26 è rappresentato il processo del metodo biolistico, i vari componenti e parametri che possono essere modificati.

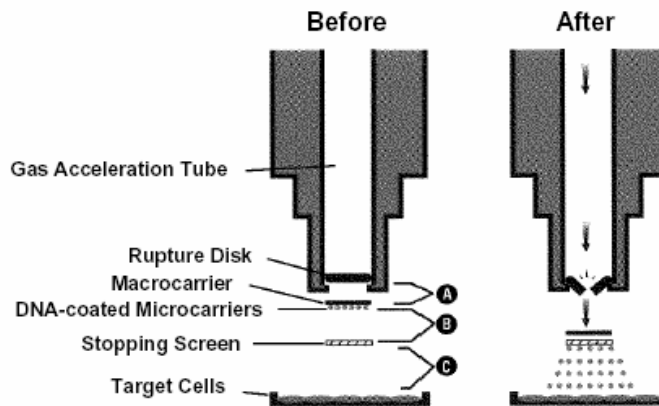


Fig.26 Processo del metodo biolistico.

La distanza dallo stopping screen ed il bersaglio può essere variata da 6 ad un massimo di 12 cm. Nel presente lavoro è stato visto che per foglie *in vitro* di vite la distanza migliore è pari a 12 cm perché è stato ottenuto un maggior numero di cellule trasformate e un numero inferiore di lesioni delle foglie bombardate dovute alla presenza di grumi di microproiettili, che si formano durante la precipitazione del DNA, che vanno a rompere i tessuti a seguito dello sparo .

Tenendo presente la particolare struttura del tessuto fogliare delle piante di vite cresciute *in vitro*, sono stati fatti dei trattamenti pre e post bombardamento per migliorare l'efficienza della trasformazione. In particolare, la parete cellulare delle foglie *in vitro* è meno robusta e presenta uno strato ceroso più sottile rispetto alle

foglie *in vivo*. Inoltre, il loro vacuolo ha grandi dimensioni e, quindi, il turgore cellulare è alto a causa delle condizioni di crescita *in vitro* che presentano umidità molto elevata. Il particle bombardment sottopone i tessuti ad uno stress abbastanza elevato; le cellule delle piante *in vitro* sono più sensibili rispetto a quelle *in vivo* per i motivi sopra elencati. I trattamenti pre-bombardamento includevano: a) il mantenimento al buio per 24 ore delle piante cresciute *in vitro* dalle quali sono state prelevate le foglie; b) il trasferimento delle foglie su piastre contenenti MS1/2, Mannitolo 0,125 M, Sorbitolo 0,125 M e saccarosio, con la pagina superiore sempre rivolta verso il terreno e incubate al buio. L'utilizzo di terreni di coltura addizionati con osmotici (Mannitolo e Sorbitolo) ha dato una percentuale più alta di trasformanti stabili per tutte le sospensioni cellulari coltivate; comunque i loro benefici sono meno noti quando si usano foglie o embrioni interi. Si pensa che la plasmolisi delle cellule riduca il danno prevenendo la fuoriuscita del protoplasma dalle cellule bombardate (Kikkert et al., 2004). I trattamenti post-bombardamento prevedevano, a 16 ore dallo sparo, il trasferimento delle foglie su terreno MS1/2 e saccarosio e la loro incubazione al buio. I trattamenti al buio, in presenza di Mannitolo e Sorbitolo che sono composti che esercitano azione osmotica, dovrebbero favorire la diminuzione delle dimensioni del vacuolo (che occupa gran parte del volume cellulare) e del turgore cellulare. Si incrementerebbero quindi le probabilità che i microproiettili colpiscano il nucleo e non il vacuolo. Inoltre è probabile che l'impatto del microproiettile con cellule troppo turgide provochi un danno troppo esteso al plasmalemma, tale da causare la morte della cellula. Il buio, infine, favorirebbe i meccanismi di riparazione cellulare che avvengono nella cellula dopo la trasformazione.

48 ore dopo il trattamento post-bombardamento le foglie sono state sottoposte alla colorazione GUS, 24 ore dopo alla decolorazione in etanolo al 70% e poi osservate al microscopio.

I risultati ottenuti in seguito alla modificazione dei parametri di bombardamento ed alla applicazione dei trattamenti pre e post bombardamento elencati sopra sono riassunti nelle Fig.27 e 28.

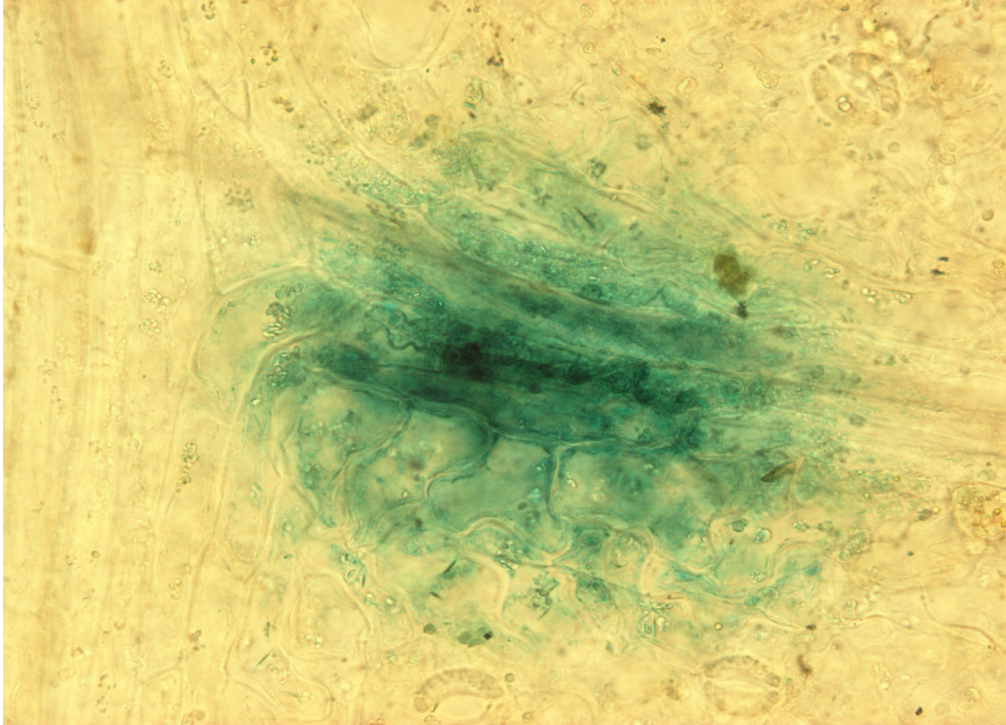


Fig.27 Pinot nero: cellule positive alla colorazione GUS a seguito della trasformazione con 450 psi.

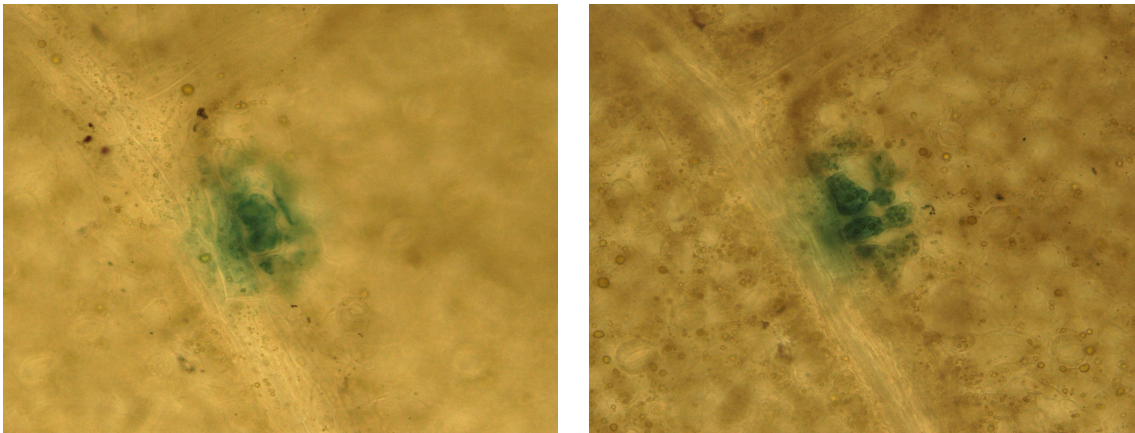


Fig.28 Vite Run1: cellule del mesofillo fogliare positive alla colorazione GUS trasformate utilizzando 650 psi.

La Fig.27 mostra delle cellule di vite Pinot nero trasformate con il costrutto GUS a 450 psi. Risultano trasformate alcune cellule della nervatura fogliare ed alcune immediatamente vicine. Le cellule localizzate nei pressi della nervatura appartengono al mesofillo ma alcune di esse sembrano allo stesso livello delle cellule stomatiche e potrebbero quindi essere cellule epidermiche. Nella Fig. 28 sono mostrate delle cellule di vite Run1 positive alla colorazione GUS. Anche in questo caso le cellule trasformate sono cellule del mesofillo. Quindi anche in questo

esperimento non è stato possibile osservare cellule epidermiche trasformate. Sebbene le motivazioni di questo tipo di risultato sono ancora da chiarire, è possibile che il turgore delle cellule epidermiche delle piantine cresciute *in vitro* risulti ancora troppo elevato cosicché i microproiettili causerebbero gravi danni alla membrana plasmatica causando la morte delle cellule colpite.



CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Le ricerche esposte nel presente lavoro hanno riguardato lo sviluppo di approcci di gene silencing in vite (*Vitis vinifera* L.) per studi di genomica funzionale.

Nel corso del lavoro è stato messo a punto un sistema per la micropropagazione della vite in modo tale da disporre delle piantine durante tutto il corso dell'anno evitando pause di lavoro dovute al fisiologico riposo vegetativo annuale della vite. Utilizzando le banche dati del NSBI, TIGR e IASMA Genomics sono state trovate le sequenze del gene che codifica per la Phytoene desaturase e di geni che in diverse piante (come *Arabidopsis*, Tabacco, orzo) regolano la risposta di difesa mediata da geni di resistenza nei confronti di diversi patogeni fungini e batterici.

Il primo obiettivo del lavoro era quello di sviluppare un sistema di silenziamento genico transiente in foglie vite *in vitro* focalizzato sul gene target della PDS (Phytoene desaturase) e ottenuto mediante l'introduzione di vettori che esprimono RNA a doppio filamento veicolati in pianta tramite trasformazione con *Agrobacterium tumefaciens*. Sono stati prodotti due vettori per il gene silencing che danno origine a dsRNA contenente la sequenza del gene che codifica per la Phytoene desaturase in due orientamenti diversi, con i quali sono stati condotti gli esperimenti di agroinfiltrazione. La trasformazione transiente di foglie di vite *in vitro* con *Agrobacterium* è stata messa a punto sulle cvs Moscato, Aleatico e Superior e i risultati sono stati validati nei due ultimi genotipi con le osservazioni al microscopio confocale laser e con RT-PCR semiquantitative. Quindi, si può concludere che il metodo sviluppato risulta essere applicabile in quanto si è riusciti ad abbassare i livelli di accumulo dei trascritti della PDS attraverso il silenziamento genico transiente in tutti e tre i genotipi di vite testati. Questo fa supporre che la stessa metodica potrebbe essere esportata ad una vasta gamma di genotipi di vite con esigenze diversificate di studi funzionali. Non si è inoltre osservato alcun effetto sull'efficienza del silencing dipendente dall'orientamento con cui le sequenze da silenziare venivano inserite nei costrutti. Un test simile è stato svolto nel 2005 da Douchkov et al. che hanno messo a punto un efficiente sistema di gene silencing basato sul vettore pIPKTA30N. Essi hanno testato se l'orientamento delle ripetizioni invertite (senso ad antisenso o antisenso a senso) nel costrutto finale influissero sull'efficienza del silencing preparando due costrutti finali distinti (che differiscono tra loro solo per l'orientamento delle *attR1* e *attR2* rispetto all'introne) diretti contro il gene *HvGLP4* (uno dei maggiori geni correlati alla difesa contro i patogeni in orzo) e hanno visto che essi erano ugualmente efficienti nell'indurre il silenziamento di

questo gene. Sono stati inoltre preparati vettori per il silencing contenenti nella cassetta di espressione i principali geni coinvolti nella regolazione delle risposte di difesa ai patogeni, dei quali si vuole studiare la funzione (RAR1, EDS1, NDR1, NPR1, SGT1, PEN1, Ubiquitina ed mlo) con i quali sarà possibile condurre esperimenti successivi mediante agroinfiltrazione.

Il secondo obiettivo del lavoro era quello di sviluppare un sistema di silenziamento genico transiente in foglie di vite *in vitro* utilizzando vettori che generano RNA a doppio filamento veicolati mediante il metodo del particle bombardment. Per tale scopo sono stati messi a punto i parametri per il bombardamento ed i trattamenti con gli mezzi osmotici a cui sottoporre le foglie di vite cresciute *in vitro* prima e dopo il bombardamento al fine di migliorare l'efficienza della trasformazione. E' stata ottenuta la trasformazione con il metodo del particle bombardment del mesofillo fogliare di foglie *in vitro* delle cv Pinot nero e vite Run1 utilizzando il costrutto pUC19GUS che come marcatore contiene il gene GUS (β -glucuronidase); questo risultato è stato ottenuto dopo aver testato una serie considerevole di diversi parametri pre e post bombardamento.

Sono stati preparati vettori per il silencing contenenti nella cassetta di espressione i principali geni coinvolti nella regolazione delle risposte di difesa ai patogeni, dei quali si vuole studiare la funzione (RAR1, EDS1, NDR1, NPR1, SGT1, PEN1, Ubiquitina ed mlo) per la trasformazione con metodo biolistico.

Le fasi successive del lavoro prevedono quindi di effettuare dei test di trasformazione transiente di vite sul genotipo di vite Run1 utilizzando il metodo dell' *Agrobacterium tumefaciens* sviluppato. Questo genotipo di vite è infatti resistente all'oidio e rappresenta quindi un materiale ideale sul quale effettuare lo studio di funzione dei geni regolatori della risposta di difesa per verificare il loro ruolo nella interazione pianta-patogeno in studio. Inoltre, si vogliono effettuare altri test di trasformazione di vite con il metodo biolistico per ottenere la trasformazione delle cellule dell'epidermide, perché è a livello di queste cellule che la vite viene attaccata dall'oidio. Per migliorare la metodica i test futuri saranno effettuati bombardando foglie di vite *in vitro* cresciute in MS $\frac{1}{2}$ addizionato con PEG (polyethylene glycol) 8000 a diverse concentrazioni, un polimero inerte usato come osmotico per indurre stress idrico in talee di vite micropropagate. E' stato visto infatti che le cellule epidermiche delle foglie delle piante trattate presentavano una deposizione di cere epicuticulari più alta rispetto alle cellule delle piante cresciute normalmente (Dami e

Hughes, 1997). Questo fattore, insieme allo stress idrico, potrebbe migliorare l'efficienza della trasformazione in quanto le cellule potrebbero risultare più resistenti allo sparo perché il turgore cellulare è più basso.

Quando i due sistemi verranno messi a punto e saranno applicabili sulla vite Run1 si potrà procedere con l'analisi della funzione a livello fenotipico dei geni coinvolti nella regolazione delle risposte di difesa ai patogeni per verificare il loro possibile coinvolgimento nell'interazione tra la vite ed il micopatogeno *Uncinula necator*.



BIBLIOGRAFIJA

Assaad F.F., Qiu J.L., Youngs H., Ehrardt D., Zimmerli L., Kalde M., Wanner G., Peck S.C., Edwards H., Ramonell K., Somerville C.R., Thordal-Christensen H. (2004). The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae. *Molecular Biology of Cell* Vol 15: 5118-5129.

Barker C.L., Donald T., Pauquet J., Ratnaparkhe M.B., Bouquet A., Adam-Blondon A.F., Thomas M.R., Dry I.B. (2005). Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. *Theor Appl Genet* 111: 370-377.

Baulcombe D.C. (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 109-113.

Bekesiova I., Nap J.P. e Mlynarova L. (1999). Isolation of High Quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 269 – 277.

Bittel P. and Robatzek S. (2007). Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr Opinion in Plant Biology* 10: 335-341.

Brodersen P. and Voinnet O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* Vol. 22, N. 5, 268-280.

Bornhoff B.A., Harst M., Zyprian E., Topfer R. (2005). Transgenic plants of *Vitis vinifera* cv Seyval blanc. *Plant Cell Rep* 24: 433-438.

Bouquet A. (1986). Introduction dans l'espece *Vitis vinifera* L. d'un caractere de resistance a l'oidium (*Uncinula necator* Schw.Burr.) issu de l'espece *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) Small. *Vigne-vini* 12 [Suppl]: 141-146.

Chong J., Le Henanff G., Bertsch C., Walter B. (2008). Identification, expression analysis and characterization of defense and signalling genes in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry* 46, 469-481.

Cogoni C. and Macino G. (1999). Gene silencing in *Neurospora crassa* requie a protein homologous to RNA-dependent polymerase. *Nature* 399, 166-169.

Collins N.C., Thordal-Christensen H., Lipka V., Bau S., Kombrink E., Qiu J.L., Huckelhoven R., Stein M., Freialdenhoven A., Somerville S.C., Schulze-Lefert P. (2003). SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* Vol. 425 doi:10.1038/nature02076.

Dami I. and Hughes H.G. (1997). Effects of PEG-induced water stress on in vitro hardening of 'Valiant' grape. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult* 47: 97-101.

DeYoung B.J. and Innes R.W. (2006). Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology* Vol 7. doi:10.1038/ni1410.

Donald T.M., Pellerone F., Adam-Blondon A-F, Bouquet A., Thomas M.R., Dry I.B. (2002). Identification of resistance analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theor Appl Genet* 104: 610-618.

Dong W., Nowara D., Schweizer P. (2006). Protein polyubiquitination plays a role in basal host resistance of barley. *The Plant Cell* Vol. 18, 3321-3331.

Douchkov D., Nowara D., Zierold U., Schweizer P. (2005). A high-throughput gene-silencing system for the functional assessment of defence-related genes in barley epidermal cells. *MPMI* Vol. 18, pp 755-761.

Earley K.W., Haag J.R., Pontes O., Opper K., Juehne T., Song K., Pikaard C.S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal* 45, 616–629.

Feys B.J., Moisan L.J., Newman M.A., Parker J.E. (2001). Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signalling proteins, EDS1 and PAD4. *The EMBO Journal* Vol. 20 N.19 pp 5400-5411.

Fire A., Xu S., Montgomery M., Kostas S., Driver S. et al. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Fregoni M. (2005). Viticoltura di qualità. Edizioni Phytoline.

Fung Raymond W.M., Gonzalo M., Fekete C., Kovacs Laszlo G., He Y., Marsh E., McIntyre Lauren M., Schachtman D. P., and Qiu W. (2008). Powdery mildew induces defence-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiology*, Vol 146, 236-249.

Hammond-Kosack K.E. and Parker J.E. (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotech* 14: 177-193.

Hellens R, Mullineaux P., Klee H. (2000). Technical focus: A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science* Vol. 5, N. 10, 446-451.

Horiguchi G. (2004). RNA silencing in plants: a shortcut to functional analysis. *Differentiation* 72: 65-73.

Iocco P., Franks T., and Thomas M.R. (2001). Genetic transformation of major wine grape cultivars of *Vitis vinifera* L.. *Transgenic Research* 10: 105-112.

Jaillon O. et al. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* doi:10.1038/nature06148.

Jones J.D.G. and Dangl J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* Vol 144|16nov| doi:10.1038/nature05286.

Karimi M., Inzè D., Depicker A. (2002). GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* Vol. 7, 193-195.

Kikkert J.R., Vidal J.R., Reisch B.I. (2004). Stable transformation of plant cell by particle bombardment/biolistics. In: Pena L (ed) *Transgenic plants: methods and protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, USA, pp 61-78.

Kinkema M., Fan W., Dong X. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. *The Plant Cell* Vol.12, 2339-2350.

Kortekamp A. (2006). Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 58-67.

LeGall O., Torregrosa L., Danglot Y., Candresse T., Bouquet A. (1994). *Agrobacterium*- mediated genetic transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMVF). *Plant Sci.* 103: 161-170.

Liu Y., Schiff M., Marathe R., Dinesh-Kumar S.P. (2002). Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* 30(4), 415-429.

Mellersh D.G. and Heath M.C. (2001). Plasma membrane-cell Wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration. *The Plant Cell* Vol 13, 413-424.

Meredith C.P. (2000). Grapevine genetics: probing the past and facing the future. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol.66, n°1,2001 (21-25).

Mullins M.G., Bouquet A., Williams L.E. (1992). *Biology of the Grapevine*. Cambridge University Press, New York.

Ogita S., Uefuji H., Yamaguchi Y., Koizumi N., Sano H. (2003). RNA interference: Producing decaffeinated coffee plants. *Nature* 423, 823 (19 June 2003) | doi:10.1038/423823a.

Rumbolz J., Kassermeyer H.-H., Steinmetz V., Deising H.B., Mendgen K., Mathys D., Wirtz S., and Guggenheim R. (2000). Differentiation of infection structures of the powdery mildew fungus *Uncinula necator* and adhesion to the host cuticle. *Can. J. Bot.* 78: 409-421.

Sato F. (2005). RNAi and functional genomics. *Plant Biotechnology* 22, 431-442.

Schwab R., Ossowski S., Riester M., Warthmann N., Weigel D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial MicroRNAs in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* doi:10.1105/tpc.105.039834.

Shapiro A.D. and Zang C. (2001). The role of *NDR1* in avirulence gene-directed signalling and control of programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* Vol. 127, pp. 1089-1101.

Shirasu K. and Schulze-Lefert P. (2003). Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends in Plant Science* Vol. 8 N.6, 252-258.

Smith N.A., Singh S.P., Wang M.B., Stoutjesdijk P.A., Green A.G., Waterhouse P.M. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* Vol 407, 319-320.

Spoel S.H., Koornneef A., Claessens S.M.C., Korzelius J.P., Van Pelt J.A., Mueller M.J., Buchala A.J., Metraux J.P., Brown R., Kazan Kemal, Van Loon L.C., Dong X., Pieterse C.M.J. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defence pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, Vol 15, 760-770.

Vidal J.R., Kikkert J.R., Wallace P.G., Reisch B.I. (2003). High-efficiency biolistic co-transformation and regeneration of 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) containing *npt-II* and antimicrobial peptide genes. *Plant Cell Rep* 22: 252-260.

Vidal J.R., Kikkert J.R., Donzelli B.D., Wallace P.G., Reisch B.I. (2006). Biolistic transformation of grapevine using minimal gene cassette technology. *Plant Cell Rep* 25: 807-814.

Voinnet O. and Baulcombe D.C. (1997). Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389, 553.

Wielopolska A., Townley H., Moore I., Waterhouse P., Helliwell C. (2005). A high-throughput inducible RNAi vector for plants. *Plant Biotechnology Journal* 3, pp. 583-590.

Yamamoto T., Iketani H., Ieki H., Nishizawa Y., Notsuka K., Hibi T., Hayashi T., Matsuta N. (2000). Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep* 19: 639-646.

Zamore P.D. (2002). Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* Vol. 296, 1265-1269.

Zottini M., Barizza E., Costa A., Formentin E., Ruberti C., Carimi F., Lo Schiavo F. (2008).
Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. *Plant Cell Rep* DOI 10.1007/s00299-008-0510-4.



RINGRAZIAMENTI

*A chi si è preoccupato per me, perché nel farlo mi ha manifestato immeritato affetto;
a chi mi ha abbandonato o tradito, perché nel farlo mi ha fatto capire i miei limiti;
a chi mi ha amato, perché mi ha dato tutto il meglio che poteva darmi di se;
a chi ho amato, perché mi ha permesso di dare il meglio di me;
a chi mi ha protetto, perché mi ha permesso di formare il talento nella quiete;
a chi mi ha ostacolato, perché mi ha permesso di temprare il carattere nel fiume della vita
umana;
a chi mi ha insegnato ciò che so, perché mi ha permesso di conoscermi, accettarmi e
cambiarmi;
a chi è mio modello, perché è fondamenta su cui poggia tutto ciò che sono.
A chi amo e mi ama, perché rende ogni nuovo giorno un capolavoro.*

“Luca Chiesi”

Il primo ringraziamento va al Dott. A. M. Stanca, che mi ha accettata nel suo Centro offrendomi la possibilità di crescere professionalmente ed umanamente mettendomi a disposizione tutti quegli "strumenti" sia tecnologici che umani che molti ragazzi come me mi invidiano, ma che auguro loro di trovare nella vita.

Il secondo ringraziamento va al Prof. Andrea Fabbri per avermi accompagnata nel corso di questi tre anni con disponibilità e gentilezza. Ringrazio anche il Prof. Marcello Tomaselli ed i ragazzi di Biologia dell'Università di Parma: Deborah B., Manuela V. e Tommaso G. per la loro accoglienza, gentilezza e disponibilità.

Il terzo va alla Dott.ssa Michela Zottini, alla Dott. Cristina Ruberti ed alla Prof. Fiorella Lo Schiavo dell'Università di Padova per il loro contributo fondamentale al lavoro di tesi ed alla disponibilità che sempre dimostrano.

Il mio ringraziamento va anche al Dr Patrik Schweizer per avermi ospitata nel suo laboratorio dell'IPK di Gatersleben (Germania).

Un sentito ringraziamento va naturalmente a Giampiero Valè (il capo) che con esperienza, disponibilità e tanta pazienza mi ha guidata (lo so che siamo tutte donne e ti facciamo tribolare, ma se non ci fossimo bisognerebbe inventarci!); non sono stata forse una perfetta dottoranda, ma spero di non averlo deluso.

Chiaramente ringrazio tutte le persone che lavorano in Istituto: sempre disponibili e gentili nel momento del "bisogno scientifico" e anche nel darmi un passaggio in stazione! Grazie di cuore soprattutto ai dottorandi ed ai post-doc che io considero colleghi eccezionali, ma soprattutto amici che hanno condiviso con me, e continuano a farlo, gioie e dolori professionali ed anche personali: non riesco ad esprimere tutto quello che davvero rappresentate e quanto siete preziosi per me! Un grazie anche a Sandro, per aver condiviso con me il viaggio Reggio-Fiorenzuola per un anno.



Ad Anna, Francesco, Massimo e Licia la gatta: il mio sostegno, la mia vita, la mia famiglia.



A Giorgia (sssss) l'orfanella, super amica di sempre ed insostituibile. A Mela, Alessandra ed Andrea: grazie per esserci sempre!



Ai miei amici di sempre, che mi stanno vicini da anni nonostante gli 850 Km che ci separano (anche a Silvana e Cataldo).



Ai miei zii, ai miei cugini ed ai miei nonni (anche a quelli che sono in cielo) che sempre sostengono me e Massimo e che ci fanno sentire il calore della famiglia anche se siamo lontani da casa.

Alle persone che ho avuto la fortuna e l'onore di incontrare in questi anni, in particolare a delle persone speciali che hanno creduto in me e mi hanno accolta nella loro famiglia volendomi bene così come sono e che continuano a rappresentare per me un punto fisso molto importante. Ai nonni di Castelnuovo e di Reggio. A Simone per la copertina della tesi, ma non solo...



Per non rischiare di sbagliare dimenticando qualcuno: un grazie di cuore a tutti!

